НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК УКРАИНЫ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ НЕОТЛОЖНОЙ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ
им. В. К. ГУСАКА НАМН УКРАИНЫ»

В. К. Гринь, В. Ю. Михайличенко

КЛЕТОЧНАЯ КАРДИОМИОПЛАСТИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Монография

Донецк
Юго-Восток
2014

УДК 616.127-005.8.001.53
ББК Р457.345.1в615
Г85

Монографія присвячена ізогенній клітинній кардіоміопластиці при інфаркті міокарду в експерименті і порівняльному аналізу ефективності вживання ембріональних, мезенхімальних і комітованних мезенхімальних стовбурових клітин і введенню гранулоцитарного колонієстімулірующего чинника. Аутологичні мезенхімальні стовбурові клітини виступають у ролі індуктора процесів регенерації і ремоделювання пошкодженого міокарду, забезпечуючи репаратівний морфогенез і підвищення адаптаційних резервів життєздатного міокарду.

Для патофізіологів, трансплантологів, кардіологів, кардіохірургів, лікарів загальної практики, лікарів-інтернів і студентів вищих медичних закладів.

Авторы: В. К. Гринь, В. Ю. Михайличенко, А. М. Гнилорыбов,
А. Г. Попандопуло, С. И. Эстрин

Рецензенты:

Мойбенко А. А. — заведующий отделом общей и молекулярной патофизиологии Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины (г. Киев), академик НАН Украины, доктор медицинских наук, профессор, Лауреат государственной премии Украины в области науки и техники;

Ельский В. Н. — профессор кафедры патофизиологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького МОЗ Украины, член-корреспондент НАМН Украины, доктор медицинских наук, профессор;

Кубышкин А. В. — проректор по научно-исследовательской работе ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского», заведующий кафедрой патологической физиологии, доктор медицинских наук, профессор

Рекомендована к печати и разрешение использовать гриф «Национальная академия медицинских наук Украины» научно-издательским советом НАМН Украины (постановление № 1 от 06.05.2014 г.)

ISBN 978-966-374-811-5

© В. К. Гринь, В. Ю. Михайличенко, А. М. Гнилорыбов, А. Г. Попандопуло, С. И. Эстрин, 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ 6

ПРЕДИСЛОВИЕ 8

ВВЕДЕНИЕ 12

Раздел 1
СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ РЕГЕНЕРАЦИИ И РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) 16

1.1. Регенераторные возможности миокарда 16
1.2. Реваскуляризация миокарда 22
1.2.1. Коронарное шунтирование 23
1.2.2. Чрескожные вмешательства на коронарных артериях 24
1.3. Современные немедикаментозные технологии реваскуляризации миокарда 25
1.3.1. Усиленная наружная контрпульсация 25
1.3.2. Ударно-волновая терапия (УВТ) 25
1.3.3. Трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация 27
1.4. Клеточная кардиомиопластика 29
1.4.1. Локальная терапия цитокинами 29
1.4.2. Мобилизация эндогенных стволовых клеток 30
1.4.3. Трансплантация стволовых клеток 34
1.4.3.1. Трансплантация эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) 36
1.4.3.2. Трансплантация кардиомиоцитов 38
1.4.3.3. Трансплантация миобластов скелетных мышц 41
1.4.3.4. Трансплантация эндотелиальных клеток 43
1.4.3.5. Трансплантация эндогенных стволовых клеток сердца 45
1.4.3.6. Трансплантация нефракционированных клеток костного мозга 46
1.4.3.7. Трансплантация стволовых клеток пуповинной крови 51
1.4.3.8. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток 52
1.4.3.9. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток 54

1.4.3.10. Результаты пилотных к линических исследований 59
1.4.3.11. Способы введения стволовых клеток 62

Раздел 2
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 72
2.1. Общая характеристика методов моделирования инфаркта миокарда и экспериментальных групп 72
2.2. Методика проведения электрокардиографии и стресс-нагрузки изопропилнорадреналином 84
2.3. Методика изучения сократительной функции сердца 87
2.4. Методика выполнения ультразвукового исследования сердца 88
2.5. Определение эндотелина-1 и эндотелиального фактора роста сосудов 89
2.6. Определение активности аденозиндезаминазы эритроцитов 89
2.7. Получение субклеточных фракций кардиомиоцитов 90
2.8. Определение содержания малонового диальдегида 91
2.9. Определение содержания диеновых конъюгатов 92
2.10. Определение содержания нитратов и нитритов в плазме крови 92
2.11. Методика получения эмбриональной культуры клеток 93
2.12. Методика получения мезенхимальных стволовых клеток 94
2.13. Методика получения комитированых мезенхимальных стволовых клеток 95
2.14. Конечный результат дифференцирования мезенхимальных стволовых клеток («потенциирование») 96
2.15. Методика интракардиального введения клеточного трансплантата 97
2.16. Методика внутривенно введения клеточного трансплантата 98
2.17. Методика внутрижелудочкового введения клеточного трансплантата 98
2.18. Методы гистологическое исследование 99
2.19. Статистические методы исследования 101

Раздел 3
РЕЗУЛЬТАТЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ 102
3.1. Влияния трансплантации МСК на метаболические показатели плазмы крови 102
3.2. Содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в субклеточных фракциях кардиомиоцитов 108
3.3. Влияние МСК на эффективность ангиогенеза и состояние сосудистого тонуса 111

Раздел 4
РЕЗУЛЬТАТЫ УЛЬТРАЗВУКОВОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ И МАКРОМОРФОМЕТРИИ 117
4.1. Показатели макроморфометрии 117
4.2. Данные ультразвукового исследования 119

Раздел 5
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ХРОНОТРОПНОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА 136

Раздел 6
ОСОБЕННОСТИ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕРДЦА КРЫС ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ 148

Раздел 7
РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА ПО ИНВАЗИВНЫМ МЕТОДОМ 155

Раздел 8
РЕЗУЛЬТАТЫ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ 159
8.1. Морфологические изменения в участке инфаркта миокарда у животных без лечения (в разные сроки эксперимента) 159
8.2. Морфологические изменения в участке инфаркта миокарда у животных с различными видами кардиомиопластики (в разные сроки эксперимента) 165
8.3. Морфометрические исследования инфаркта миокарда у животных после различных видов клеточной кардиомиопластики 174
8.4. Морфометрические исследования инфаркта миокарда у животных после различных сроков введения трансплантата МСК 183
8.5. Морфометрические исследования инфаркта миокарда у животных после различных способов введения МСК 185

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 187

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 207

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ — артериальная гипертензия
АКШ — аортокоронарное шунтирование
АПФ — ангиотензинпревращающий фермент
АСТ — аспартатаминотрансфераза
Г-КСФ — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ГСК — гематопоэтические стволовые клетки
ДК — диеновые коньюгаты
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС — ишемическая болезнь сердца
ИКМП — ишемическая кардиомиопатия
ИЛ — интерлейкин
ИМ — инфаркт миокарда
ИФС — интенсивность функционирования структур
КВЧ — крайне высокая частота
КДД — конечное диастолическое давление
КК-МВ — сердечный изофермент креатининкиназы
КМЦ — кардиомиоцит
КШ — коронарное шунтирование
ЛЖ — левый желудочек
ЛДГ — лактатдегидрогеназа
МДА — малоновый диальдегид
МИРМ — миниинвазивной реваскуляризацией миокарда
МО — минутный объем
кМСК — комитированые мезенхимальные стволовые клетки
МРТ — магнитный резонансный томограф
МСК — мезенхимальные стволовые клетки
НККМ — нефракционированные клетки костного мозга
ПСКЧ — плюрипотентные стволовые клетки человека
ПЭК — прогениторные эндотелиальные клетки
РД — развивающееся давление
СК — стволовая клетка
СКС — стволовая клетка сердца
ТБ — тиобарбитуровая кислота

ТБКА — траснлюминальная баллонная коронарная ангиопластика
ТМЛР — трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация
ТНЦ СО — Томский научный центр сибирского отделения РАМН
УВТ — ударно-волновая терапия
УНКП — усиленная наружная контрпульсация
ФВ — фракция выброса
ФК — функциональный класс
ФУ — фракция укорочения
ХСН — хроническая сердечная недостаточность
ЧКВ — чрезкожные вмешательства
ЭКГ — электрокардиография
ЭСК — эмбриональные стволовые клетки
HIF — hypoxia inducible factor
CAUSMIC — Catheter-based Delivery of Autologous Skelet Myoblasts for Ischemic Cardiomyopathy
LFA — lymphocyte function associated antigen
PCI — percutaneous coronary intervention
SDF — stromal cell derived factor
STEMI — ST-elevantion myocardial infarction
VLA — very late activation antigen
VEGF — vascular endothelial grow factor

ПРЕДИСЛОВИЕ

«...Хотя факты остаются последней инстанцией в каждой научной дискуссии, но есть опасность, что мы настолько отдаемся собиранию новых фактов, что у нас совсем не останется времени поразмыслить над теми, которые уже имеются в нашем распоряжении...»

член-корреспондент АН СССР
Б. М. Козо-Полянский

Несмотря на то, что с 1665 года, после открытия Робертом Гуком «клетки»-частицы микроскопического строения пробкового дерева, прошло почти 350 лет, знание о клетке, как элементарной единице строения и жизнедеятельности всех организмов, за исключением вирусов, обладающей собственным обменом веществ, способной к самостоятельному существованию, самовоспроизведению и развитию, постоянно увеличиваются и невольно подталкивают нас на изречение древнегреческого мыслителя Сократа: «Я знаю только то, что ничего не знаю, но другие не знают и этого».

Данная монография посвящена одному из самых инновационных разделов современной медицины и биологии — регенерационной медицине, основанной на использовании клеточно-тканевых технологий. Клеточная терапия в Украине прошла тернистый путь, начиная от невежественных публикаций и предрассудков, до официальной регистрации 26 февраля 2013 года нашего государства, первой из стран СНГ, на клиническое использование стволовых клеток по трем направлениям: травмы и ожоги, хроническая ишемия нижних конечностей и панкреонекроз. Экспериментальные исследования, посвященные изучению влияния клеточных культур при той или иной патологии, в Украине проводятся достаточно давно. В Государственном учреждении «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака НАМН Украины» в 2012 году было отмечено 10-летие создания и работы лаборатории клеточного и тканевого культивирования, не имеющей аналогов в странах СНГ. Естественно в мировом масштабе мы накопили небольшой опыт применения различных клеток и тканей для коррекции различной патологии человека не только в эксперименте на опытных моделях, но и в клинической практике, но, тем не менее, у нас имеется большое количество исследований, посвященных клеточной коррекции ряда болезней.

Несмотря на колоссальное развитие терапевтических и хирургических методов лечения различных патологических состояний человека, они в ряде случаев являются малоэффективными или вообще неэффективными, что стимулирует ученых всего мира к разработке новых методов лечения и самого перспективного из них — это использование внутреннего резерва организма для восстановления целостности утраченных структур, причем не только в морфологическом плане, но и в функциональном. Клеточная терапия была впервые продемонстрирована в 1912 году Нобелевским лауреатом, французским ученым Алексисом Каррель циклом работ по разработке оригинальных методов сшивания сосудов и техники выращивания культуры тканей. Он высказал идею: «Человечество надеется на предотвращение дегенеративных и психических заболеваний, а не на облегчение их симптомов». Через 19 лет, в 1931 году швейцарский хирург из Бёрна, профессор Пауэль Ниханс, заметил, что состояние больного с пораженными околощитовидными железами при операциях на щитовидной железе улучшается, если ввести в них путем инъекции вытяжку из околощитовидных желез животных, взятых на бойне. Им была выдвинута гипотеза о том, что для улучшения деятельности любого органа, следовательно, достаточно ввести немного «свеженьких» клеток. Начиная с этого исторического периода, появился ряд работ, посвященных клеточной терапии в той или иной области биологии и медицины.

По данным ООН, происходящий во всем мире уникальный и необратимый процесс демографической трансформации приведет к глобальному старению населения. В связи со снижением рождаемости, доля лиц в возрасте 60 лет и старше удвоится в период между 2007 и 2050 годами, а их реальное число увеличится более чем в три раза, достигнув 2 миллиардов в 2050 году. К тому времени в большинстве стран число людей старше 80, вероятно, увеличится в четыре раза, почти до 400 миллионов. Развитие технологий в области ядерной физики, непрерывное развитие техники приводит к увеличению роста травматизма, техногенным авариям, ведущих за собой возрастание хронических дегенеративных заболеваний и ин-

валидизации трудоспособного населения. Вышесказанное еще раз акцентирует наше внимание на разработку принципов регенеративной медицины, направленных на восстановление целостности клеток, тканей и организма в целом.

Современная концепция использования клеточной терапии основана на замене разрушенных клеток тела человека новыми путем пересадки, с тем, чтобы осуществить более эффективное лечение болезни, а в некоторых случаях и единственного пути излечения. Достижения регенераторной медицины на данный момент развития базируются на применении технологий удаления дефектных клеток в основном при аутоимунных и опухолевых заболеваниях, репрограммировании клеток, цитокиновой терапии, тканевой инженерии, создании диагностических платформ и биопринтинге.

Нами в отделе экспериментальной хирургии проведены исследования по эффективности применения различной клеточной терапии в эксперименте при сахарном диабете, ревматоидном артрите, инфаркте миокарда, ишемии нижних конечностей, ишемическом повреждении головного мозга, костных дефектах, повреждениях поверхностных тканей. Большая экспериментальная база и положительные результаты, полученные в результате проведения опытов на животных, дали основание нам для клинического применения клеточной терапии.

Для оценки эффективности и целесообразности любого нового метода или способа лечения основополагающим требованием является достоверность получаемых результатов. В полной мере это требование исповедуется нами в наших изысканиях по биотехнологическим направлениям. В Институте применяется классическая схема: концепция — эксперимент — клиника.

Принимая во внимание, что среди приоритетных направлений работы нашего института всегда были и остаются проблемы оказания специализированной помощи пострадавшим с термическими поражениями и, имея неоспоримые успехи в лечении этой категории пострадавших, начальный этап работы лаборатории был преимущественно связан с разработкой методов культивирования клеток кожи (фибробластов и кератиноцитов), предназначенных для закрытия раневых дефектов у больных с обширными ожогами. По мере накопления опыта работы лаборатория начала решать вопросы более широкой направленности и фундаментального характера.

В 2006 году на базе лаборатории создан международный центр биотехнологий «Биостэм». В состав центра, наряду с лабораторией клеточного и тканевого культивирования, включены лаборатория трансплантации гемопоэтических клеток костного мозга, лаборатория фундаментальных исследований, а также клинические подразделения института. В 2007 году в составе центра начал функционировать банк стволовых и специализированных клеточных культур различного уровня дифференцировки и пуповинной крови, рассчитанный на длительное хранение образцов.

В настоящее время мы располагаем наибольшим в Восточной Европе опытом практического применения биотехнологий в области лечения ряда острых, хронических заболеваний и травм методами клеточной трансплантации, для оптимизации иммунного ответа и в эстетической медицине. Нами проводятся исследования различных биотехнологических направлений (реваскуляризации нижних конечностей, использование мезенхимальных стволовых клеток при тяжелой аутоиммунной патологии, лечении хронической гепатопатии, иммунотерапии рассеянного склероза, диабетической ретинопатии, постгипоксических нарушениях ЦНС, особенностях банкирования трехмерных объектов и др.). Следует отметить, что в институте проводятся не только работы прикладного характера, но и фундаментальные исследования молекулярно-генетических и эпигенетических механизмов реализации эффектов клеточных и тканевых трансплантатов, которые позволят в будущем не только обосновать выбор того или иного варианта лечения, но и разработать новые биотехнологические подходы.

В целом, 12-летний опыт позволяет утверждать, что биотехнологии занимают достойное место в лечении широкого круга заболеваний. Это направление открывает перспективу для разработки принципиально новых методов лечения, требует интеграции усилий научных и лечебных учреждений, а также тесной кооперации с зарубежными партнерами.

Коллектив авторов будет очень благодарен за доброжелательные и критические замечания по отношению к материалам, обсуждаемых в данной монографии.

Коллектив авторов

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении и профилактике ишемического поражения миокарда, данная патология занимает второе место в общей смертности (по данным ВОЗ и НАМНУ 2009, 2010, 2011) [30, 37, 74]. К сожалению, современная фармакотерапия и хирургические методы лечения инфаркта миокарда исчерпывают свой лечебный потенциал, поэтому внимание большинства ученых всего мира направлено на возможность применения альтернативных методов реваскуляризации миокарда, в частности к клеточной терапии, а именно: трансплантации стволовых или эмбриональных клеток и как вариант — мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Таким образом, современное развитие биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии позволило, наряду с химическими способами коррекции метаболизма в поврежденных клетках, перейти к использованию биологических способов, при которых средством восстановления функции поврежденных органов при многих заболеваниях становятся донорские клетки [49, 91].

Длительное время сердце взрослого млекопитающего считалось постмитотическим органом, утратившим после рождения свой эндогенный пул стволовых клеток, как источник регенерации. Утрата функционально-активной клеточной массы, которая возникала в результате инфаркта миокарда или других повреждениях сердца, в ответ на стресс, компенсировалась за счет увеличения мышечной массы путем клеточной гипертрофии [68].

В последнее десятилетие большое внимание уделяется уже не отдельным исследованиям в области генной и клеточной терапии заболеваний, а новому направлению, цель которого заключается в использовании естественных механизмов восстановления тканей и органов — регенеративной медицине. Важнейшая задача, составляющая это направление, — разработка методов восстановления кровоснабжения поврежденных тканей, без которого полноценная регенерация невозможна [16, 25, 35, 90].

Несколько лет назад стволовые клетки сердца (СКС) были идентифицированы у крыс и человека. В работе Laugwitz et al. (2005) было показано присутствие стволовых (isl-1+) клеток в постнатальном сердце крыс, мышей и человека. Это исследование показало, что isl-1+ клетки представляют собой аутентичную эндогенную популяцию предшественников (кардиобластов), которые демонстрируют высокую способность к дифференцировке в клетки с фенотипом кардиомиоцитов со стабильной экспрессией маркеров и отсутствием слияния. Регенерация повреждённого миокарда за счёт СКС семь лет назад была обнаружена и изучена у собак. Таким образом, несколько независимых лабораторий описывают различные стволовые популяции сердца взрослого организма млекопитающих. Однако, к сожалению, пул данных клеток позволяет компенсировать утрату лишь небольшой массы ткани сердца и не может противостоять массовой гибели сердца при инфаркте миокарда [цит. 25].

В работе группы итальянских ученых под руководством Anvresa P. (2007) детально изучена популяция стволовых клеток, присутствующих в миокарде человека и обеспечивающих его регенерацию после инфаркта. Повышенное количество СКС было достоверно зафиксировано при острой и хронической ишемии миокарда по сравнению с контролем (с 1,5 % в контроле до 28 % в случае острого инфаркта). Количество СКС при остром инфаркте было выше, чем при хронической ишемии, с максимальной концентрацией клеток в пограничной зоне. Активность теломеразы и митотический индекс увеличивались пропорционально количеству СКС [346]. Annarosa Leri (2006, 2008), используя взрослых мышей, определила местонахождение естественной «ниши» для стволовых клеток, которые, как оказалось, в изобилии находятся в предсердии. Она доказала, что стволовые клетки группируются вместе с более зрелыми клетками в промежутках между мышечными сердечными клетками. В опыте ученые взяли небольшое количество сердечных стволовых клеток от людей, подвергавшихся операциям на сердце, вырастили их в лаборатории и затем пересадили в повреждённые сердца крыс и мышей. Опыты показали, что, в конечном счёте, такие сердечные стволовые клетки могут дать лучшие результаты при лечении сердца, чем стволовые клетки из костного мозга, которые уже начали использовать для лечения сердца в клинике [167, 281].

Более того, в ряде работ также доказано восстановление поврежденных клеток, митохондрий и ДНК за счет стволовых клеток, которые выступали в качестве «строительного материала» [345].

Большое количество работ в мировой литературе посвящено применению эмбриональных клеток для регенерации миокарда, однако данные абсолютно различные и требуют дальнейшего исследования. Следует отметить, что имеется большое количество исследований, посвященных трансплантации в поврежденный миокард клеток различной природы и дифференцировки (стволовые клетки, миобласты, миоциты, клетки плаценты и т. д.), однако нет единого мнения об их эффективности [16, 25].

Восстановление функции миокарда может быть достигнуто путем увеличения количества сократительных клеточных элементов в миокарде и/или путем повышения функционального резерва кардиомиоцитов реципиента за счет стимуляции в них процессов внутриклеточной регенерации, изменения биомеханических свойств сердечной мышцы, улучшения васкуляризации миокарда. Так как клеточные трансплантации призваны целенаправленно изменить процессы ремоделирования миокарда, повлиять на его регенерацию и, в конечном счете, улучшить функцию сердечной мышцы, то все клеточные технологии в кардиологии стали объединять термином «клеточная кардиомиопластика» [7, 16, 74].

Накопленный экспериментальный материал позволил перейти к первым клиническим исследованиям. В Германии, России, Франции, США и Китае начаты клинические испытания внутрикоронароного [361] или интрамиокардиального введения клеток костного мозга [91, 112], аутологичных миобластов [278, 303] пациентам с ишемической болезнью сердца (ИБС) и кардиомиопатиями. В НИИ трансплантологии и искусственных органов РФ в 2003 году также начаты работы по трансплантации аутологичных МСК костного мозга в миокард пациентам с ИБС и кардиомиопатиями. Все исследователи отмечают безопасность применения аутологичного материала, его неаритмогенность. Было обнаружено приживание пересаженных клеток на сроках до 6 месяцев [379]. Однако эффект от клеточной трансплантации в клинике пока мало заметен по различным причинам (малочисленность наблюдений и неоднородность групп пациентов, комбинация клеточной терапии с медикаментозным и хирургическим лечением).

На сегодняшний день технологии исследования стволовых клеток вышли на качественно новый уровень не только экспериментальных моделей, но и вариантов их клинического применения. Технологии переносов генов, нокаутирования, клонирования, индукции плюрипотентности открывают широкие возможности перед экспериментальной и клинической медициной, но требуют взвешенного подхода и четкого осознания возможных рисков [16, 218].

Таким образом, в настоящее время метод клеточной трансплантации рассматривается большинством исследователей как перспективный. По-видимому, в обозримом будущем метод начнет применяться в клинической практике для улучшения прогноза у больных с сердечной недостаточностью (СН) различного генеза (ИБС, дилатационная и ишемическая кардиомиопатии и др.). Однако для этого в эксперименте должны быть получены убедительные доказательства позитивного влияния трансплантированных клеток на поврежденный миокард и выявлены преимущества влияния какого-либо определенного типа клеток (например, МСК) на восстановление сократительной функции поврежденного миокарда. Отсутствие таких данных в эксперименте позволило нам сформулировать цели и задачи исследования, которые приведены ниже.

Итак, изучение эффектов трансплантации культуры мезенхимальных стволовых клеток является малоизученным и перспективным направлением в современной медицине, а в частности в кардиологии и кардиохирургии, как метод альтернативной регенерации миокарда.

Раздел 1
СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ РЕГЕНЕРАЦИИ И РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Регенераторные возможности миокарда

Как бы не казалось парадоксально, самый важный орган в организме человека — сердце, практически не в состоянии самостоятельно восстановить мышечную массу, утерянную в результате инфаркта или ишемии-реперфузии.

Необратимые повреждения в кардиомиоцитах возникают уже через 10 минут аноксии, а через 30–60 минут ишемии эти повреждения затрагивают такое количество клеток сердца, что формируется зона некроза, даже если будет восстановлен коронарный кровоток. Ранее считалось, что сердце, как и головной мозг относятся к постмитотическим органам, не способным к дальнейшей регенерации и кардиомиоциты являются конечной точкой дифференцировки [27, 45, 61, 91, 382]. Частичное восстановление миокарда после его повреждения, считалось, происходит за счет гипертрофии, что и приводит к увеличению массы миокарда [71]. В таком случае если кардиомиоциты не способны к митотической активности, то они функционируют всю свою жизнь и замена поврежденных клеток осуществляется за счет гипертрофии, но этот процесс не может быть бесконечным и не один человек старше 100 лет не умер от отсутствия кардиомиоцитов в сердце [32, 70, 84, 110, 119].

Согласно современным представлениям, практически все известные тканевые системы содержат локальные клетки-предшественники, так называемые клетки-сателлиты. Стволовые клетки (СК) были обнаружены в коже, печени, центральной нервной системе, желудочно-кишечном тракте, скелетной мускулатуре и др. Однако если в отношении этих тканей наличие резидентных предшественников было убедительно доказано в ряде исследований, то информация о существовании стволовых клеток в сердечно-сосудистой системе по-прежнему ограничена [61, 346]. В конце прошло-

го столетия независимо друг от друга Масловым Л. Н. и Baserga R. было доказано репликация ДНК и кариокинез происходящий в кардиомиоцитах [44, 45, 119, 26], а G. Olivetti цитокинез в клетках миокарда [105]. Таким образом было доказано, что кардиомиоцит не является терминальной стадией дифференцировки и способен к гиперплазии. Американскими исследователями возглавляемые Jan Kajstura, смогли убедительно показать, что кардиомиоциты взрослого человека могут делиться [193, 281]. Этот процесс усиливается в условиях патологии, например пролиферация кардиомиоцитов в периинфарктной зоне увеличивается в 57 раз по сравнению с сердцем здорового человека. Поскольку специфической клеточной популяции, ответственной за восстановление миокарда, в самом сердце обнаружить не удавалось, было высказано предположение о роли циркулирующих в крови предшественников.

В работах Beltrami A. P. et al. [193] был обнаружен маркер репликации ДНК в виде белка Ki-67 у 4 % кардиомиоцитов периинфарктной зоны, что в 84 раза больше, чем в здоровом сердце. Рядом авторов было доказано увеличение количества стволовых клеток в миокарде при различной патологии сердца (инфаркт миокарда, аортальный стеноз, дилатационная кардиомиопатия). Для регенерации миокарда, наибольший интерес представляют c-kit положительные стволовые клетки, которые обнаруживаются в сердце. В опытах на животных, были выделены c-kit положительные стволовые клетки, культивированы и трансплантированные с область инфаркта, что сопровождалось их приживлением, миграцией, пролиферацией и дифференцировкой, ведущей к улучшению функции сердца [87, 134]. Следует отметить, что C-kit+ клетки обнаруживаются в сердце только на сроке 5–6 недель развития, они выстилают изнутри полость желудочков и участвуют в последующем в формировании внутри мышечных сосудов сердца. На более поздних сроках гестации и у взрослого человека C-kit+ клетки в сердце не обнаруживаются, а определяются лишь C-kit+ клетки эндотелия, которые при необходимости могут дифференцироваться не только в клетки эндотелия, но и в кардиомиоциты [41].

Серьезным подтверждением участия в регенерации миокарда циркулирующих СК стали данные, полученные при разнополой трансплантации сердца и других органов [62, 126, 151, 271, 313, 332].

В результате полового различия клеток по XX и XY хромосоме, возможно отследить перемещение тех или иных клеток из трансплантируемого органа или клеток. Появление клеток с противоположным кодированием пола принято называть — «клетки химеры», а явление химеризмом.

В классическом представление, явление химеризма, подразумевает под собой появление в организме реципиента клеток донора, которые фактически не уничтожаются иммунитетом реципиента и воспринимаются как собственные [92]. Таким образом присутствие среди клеток хозяина (XX) клеток, содержащих Y-хромосому, позволило предположить, что новообразованные кардиомиоциты (КМЦ) и сосудистые эндотелиальные клетки возникли из мигрировавших клеток реципиента. Например в работах J. Kajstura и P. Anversa, было описано идентификация в пересаженных женских сердцах 18 % кардиомиоцитов, 20 % артериол и 14 % капилляров содержащих Y-хромосому [151]. Эти клетки не содержали специфические антигенные маркеры, характерные для миелоидных, лимфоидных и эритроидных клеток, поэтому появление а миокарде клеток, имеющих Y-хромосому, нельзя было объяснить методической погрешностью, реакцией отторжения и лейкоцитарной инфильтрацией [151]. Наиболее простым и логическим объяснением химеризма миокарда, по мнению большинства ученых, является миграция в миокард циркулирующих в крови СК костного мозга. Подобные явления химеризма сердца были выявлены и у пациентов, перенесших несовпадающую по полу аллогенную трансплантацию костного мозга [271].

Нами под руководством академика НАМНУ, профессора Гриня В. К., были проведены опыты на инбредных крысах линии Вистар-Кайота. В опыте на самках был смоделирован инфаркт миокарда, путем перевязки передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии, взят костный мозг у самцов из которого культивировали мезенхимальные стволовые клетки. Далее после трансплантации, независимо от метода введения (интракоронарно, интрамиокардиально, системно) по Y-хромосоме были верифицированы клетки самцов в зоне инфаркта сердца крыс-самок, таким образом был доказан хоуминг мезенхимальных стволовых клеток. В последующем Y-хромосома была обнаружена в клетках эндотелия и соединительной ткани, а также кардиомиоцитах сердца реципиента [25, 48]. Предполагается, что региональные СК являются первой линией защиты при повреждении ткани, а когда их недостаточно, в процесс репарации заживления включаются циркулирующие СК костного мозга в результате также хоуминг-эффекта.

Предполагается, что это происходит по двум и более сценариям. Первая гипотеза состоит в следующем — СК постоянно циркулируют в крови и при повреждении ткани инфильтрируют ее. По второму варианту события развиваются таким образом, что в результате повреждения органа, например, развитии ИМ, освобождаются специальные сигнальные молекулы, которые вызывают мобилизацию СК в периферической крови, которые впоследствии и проникают в поврежденную ткань [345]. В опубликованных работах [64], была продемонстрирована положительная связь между величиной прироста ФВ ЛЖ и количеством СК костного мозга CD 34. Миграция аутологичных СК при ИМ была доказана в работе D. Orlic et al. [345], однако остался открытым вопрос о механизме регенеративного эффекта СК костного мозга: связан он с дифференцировкой клеток в КМЦ и сосуды или же подобное благотворное действие СК является результатом секреции ими каких-то ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию собственных СК миокарда, КМЦ и неоваскулогенез? В работах Wold L. et al. (2004) было продемонстрировано возможность миграции МСК крыс в область ишемизированного миокарда. Аллогенные МСК костного мозга выделяли и метили флуоресцентным маркерами DAPI. Затем клетки вводили внутривенно через 2 дня после стимулированного ИМ у крыс. Спустя 2 недели сердца извлекали, а замороженные участки миокарда подвергали секции и флуоресцентной микроскопии. Донорские клетки определялись в миокарде у 4 из 5 крыс [343].

Механизмы хоуминга и орган-специфичные сигналы для привлечения стволовых клеток в область повреждения представлены ниже:

На уровне поврежденного миокарда:

1. Ишемия, приводящая к увеличению уровня экспрессии HIF-1 клетками в пораженной области и последующей активации экспрессии SDF-1 [185].

2. Некроз, который вызывает высвобождение белка, связывающего хроматин, HMGB 1, действующего как внеклеточный аттрактант клеток-предшественников [288].

3. Сниженный уровень экспрессии VEGF. Экспрессия генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецептора в норме также контролируется HIF-1 по типу положительной обратной связи, но у пожилых людей и пациентов, страдающих диабетом, гипоксия-зависимая регуляция нарушена [374].

4. Факторы микроокружения, которые стимулируют рост и дифференцировку стволовых клеток, в том числе контакты стволовая клетка-кардиомиоцит [146].

К сожалению, на уровне трансплантируемых клеток:

1. Хоуминг рецепторы, в частности, CXCR4 — рецептор к SDF-1 и c-kit (CD117) — рецептор к фактору роста стволовых клеток (stem cell factor, SCF) [98].

2. Интегрины и другие адгезионные молекулы, которые обеспечивают трансмиграцию клеток через стенку сосудов, в частности, LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1), VLA-4 (very late activation antigen-4) и VLA-5 [308].

Полной регенерации миокарда человека после инфаркта миокарда никогда не наступает, это связывают с двумя причинами:

1. Фибробласты принимающие участие в формировании рубца обладают гораздо большей пролиферативной активностью и более выносливы к гипоксии, которая присутствует в зоне инфаркта.

2. Кардиомиоциты неспособны активно делиться в условиях гипоксии.

Необходимо отметить, что для регенерации миокарда требуется не только образование КМЦ, но и коронарных сосудов, т. е. восстановление пула КМЦ не может привести к улучшению сократительной функции сердца без усиления трофики, как и образование только сосудов «не оживит» погибшие КМЦ. Таким образом физиологическая регенерация миокарда требует присутствия примитивной мультипотентной клетки, способной дифференцироваться одновременно в нескольких направлениях.

В настоящее время клеточная терапия считается одним из перспективных подходов в лечении пациентов, перенесших инфаркт миокарда [167, 325, 383]. Трансплантации некоторых видов клеток-предшественников после инфаркта миокарда у человека показали, что трансплантированные клетки не только вносят вклад в постдеструктивную регенерацию сердечной мышцы, но и стимулируют

процесс образования новых кардиомиоцитов из эндогенных тканевых и циркулирующих в кровотоке прогениторных клеток, принимающих активное участие в процессе регенерации [16, 91, 107, 126, 150, 151, 236, 356].

Клеточные технологии применяемые в кардиологии и кардиохирургии принято называть термином «клеточная кардиомиопластика», т. к. независимо от того какую методику применяют, будь это трансплантация эмбриональной, мезенхимальной стволовой клетки, кардиомиоцита, миобласта, фибробласта, нефракционированных клеток костного мозга и т. д. или целенаправленная экспрессия регуляторных генов клеточного цикла кардиомиоцита и другие высокотехнологические методы клеточной терапии, — все они направлены на изменение процессов структурно-функциональной перестройки миокарда с целью улучшения его функции, т. е. на ремоделирование сердца [35, 44, 68, 84, 99, 142, 347]. К сожалению, несмотря на значительные успехи достигнутые стандартной терапией инфаркта миокарда начиная от медикаментозной и заканчивая различными методами экстренной реперфузии миокарда (различные виды тромболизиса, баллонная ангиопластика, коронарное шунтирование) все они направлены на ограничение размеров некроза и улучшению функции миокарда, что будет уменьшать проявление сердечной недостаточности и ее осложнений, а также электрическую нестабильность сердца, что соответственно улучшить качество жизни больных и уменьшит смертность [255, 257, 359]. Однако не один из перечисленных методов не направлен на регенерацию поврежденного миокарда и замену нежизнеспособных тканей функционально нормальными. Таким образом разработка способов изучения применения различных видом клеточной регенеративной терапии с целью восстановления поврежденного миокарда и неоангиогенеза является актуальной клинической проблемой [42, 84].

Несмотря на большой объем знаний посвященный пролиферации и регенерации кардиомиоцитов, фармакологические подходы к усилению этих процессов пока не разработаны. Следует отметить, что интенсивное деление кардиомиоцитов у пациента с инфарктом отмечается только в периинфарктной зоне и не затрагивает зону некроза, где формируется рубец. Основываясь на вышеизложенных факторах, многих исследователей привлекает идея трансплантации

в зону инфаркта миокарда «примитивных клеток», способных к интенсивной пролиферации и дифференцировке в кардиомиоциты, эндотелиоциты и клетки гладкой мускулатуры сосудов [91].

С другой стороны несмотря на достижения современной фармакотерапии ХСН, при которой применение ингибиторов АПФ (ангиотензинпревращающего фермента) и β-адреноблокаторов приводит к снижению смерти на 35 %, а также хирургических методов лечения ИБС, что позволяет достичь снижения риска смерти на 50 %, существует определенная категория больных, у которых применение всех вышеперечисленных методов лечения неэффективны [9]. К этой категории больных относят пациентов с рефрактерной стенокардией, с дистальным типом атеросклеротического поражения миокарда, с обширными осложненными инфарктами миокарда (ИМ) в анамнезе (ишемическая кардиомиопатия — ИКМП) или пациенты, которым уже проводились различные варианты реваскуляризации миокарда (чрезкожная баллонная ангиопластика, стентирование, аортокоронарное шунтирование) и для которых повторные вмешательства невозможны. Исходя из вышесказанного, мы видим, что альтернативой для этих пациентов является трансплантация сердца.

Достижения в области клеточной терапии за последние десятилетия, позволили начать применение данного метода лечения в клинической практике [8]. Терапия стволовыми клетками стимулирует процессы ангиогенеза и дифференцировки как собственных «тканевых депо» стволовых клеток, так и введенных из вне стволовых клеток в полноценные кардиомиоциты. Данная процедура позволяет улучшить перфузию миокарда, степень локальной и глобальной сократимости, препятствуют ре моделированию миокарда и процессам апоптоза клеток. Таким образом, клеточная кардиомиопластика представляет собой постоянно расширяющуюся клиническую и научную область, которая изучает применение различных видов малодифференцированных мультипотентных клеток в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, главным образом ИБС и ХСН.

1.2. Реваскуляризация миокарда

Реваскуляризация миокарда — широкое понятие, включающая как операцию КШ, так и различные виды ЧКВ на коронарных артериях. Наиболее известна и распространена траснлюминальная

баллонная коронарная ангиопластика. Реваскуляризация преследует две цели: улучшение прогноза (профилактика ИМ и внезапной смерти), уменьшение или полная ликвидация симптомов. Основными факторами, которые определяют выбор метода лечения, являются индивидуальный сердечно-сосудистый риск и выраженность симптомов [51].

1.2.1. Коронарное шунтирование

В работе Балабаевой Н. А. и др. [75], было оценено качество жизни пациентов после инфаркта миокарда в зависимости от методов лечения (тромболизис, оперативное вмешательство, консервативная терапия). Было установлено, что для повышения качества жизни пациентов ИБС, при инфаркте миокарда следует использовать более радикальные инвазивные методы лечения, в первую очередь такие, как ангиопластика и аортокоронарное шунтирование, поскольку они относятся к категории высокого сердечно-сосудистого риска. Стремительный прогресс хирургических технологий, активное внедрение в клиническую медицинскую практику эндоскопических вмешательств с уверенностью позволяют назвать сегодняшний этап развития хирургии веком миниинвазивной хирургии. «Классическая» хирургическая техника, применяемая для реваскуляризации миокарда, предполагала выполнение вмешательства из продольной стернотомии в условиях ИК с пережатием аорты и защитой миокарда. Однако в течении 25 лет получили развитие многочисленные альтернативные методики шунтирования коронарных артерий, от вмешательств, выполняемых из стернотомии, но на работающем сердце, до операций, которые производятся из минидоступа [21].

Совершенствование инженерной мысли, развитие компьютерных технологий, а также возможностей видеопередачи сигнала позволили в конце 90-х годов прошлого века совершить очередной технологический прорыв и внедрить в хирургическую практику роботизированные комплексы, позволяющие на порядок увеличить результативность и безопасность и точность осуществляемых операций. Помимо полного дистанционного разобщения хирурга и пациента, особенностью робот-ассистированных вмешательств, является то, что каждый из манипуляторов имеет семь степеней

свободы, что значительно превышает возможности человеческой кисти. В последние десятилетия появились публикации об использовании системы da Vinci при выполнении хирургической реваскуляризации миокарда [90].

1.2.2. Чрескожные вмешательства на коронарных артериях

В работе Брыляковой С. Е. и др. [15] было изучены непосредственные и отдаленные результаты траснлюминальной коронарной баллонной ангиопластики (ТБКА) и стентирования у больных ишемической болезнью сердца. Исследование проведено на 62 пациентах с ИБС, которым проведена ТЛКА со стентированием. Непосредственный успех ТЛБА регистрировался у 87 % пациентов. В отдаленном периоде 75 % пациента отметили улучшение самочувствия, уменьшение и исчезновение болей за грудиной, уменьшение одышки, отсутствие перебоев в работе сердца; у 23,7 % пациентов ангинозные боли возникали с той же частотой, им в последующем выполнено АКШ. Таким образом, хорошие непосредственные и отдаленные результаты ТБКА позволяют считать эндоваскулярный метод эффективным и перспективным в лечении больных ИБС. Применение ТБКА в комплексном лечении ИБС позволяет улучшить клиническое течение заболевания, уменьшить смертность, частоту развития ИМ, количество последующих АКШ и улучшить отдаленный результат.

Причем следует отметить, что проведение реваскуляризации миокарда методом ТБКА в экстренном порядке в возможно более ранние сроки от начала развития клиники (до 6 часов) позволяет минимизировать последствия острого ИМ и обеспечивает лучшую сократительную способность миокарда в раннем послеоперационном периоде [3]. При выполнении экстренной ТБКА целесообразна имплантация стентов с лекарственным покрытием и необходимо адекватная антиагрегантная и антикоагулянтная терапия, как в раннем послеоперационном периоде, так и на этапах реабилитации [39].

Следует отметить, что тактика и технология выполнения рентгенэндоваскулярных вмешательств на коронарных артериях постоянно меняется, поэтому тяжело провести рандомизированный анализ этих методов.

1.3. Современные немедикаментозные технологии реваскуляризации миокарда

1.3.1. Усиленная наружная контрпульсация

УНКП — вспомогательный метод лечения рефрактерной стенокардии, который заключается в последовательном нагнетании воздуха в манжеты, наложенные на нижние конечности. При этом весь процесс синхронизирован с ЭКГ. Во время диастолы манжеты последовательно и быстро раздуваются от голеней к бедрам и ягодицам. Это приводит к увеличению диастолического и коронарного перфузионного давления, усилению кровоснабжения миокарда. Мгновенное откачивание воздуха из манжет в начале сокращения желудочков снижает сосудистое сопротивление и разгружает работу сердца. Отсроченными эффектами процедур являются увеличение доставки кислорода и снижение потребности миокарда в кислороде, а конечным результатом — увеличение перфузионного коронарного давления, коллатерального кровотока, ангиогенеза. К противопоказаниям относятся: декомпенсированная ХСН, тяжелая патология клапанов сердца, неконтролируемая АГ, злокачественные аритмии, выраженная патология периферических сосудов, варикозная болезнь с наличием трофических язв, высокая легочная гипертония, аневризмы и тромбозы различных отделов аорты [51].

В ГУ НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН г. Томск, РФ проведено исследование по оценки безопасности и эффективности применения УНКП при остром рецидивирующем ИМ. В результате исследования, выявлена хорошая переносимость лечения. Среди побочных эффектов следует отметить кратковременные эпизоды симптомов ишемии нижних конечностей во время сеансов, которые не требовали отмены терапии. Стабилизация состояния достигнута у 5 больных к 20 сеансу контрпульсации, что проявлялось: уменьшением симптомов стенокардии, сердечной недостаточности, снижением потребности в нитроглицерине, уменьшением количества вызовов дежурного персонала [7].

1.3.2. Ударно-волновая терапия (УВТ)

УВТ позволяет улучшить кровоснабжение миокарда в зоне ишемии за счет образования новых капилляров. Принцип УВТ заключается в механическом воздействии на ишемизированный ми-

окард энергией акустической волны. При этом в зоне воздействия высвобождается ряд вазоактивных субстанций, включая эндотелиальный фактор роста сосудов, способствующих вазодилатации и неоангиогенезу. Однако эффективность УВТ продемонстрирована лишь в пилотных исследованиях, поэтому выраженная положительная динамика клинических проявлений стенокардии и объективных показателей перфузии миокарда требуют подтверждения в крупных, рандомизированных исследованиях [51].

Абстеирвой Р. В. и др. [2] проведено исследование по изучению возможности применения УВТ в лечении пациентов с возвратной стенокардией после реваскуляризации миокарда. Полученные предварительные данные показывают, что УВТ уменьшает симптомы стенокардии, снижает ФК стабильной стенокардии, увеличивает толерантность к физическим нагрузкам, улучшает функцию ЛЖ, несколько улучшает качество жизни пациентов после реваскуляризации.

Основными методами отбора пациентов на УВТ является коронарография и стресс-эхокардиография с добутамином. Проведение УВТ возможно при наличии обратимых ишемических миокардиальных сегментов и противопоказаний к АКШ или стентированию [1, 80].

S. Mariotti [194] и Никоненко А. С. [53] продемонстрировали, что УВТ в зоне воздействия приводит к увеличению продукции оксида азота, что, по всей вероятности, объясняется непосредственным влиянием волновой терапии. Длительность положительного эффекта УВТ обусловлен ангиогенезом в зоне воздействия, доказано сохранение положительного эффекта в течении пяти лет после курса лечения, причем клиническая эффективность подтверждена однофотонной эмиссионной компьютерной томографией [286, 327, 381].

Никоненко А. С, и соавт. в 2009 году [36] опубликовали результаты пилотного исследования эффективности лечения 74 пациентов с ИБС. В результате исследования, авторы доказали, что УВТ оказалась эффективной у 89 % пациентов с ишемической кардиомиопатией: отмечен достоверный прирост сократительной функции левого желудочка и увеличение толерантности к физической нагрузке, снижения количества приступов стенокардии и принятых таблеток нитроглицерина в неделю.

1.3.3. Трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация

Среди множества новых методов нетрадиционной реваскуляризации миокарда еще одним перспективным методов является метод трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации миокарда (ТМЛР), которая выполняется с 1998 года в США [51]. В Научном Центре Сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева (Москва, Российская Федерация), лаборатория трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации миокарда создана в 1999 г., ее возглавляет академик РАН РФ И. И. Беришвили. Лаборатория призвана выполнять операции непрямой реваскуляризации миокарда у ранее неоперабельных (по анатомическому состоянию коронарного русла) больных ишемической болезнью сердца. Эффективность метода связывают с улучшением кровоснабжением миокарда за счет поступления в крови из полости ЛЖ через вновь образованные 20–40 каналов диаметром 1 мм. В лаборатории выполняются операции больным, которым традиционные методы реваскуляризации неприменимы. Это первое подобное подразделение в бывших странах СССР. За последние годы данную методику переняли ряд центров РФ. В лаборатории выполняются операции [47, 72, 76, 77]:

1. Изолированная трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация (ТМЛР).
2. ТМЛР в сочетании с аортокоронарным шунтированием (АКШ).
3. ТМЛР в сочетании с миниинвазивной реваскуляризацией миокарда (МИРМ).
4. ТМЛР в сочетании с ангиогенными факторами.
5. ТМДР в сочетании с клеточной трансплантацией.
6. ТМЛР в качестве повторного вмешательства.

ТМЛР проводится при торакотомии как самостоятельный метод лечения, так и симультанно с одним из вышеперечисленным вариантом. Метод ТМЛР достаточно эффективен, он снижает ФК стенокардии, улучшает перфузию, функцию и метаболизм миокарда ЛЖ. Улучшение перфузии отмечается только в зонах лазерного воздействия при наличии жизнеспособного миокарда. Результаты 5-летнего наблюдения 80 больных с тяжелой рефрактерной стенокардией показали, что у 20 % после ТМЛР

с использованием высоко энергетического CO_2-лазера стенокардия полностью исчезает, а приблизительно у 90 % больных ИБС ФК уменьшается на один. Однако связанная с операцией смертность составляет 5–10 %, а дополнительная смертность в течении 1 года — 10 % [51, 72].

В НЦССХ им. А. Н, Бакулева РАМН под руководством академика Л. А. Бокерия проводится исследование ТМЛР в сочетании с трансплантацией аутологичных МСК костного мозга, выполненных в качестве повторного вмешательства у больных ИБС с поражением дистального русла [12, 67]. Выявлено достоверное снижение ФК стенокардии, среднесуточной потребности в нитроглицерине и улучшение толерантности к физической нагрузке и качества жизни. Сочетание ТМЛР с трансплантацией МСК костного мозга у повторных больных с диффузным поражением коронарных артерий представляет вполне жизнеспособной альтернативой в группе пациентов, у которых выполнение повторного АКШ сопровождается высокой летальностью и высокой частотой осложнений. Сказанное не может быть отнесено к больным с критической массой рубцово-измененного миокарда без достоверных зон гибернированного миокарда [47, 72, 76, 77].

Необходимо отметить, что ТМЛР также выполняется у больных предварительно планирующихся на аорто-коронарное шунтирование [10], а также в комплексе с повторным АКШ, как дополнительный метод реваскуляризации миокарда [67].

В Новосибирском научно-исследовательском институте патологии кровообращения им. акад. Е. Н. Мешалкина, РФ на 35 пациентах проведено исследование определение эффективности применения АКШ пораженных артерией с имплантацией стволовых клеток в трансмиокардиальные лазерные каналы. Выявлена значимая корреляция между количеством имплантированных клеток и динамикой перфузии миокарда. Метод ТМЛР в сочетании с имплантацией аутологичных СК улучшает как общую перфузию, так и перфузию в месте воздействия непрямой реваскуляризации; вызывает уменьшение объемных показателей левого желудочка и увеличение емкости капиллярного русла миокарда. Улучшения сократительной функции левого желудочка тем не менее отмечено не было [86].

1.4. Клеточная кардиомиопластика

Существует большое количество работ посвященных ремускуляризации инфаркта путем «обворачивания» сердца широчайшей мышцей спины. Изначально исследователи утверждали, что репозиционированная мышца должна улучшать функцию сердца путем прямой генерации сокращений через электрическую стимуляцию, однако позже были получены негативные результаты [262]. Предполагается, что клеточные трансплантата могут вызывать аналогичный эффект через изменения пассивных механических возможностей инфаркта. После инфаркта развивается ремоделирование желудочков, которые характеризуются желудочковой дилатацией, истончением стенок, повышением объема камер сердца и гипертрофией оставшегося миокарда [295, 296].

1.4.1. Локальная терапия цитокинами

Одним из примеров проведения локальной терапии цитокинами, является сочетанное использование инсулин подобного фактора роста и фактора роста гепатоцитов, которые стимулируют дифференцировку эндогенных стволовых клеток сердца в кардиомиоциты. Данная терапия позволяет улучшить сократительную функцию миокарда у животных с инфарктом миокарда [132]. Кардиопротективным и антиапоптотическим действием обладает эритропоэтин, к которому чувствительны кардиомиоциты, эндотелиальные клетки и фибробласты сердца. Эритропоэтин стимулирует мобилизацию выхода эндотелиальных предшественников и активирует ангиогенную активность эндотелиальных клеток миокарда. В ряде исследований доказано снижение уровня апоптоза кардиомиоцитов при ИМ, а также уменьшение размера зоны инфаркта и улучшение сердечной функции [94, 190].

В работах Бокерия Л. А. и др. [14] анализу подвергнуты результаты 80 операций, выполненных с июля 2004 года по август 2007 года в НЦССХ им. А. Н. Бакулева. Больным выполнена ТМЛР с введением ангиогенного фактора α-ECGF. Были исследованы различные режимы и дозы введения фактора. В результате исследования авторы пришли к мнению, что использование α-ECGF в качестве одного болюса с целью индукции ангиогенеза у больных с хронической ИБС в длительные сроки не эффективно. Ангиоген-

ный фактор α-ECGF при применении в течении первого месяца вызывает выраженный ангиогенез, достоверно определяющийся по показателям перфузии. Для закрепления ангиогенного эффекта α-ECGF необходимо длительное многократное введение препарата. Комбинированное использование α-ECGF и ТМЛР позволяет улучшить перфузию миокарда в сроки, когда эффект собственно ТМЛР еще не проявляется. Поэтому такое комбинированное лечение эффективно в критические для ТМЛР сроки.

В ряде работ продемонстрировано на модели инфаркта миокарда в эксперименте, что цитокиново-индуцированная репарация сердца позволяет уменьшить смертность на 68 %, размеры инфаркта на 40 %, увеличить количество новых миоцитов с сосудами [284].

1.4.2. Мобилизация эндогенных стволовых клеток

Возможность улучшения у больных ИМ перфузии сердечной мышцы и ее систолической функции с помощью трансплантации СККМ была продемонстрирована в ряде исследованиях. Однако «инвазивность процедуры забора клеток костного мозга ограничивает клиническое применение этого метода» [177]. Для проведения кардиомиопластики можно также использовать Г-КСФ, мобилизующий выход резидентных клеток костного мозга, которые достигают поврежденный миокард и восстанавливают его [274]. Изначально Г-КСФ применялся для стимуляции клеток-предшественников нейтрофильного и других ростков костного мозга при проведении химиотерапии и др.

В исследование REVIVAL-2, включены 104 пациента с острым ИМ, у которых в первые 12 часов ИМ выполнено чрезкожное коронарное вмешательство, приведшее к восстановлению кровотока. Введение G-CSF (в дозе 10 мкг/кг/сут подкожно) или плацебо осуществляли в течении 5 дней. Через 6 месяцев больных подвергали обследованию с использованием магнитнорезонансной и однофотонной эмиссионной позитронной томографии, а также коронарной ангиографии. Первичной конечной точкой испытания было уменьшение площади ИМ, вторичной конечной точкой было изменение ФВ ЛЖ через 6 месяцев. В исследовании не было выявлено влияния терапии на величину размера ИМ и ФВ ЛЖ. Кроме того, в отличие от предшествующих исследований, введение Г-КСФ не

сопровождалось увеличением ангиографического стеноза, по сравнению с плацебо (35.2 % и 30.9 %). Наиболее частыми побочными явлениями были слабо или умерено выраженные оссалгии и мышечный дискомфорт.

По мнению Dietland Zohlnhofer и его коллег (Технический Университет, Мюнхен, Германия), результатам REVIVAL-2 можно доверять, из-за большого размера выборки, длительного срока наблюдения, надежных методов оценки функции ЛЖ и размеров зоны ИМ [341]. Такие же данные были получены при исследовании STEMMI, при том же дизайне, а в исследовании FIRSTLINE-AMI с аналогичным дизайном сопровождалась более выраженным увеличением региональной и общей сократительной функции, диастолической толщины стенки в области инфаркта и предотвращала неблагоприятное ремоделирование ЛЖ [213, 280].

В исследование MAGIC вошло 27 больных [177] с ИМ, которые подверглись процедуре стентирования инфаркт-причинной коронарной артерии. Больные были разделены на 3 группы: 1 группа — проводили инфузию СК периферической крови клеток, 2 группа — введение Г-КСФ и 3 группа — контрольная. СК периферической крови у больных группы инфузии клеток забирали в день ЧКВ с помощью системы спектрального афереза COBE. Клетки вводили через баллонный катетер для ангиопластики. До внутрикоронарной инфузии непосредственно в сосуд вводили никорандил и нитроглицерин. С помощью внутривенного струйного введения гепарина добивались, чтобы активированное время свертывания крови превысило 250 сек. Для мобилизации СК периферической крови производились ежедневные инъекции Г-КСФ (10 мкг/кг) в течении 4 дней до ЧКВ. Терапия Г-КСФ с внутрикоронарной инфузией СК периферической крови сопровождалось улучшением функции сердца и способствовала ангиогенезу у больных ИМ. Однако увеличение частоты рестеноза потребовало остановить исследование.

Японскими исследователями выяснено, что локальное введение Г-КСФ в ишемизированную скелетную мышцу улучшает ее кровоснабжение и не приводит к значительному системному лейкоцитозу в отличие от системного введения фактора. Эффект Г-КСФ связан с непосредственной стимуляцией пролиферации эндотелиальных клеток и новообразование микрососудов, как по-

казали исследования in vitro на культуре эндотелиальных клеток пуповинной вены [358]. Датскими учеными было проведено два рандомизированных исследований, в которых пациентам с острым инфарктом миокарда наряду со стандартным лечением подкожно вводили Г-КСФ и показали неэффективность данного метода [342].

В ряде исследований было продемонстрировано увеличение содержания Г-КСФ в сыворотке пациентов в ранний постинфарктный период, приводящее к мобилизации выхода $CD34^+$ клеток с высоким уровнем экспрессии CXCR4 — рецептора kSDF-1 (stromal cell derived factor) [185]. Явления гипоксии в зоне инфаркта приводит к резкому увеличению уровня экспрессии HIF-1 (hypoxia inducible factor) [343], который является транскрипционным фактором для гена sdf-1 и активирует его экспрессию в кардиомиоцитах, клетках эндотелия сосудов и фибробластах [159, 294]. Высокий уровень SDF-1 является индикатором пораженной области миокарда и активно участвует в привлечении стволовых клеток в данный участок, т. е. является локальным медиатором приживления. Интересен тот факт, что повышение SDF в сыворотке очень кратковременно и наблюдается лишь в первые 12–24 часов после ИМ [237, 348].

Penn M. S. et al. [319] в экспериментах на крысах с индуцированной кардиомиопатией показали, что отсроченное введение Г-КСФ не влияет на приживление клеток в миокарде и не приводит к улучшению сократительной функции левого желудочка, несмотря на увеличение количества циркулирующих в периферической крови $c\text{-}kit^+$ клеток в 25 раз.

Kocher A. A. et al. продемонстрировали, что применение Г-КСФ у крыс с ИМ, позволяет уменьшить число апоптотических клеток и размер инфаркта миокарда с 36 до 12 % [284].

Minatoguchi S. et al. [100] показал в эксперименте, что мобилизованные Г-КСФ лейкоциты играют важную роль в репарации миокарда и регуляции фагоцитоза в зоне некроза, пролиферацию фибробластов и ангиогенез. Кроме того, установлено, что Г-КСФ играет важную роль в остановке апоптоза кардиомиоцитов. Помимо прочего было доказано, что Г-КСФ ускоряет эндотелизацию, что при стентировании приводит к повышению числа рестенозов [100, 378, 382]. При применении Г-КСФ у нестентированных больных происходит реэндотелиализация и рассасывание атеросклеротических бляшек сосудов [176].

На экспериментальной модели крыс A. A. Kocher et al. [284] показали, что при введении Г-КСФ и фактора стволовых клеток за 5 дней до и через 3 дня после экспериментального ИМ в кровотоке определялось большое количество клеток Lin-/c-kit+, включая МСК (примерно в 250 раз больше обычной концентрации). При формировании нового миокарда зона инфаркта сокращалась с 64 до 39 %, а ФВ ЛЖ увеличивалась на 14 %.

Elisabeth Deindl et al. [206] продемонстрировала в опыте на мышах эффективность применения Г-КСФ, положительные результаты были получены не только в ранние сроки после моделирования ИМ, но и в поздние, которые заключались в улучшение функционального состояния сердца и морфологических сдвигах, в уменьшении площади фиброза и коллагена по сравнению с группой контроля.

В работах российских ученых Козлова В. А. и др. (2003), отмечено, что применение Г-КСФ и ИЛ-2 при ИМ у человека, приводит к мобилизации CD34+CD38- из костного мозга, последующую их дифференцировку и пролиферацию. При лечении 32 пациентов с ИМ по данной методике получен гораздо лучший эффект, в виде увеличения ФВ ЛЖ и уменьшения зоны инфаркта, по сравнению с контрольной группой, получавшей только стандартное лечение ИМ [38].

Интересен факт, что применение специфического фактора роста блокирует выработку несвязанных с ним видов СК, т. е. **прямая негативная связь**, что в частности, объясняет причину неудач попыток использовать G-CSF для стимуляции восстановления тканей [246].

Однако, в противоположность этому мнению, в ряде исследований доказаны явные преимущества применения Г-КСФ при ИМ:

— мобилизация СК костного мозга — неинвазивная методика, заключающаяся в подкожном введении Г-КСФ;

— аспирация костного мозга и приготовление культуры не требуется (потенциальная сложность при остром процессе);

— избегается повторная катетеризация с интракоронарным введением;

— применение Г-КСФ можно начинать в острую фазу ИМ, и эффект наступает моментально [272, 273];

— высокая концентрация СК наблюдается на протяжении 1 недели [317], т. е. в течении всей фазы формирования некроза.

В заключении хотелось бы провести обобщение клинических исследований применения Г-КСФ при STEMI (ST-elevantion myocardial infarction). Большинство клинических исследований применения Г-КСФ при остром ИМ после PCI (percutaneous coronary intervention) продемонстрировали положительное влияние данного вида терапии на функцию левого желудочка [178, 305]. Kuethe et al. [377] пролечили 14 пациентов Г-КСФ через 2 дня после первичного PCI, в контрольную группу вошли 9 пациентов, которые отказались от данного введения препарата. При дальнейшем исследовании не было отмечено различий в каких-либо показателях. Наиболее показательный результат был продемонстрирован на 20 пациентах, которые получали только монотерапию Г-КСФ в течении 1,5 суток после STEMI. Эти не существенные исследования в общем не подтвердили положительное влияние на фракцию выброса [377]. В более массивных исследованиях, таких как FIRSTLINE-AMI, где отслеживались ряд показателей работы сердца у 50 пациентов через 6 месяцев [304] и через 1 год у 30 пациентов [305]. В исследуемой группе Г-КСФ вводили через 90 минут после PCI лечении STEMI. В контрольной группе не вводили препарат и также отслеживали отдаленные результаты. В группе пациентов с применением Г-КСФ отмечалось улучшение систолической функции сердца и уменьшение зоны инфаркта, в группе контроля отмечалось уменьшение фракции выброса и истончение миокарда в зоне инфаркта. В других исследованиях с применением МРТ и ангиографических методов исследования, не было отмечено каких либо различий после применения Г-КСФ по сравнению с ЧКВ [156, 310, 341].

1.4.3. Трансплантация стволовых клеток

В большом количестве работ использовали различные типы клеток (рис. 1.1), включающие костномозговые гемопоэтические клетки [158, 171, 212], эндотелиальные клетки-предшественники [284], мезенхимальные стволовые клетки [224, 385, 386], резидентные кардиальные клетки-предшественники [131] и эмбриональные стволовые клетки [103, 149, 166, 207, 220, 221, 340].

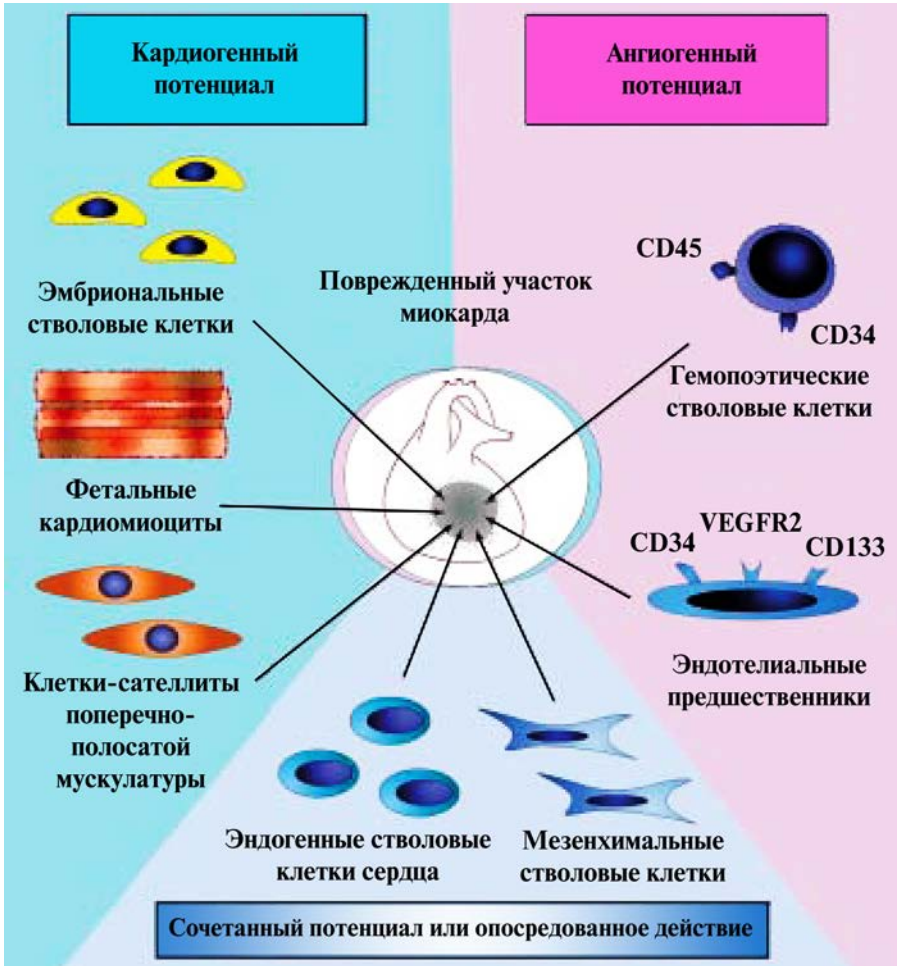


Рис. 1.1. Клетки, трансплантируемые при инфаркте миокарда, и их лечебный потенциал (Куртова А. В., Зуева Е. Е., Немко А. С., 2006 [35])

Вышеперечисленные клетки тестировалны на доклинических моделях повреждения миокарда и было продемонстрировано, что большинство из них приводили к функциональному улучшению работы сердца в ближайшее время после трансплантации. Помимо прочего есть публикации, подтверждающие об эффективности применения гладкомышечных клеток [239, 331] и фибробластов [145, 157] при экспериментальном инфаркте миокарда.

1.4.3.1. Трансплантация эмбриональных стволовых клеток (ЭСК)

ЭСК получают из внутренней клеточной массы (эмбриобласта) донорских эмбрионов на стадии ранней бластоцисты [103, 175, 227, 325, 330]. ЭСК плюрипотентны и обладают высоким пролиферативным потенциалом. ЭСК могут дифференцироваться в любой вид ткани организма (более 300 типов тканей), включая герминативную линию (ткани женской и мужской половой системы) [23, 135, 158, 171, 349, 368]. В отношении тканей сердца из ЭСК, помимо кардиомиоцитов с фенотипом предсердий или желудочков, можно получить клетки-водители ритма и клетки Пуркинье [209, 221, 222]. Ряд работ Field M. Et al. и других исследователей, показали, что мышиные КМЦ способны формировать стабильный интракардиальный имплантат [207] и обеспечивает функциональную активность миокарда при ИМ у мышей [336, 340, 367]. В 1995 году J. A. Thomson et al. [182] модифицировал технологию выделения мышиных клеток, получил ЭСК приматов, а в 1998 году — линию клеток человека. На территории бывших стран СССР ЭСК человека были получены в 2003 г. В Институте биологии гена РАН и в Институте цитологии РАН [13]. При строгом соблюдении правил культивирования ЭСК могут осуществлять неограниченное количество митотических делений и сохранять способность дифференцироваться в любой вид соматической клетки, в том числе и в кардиомиоцит [221]. Кардиомиоциты, происходящие из человеческих ЭСК исследовали in vivo. Первые работы показали, что КМЦ, которые происходят из человеческих ЭСК, способны формировать новый миокард после трансплантации у неинфарцированный миокард у экспериментальных животных [181, 198], причем происходит слияние неомиокарда с миокардом хозяина и служит пейсмеркером при определенных обстоятельствах [181, 204]. Следует отметить, что существует одна большая разница между человеческими ЭСК и КМЦ других млекопитающих, которая заключается в том, что КМЦ человека пролиферируют со значительной скоростью (20–30 % клеток поглощают аналог тимидина за ночь в момент инкубации) [111, 261]. На животных (свиньях) моделировали блокады проведения, после трансплантации ЭСК, они электромеханически интегрировали в миокард и проявляли активность водителя ритма [165, 181, 333]. В исследованиях Min J. Y. et al. [366] было продемонстрировано успешное созревание клеток, приживление трансплантата и восстановление функции миокарда после интрамиокардиального введения ЭСК крысам. Им было доказано способность ЭСК стимулировать продукцию факторов роста эндотелия сосудов. Существует ряд данных подтверждающих возникновение аритмий после трансплантации мышиных ЭСК [344]. Несмотря на ряд преимуществ применении ЭСК, имеются множество трудностей их использования:

— несовершенство законодательного регулирования в области использования ЭСК [256];

— низкий по сравнению с экспериментальными животными уровень дифференцировки человеческих ЭСК в кардиомиоциты [41, 256];

— культивирование ЭСК невозможно без дополнительных ростковых факторов и фидерного (поддерживающего) клеточного слоя, при отсутствии этих условий происходит спонтанная дифференцировка клеток в различных направлениях [109];

— необходимость проведения иммуносупрессивной терапии, т. к. трансплантация ЭСК является аллогенной [98], хотя неиммуногенный трансплантат можно получить путем клонирования с использованием нативных кардиомиоцитов [133];

— повышение гибели клеток здорового миокарда при трансплантации кардиомиоцитов, полученных из ЭСК ставит под вопрос эффективность подобных трансплантаций [137];

— возможность формирования тератом может быть связано с отсутствием факторов-индукторов кардиогенеза в сердце взрослого организма [148, 183, 195, 197].

В Chambers I. (2004), было продемонстрировано, что введение линий человеческих ЭСК в скелетную мышцу или семенник ведет к образованию тератомы. Тератома состоит из эндодермы, мезодермы и эктодермы, сформированных зрелыми клетками. В противоположность этого тератокарциномы содержат недифференцированные и стволовые клетки [148]. На данный момент времени не существует окончательного доказательства склонности ЭСК к озлокачествлению, однако настораживает наличие маркеров Oct4 и Nanog у ЭСК и у клеток эмбриональной карциномы [303]. Таким образом, несмотря на то, что терапевтическое применение ЭСК

приводит к функциональному улучшению миокарда, тем не менее сопряжено с риском развития существенных побочных эффектов. Тератомы относят к доброкачественным новообразованиям, однако локализация в сердце дает эффект биологической злокачественности. Особенно важно, что при внутривенном введении ЭСК попадают и распространяются на все органы, создавая тем самым риск неоплазиии [354]. Необходимо отметить, что предварительная дифференцировка ЭСК in vitro перед трансплантацией в миокард теоретически должна уменьшить риск развития опухоли [259, 365]. Предполагается, что определенная степень комитированности в направлении кардиомиоцитов способствует встраиванию трансплантируемых клеток в миокард и снижает вероятность дифференцировки ЭСК в нежелательном направлении, уменьшая тем самым риск формирования тератомы [108]. ЭСК способны к спонтанному слиянию с соматическими клетками и, как следствие, к формированию химерных клеток со свойствами стволовых [302].

Еще одной проблемой ограниченного применения ЭСК, является проблема иммунного отторжения аллогенного трансплантата [174]. Хотя на ранних стадиях развития ЭСК не распознаются иммунной системой реципиента, тем не менее на их поверхности обнаруживаются экспрессия антигенов HLA 1 класса, причем по мере созревания клеток уровень экспрессии возрастает [223].

1.4.3.2. Трансплантация кардиомиоцитов

Основополагающим фактором развития сердечной недостаточности является утрата МКЦ, поэтому исследователи изначально попытались пересаживать КМЦ в инфарцированный миокард [239]. Следует отметить, что трансплантация КМЦ безусловно улучшает насосную функцию сердца, предупреждает истончение и дилатацию левого желудочка [84], однако значительное количество клеток погибает в зоне ишемии [43, 44], а часть из них окружена рубцовой тканью, что не позволяет участвовать в систоле сердца, т. е. являются функционально непригодными. Гораздо лучшие результаты получены при использовании фетальных КМЦ, но применение их диктует назначение иммуносупрессивной терапии и забор материала должен проводиться у плода, что не приемлемо в клинических условиях [64]. Первая успешная трансплантация фетальных

кардиомиоцитов была осуществлена в 1994 году коллективом исследователей под руководством L. J. Fiekd [199]. Было продемонстрировано, что фетальные кардиомиоциты формируют стабильные трансплантаты, когда их имплантируют в нормальный миокард мыши и собаки, при этом между донорскими клетками и клетками «хозяина» образуются вставочные диски [114, 199, 212, 317, 337]. При этом отмечается достоверное уменьшение рубца [287], предупреждение истончения постинфарктного рубца и дилатацию левого желудочка [239], улучшается насосная функция сердца [121, 199, 239, 287, 337], улучшается перфузия миокарда за счет неоваскулогенеза [116]. Причем неоваскулогенез осуществляется двумя путями: первый — фетальные кардиомиоциты сами превращаются в клетки сосудов; второй — фетальные кардиомиоциты синтезируют VEGF (vascular endothelial grow factor), который сам по себе является мощным стимулятором неоваскулогенеза [258]. Встречается ряд работ посвященных применению различных фракций VEGF при критической ишемии нижней конечности и ИБС [54, 57, 60]. К сожалению, помимо вышеописанных проблем связанных с фетальными КМЦ, многие из них попадают в зону рубца и не могут сокращаться синхронно с остальным миокардом [239]. Однако особенностью фетальных кардиомиоцитов, трансплантируемых в зону инфаркта, является очень низкая выживаемость. Методами количественного ПЦР анализа в опытах на крысах была выявлена значительная потеря донорских клеток в области поражения после трансплантации. Уже через час после интрамиокардиального введения фетальных кардиомиоцитов только 57 % от общего количества трансплантируемых клеток были обнаружены в зоне повреждения, через сутки — 24 %, а через 12 недель 15 %, что подтверждает массовую гибель трансплантата [351]. В ряде работ Li R. K. et al. (1996–1997) было продемонстрировано, что культура фетальных и новорожденных крыс КМЦ, in vitro способна расти, формируя спонтанно сокращающуюся сердечно-подобную ткань, но при пересадке в криоповрежденный миокард через 24 недели отмечается возникновение признаков хронического отторжения трансплантата. Причем это отторжение было более выражено при трансплантации культуры КМЦ новорожденных крыс, по сравнению с фетальными [135, 235, 283]. В исследованиях Sakai et al. [322] доказана возможность при-

живления фетальных КМЦ в зоне инфаркта и под кожей. В зоне трансплантации они стимулировали ангиогенез, но к сожалению не были обнаружены эндотелиоциты в зоне трансплантата. Интересен факт, что трансплантат под кожей сокращался, однако участвуют ли они в систоле сердца осталось неизвестным. В работах J. Muller-Ehmsen et al. [309] на модели синенных крыс продемонстрирована способность неонатальных кардиомиоцитов колонизировать зону ИМ и способность животных выживать в течении 6 месяцев после лигирования коронарной артерии. У животных увеличивалась фракция выброса ЛЖ, уменьшилось парадоксальное систолическое выпячивание инфарктной зоны. T. Reffelmann et al. [370] были подтверждены эти данные: через 4 недели после трансплантации выращенных неонатальных кардиомиоцитов в зону инфаркта у крыс было отмечено улучшение регионального кровоснабжения миокарда, снижение систолического и диастолического объемов ЛЖ, утолщение инфарктной зоны с уменьшением массы инфарктного участка. M. Yao et al. [96] изучали влияние введения фетальных кардиомиоцитов на ремоделирование ЛЖ у крыс при длительном наблюдении. Исследователи вводили фетальные кардиомиоциты в область ИМ недельной давности и после наблюдения в течение 10 месяцев отметили увеличение толщины инфарктной зоны, уменьшение дилатации ЛЖ и увеличение ФВ ЛЖ. При введении данных клеток в перикард у взрослых сингенных крыс было выявлено, что клетки способны не только приживаться в поврежденном участке миокарда, но и экспрессировать кардиоспецифические белки — альфа-саркомерный актин и коннексин-43.

Rubart M. et al. [298, 299] в прижизненной визуализации предоставили данные об электромеханической интеграции КМЦ трансплантатов в сердце без ИМ. Используя мультифотонную микроскопию, эти авторы продемонстрировали синхронные переходы кальция в близкорасположенные трансплантированные фетальные КМЦ хозяина, что указывало на то, что пересаженные клетки интегрировались и были способны к необходимой систолической активации.

В исследовании Zimmermann W. H. et al. [187], представлены первые прямые доказательства электромеханической интеграции трансплантированных КМЦ в сердце с ИМ. Исследователи сконструировали сердечную ткань путем размещения неонатальных КМЦ в коллагеновом геле и расположили конструкцию в 3D. Далее они имплантировали конструкцию на эпикардиальную поверхность инфакртированого сердца и изучили их через 4 недели. МРТ показало уменьшение желудочковой дилатации и улучшение систолической утолщение стенки. При электрическом картировании было показано интеграция модели с миокардом.

1.4.3.3. Трансплантация миобластов скелетных мышц

В литературе встречается ряд работ, посвященных применению миобластов скелетных мышц, как наиболее перспективных популяций клеток, которые могут использоваться для клеточной кардиомиопластики [141, 152, 278, 329]. Несомненно, миоциты обладают высоким пролиферативным потенциалом устойчивостью к ишемии, способны самостоятельно сокращаться. Однако миоциты являются дифференцированными и не обладают выраженной пролиферативной активностью, поэтому они не могут использоваться в качестве материала для восстановления количества КМЦ; к тому же они обладают собственным ритмом сокращения, что не позволяет синхронизировать их с работой кардиомиоцитов сердца реципиента. Следует отметить, несмотря на то, что миобласты являются наиболее изученным пластическим материалом при ИМ [143, 152, 164, 312], несут фактор аутологичной трансплантации, тем не менее они не способны дифференцироваться в кардиомиоциты и остаются комитироваными линией скелетной мускулатуры (кроме случаев слияния на границе имплантат-хозяин) [192, 315]. Соответственно в отличие от КМЦ, которые формируют электрический синцитий через межщелевые соединения, зрелые клетки скелетной мускулатуры электрически изолированы одна от другой. Соответственно имплантанта не имеют белков адгезии и щелевидных соединений, которые приводят к межклеточным коммуникациям в миокарде [180], и различными исследователями показано, что они не сокращаются синхронно с клетками хозяина [278, 334]. Таким образом, в лучшем случае они могут оказать благоприятный эффект ремоделирования миокарда за счет предполагаемого паракринного эффекта [43, 44, 64, 152]. В ряде работ встречаются сообщения об использовании в качестве пластического материала миобластов [320]. Им-

плантация в инфарцированный миокард аутологичных миобластов приводит к улучшению систолической и диастолической функции левого желудочка, одновременно уменьшается постинфарктная дилатация, однако данные исследований разноречивы и не позволяют однозначно судить о том, дифференцируются ли миобласты в миокарде реципиента в КМЦ и образуются ли при этом контакты между КМЦ реципиента и миобластами донора. Кроме того, миобласты из-за крупных размеров потенциально эмболоопасны [43, 64] и в ряде случаев вызывают не купируемые желудочковые тахикардии, что потребовало имплантировать дефибрилляторы [34, 117], а у некоторых пациентов приступы тахикардии [161, 357]. Для предотвращения аритмогенного эффекта после трансплантации миобластов в настоящее время разрабатывают подход, основанный на генетической модификации клеток-сателлитов с целью экспрессии в них коннексина-43 [163]. Murry C. E. et al. [329] при трансплантации миобластов в криоповрежденный миокард крыс установили, что через 3 месяца пересаженные миобласты пролиферируют и на 3 сутки формируют многоядерные мышечные трубочки, которые затем дифференцируются в фенотип зрелых быстрых мышечных волокон; в новообразованной ткани в дальнейшем возникают признаки медленных мышечных волокон; новообразованная мышца может формировать спутниковые стволовые клетки; ex vivo можно стимуляцией вызывать сокращения вновь образованных волокон.

В противовес вышеописанным работам Murry C. E. et al. [329] продемонстрировали, что ядра в центре мышечных клеток не выявлены, электронная микроскопия не подтвердила наличие вставочных дисков, мышцы были изолированы от миокарда рубцовой тканью. Пересаженные клетки экспрессировали на себе белки, которые специфичны только для скелетных мышц и не вырабатывали тяжелые цепи миозина, характерные для кардиомиоцитов. Данный факт был также подтвержден в более поздних работах Reinecke et al. [180, 315], при трансплантации взрослых и неонатальных скелетных миобластов в миокарде реципиентов не было обнаружено клеток с сердечным фенотипом: трансплантаты скелетной мышцы формировали многоядерные миоциты без вставочных дисков, экспрессировали изоформы миозина, специфические для скелетной мышцы, не экспрессировали сердечный α-миозин и белков сер-

дечных межклеточных контактов, имели сократительные свойства, специфические для скелетных мышц.

Основываясь на всем вышесказанном, мы видим, что до сих пор не известно возможна ли дифференцировка скелетных миобластов в кардиомиоциты или нет, образуются четкие контакты между этими двумя разными видами миозитов [263, 290].

В изученной литературе отсутствует однозначный ответ на вопрос, какой же тип клеток лучше использовать для более эффективного восстановления функции миокарда после острого инфаркта. Вместе с тем, очевидно, что предпочтение должно отдаваться аутологичному материалу, методы доставки клеток должны быть минимально инвазивными и в то же время обеспечивающими их проникновение и выживание в миокарде реципиента.

В НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН в 2004 году начато клиническое изучение применения скелетных миобластов при ХСН у пациентов в виде монотерапии и комбинированных методов [58].

В 2007 году американская компания Bioheart Inc. [95] начала набор пациентов для оценки эффективности и безопасности применения аутологичных скелетных миобластов в качестве клеточной терапии у больных с ХСН. Критериями включения являются наличие у больных ХСН II-III ФК по классификации NYHA с ФВ ЛЖ 20–40 %. Всем пациентам будут имплантированы кардиовертеры-дефибрилляторы. Результаты этого исследования пока также не опубликованы.

Исследование CAUSMIC (Catheter-based Delivery of Autologous Skelet Myoblasts for Ischemic Cardiomyopathy) — проводилась оценка возможности и эффективности интрамиокардиальной доставки аутологичных скелетных миобластов с помощью системы NOGA XP [140]. Скелетные миобласты были получены с помощью биопсии мышцы бедра пациента. При контрольном картировании после манипуляции через 6 и 12 месяцев было отмечено — жизнеспособность и улучшение перфузии миокарда не только в области инъекции, но и в окружающих тканях.

1.4.3.4. Трансплантация эндотелиальных клеток

Основная часть эндотелиальных клеток базируются в костном мозге, однако их можно получить из мезенхимальных стволовых

клеток, SP-популяции (side population) — популяция стволовых клеток, базирующихся в поперечно-полосатых мышцах, эндогенных стволовых клеток сердца и клеток — предшественников нейронов [376]. Из мононуклеарной фракции периферической крови эндотелиальные предшественники можно выделить по одновременной экспрессии рецептора — 2 к VEGF, известного как fetal liver kinase, CD34 и CD 133. Эти клетки способны дифференцироваться в эндотелий сосудов и участвуют в неоваскуляризации, а также снижают уровень апоптоза в гипертрофированных миоцитах периинфарктной области [130]. Однако у людей, страдающих сердечными заболеваниями, способность эндотелиальных клеток к трансдифференцировке значительно снижена [339]. Прогениторные эндотелиальные клетки (ПЭК) in vitro могут дифференцироваться в эндотелиальные клетки и КМЦ, а при введении в зону инфаркта у экспериментальных животных стимулировать неоваскуляризацию и инкорпорирование в сосуды [172, 186, 375].

В 2005 году Katritsis D. G. et al. [249] применили интракоронарную трансплантацию аутологичных МСК и ЭПК в лечении 11 пациентов с постинфарктным кардиосклерозом. Через 6 месяцев у 5 пациентов отмечался положительный эффект клеточной кардиомиопластики.

В работах Какучая Т. Т. и соавт., на основании результатов клинико-инструментальных методов исследования доказано, что применение костно-мозговых эндотелиальных клеток предшественников CD 133+ в средней дозе $2*10^6$ являются осуществимым и безопасным в лечении пациентов с хронической сердечной недостаточностью ишемического и не ишемического генеза [20, 34].

Исследование ACT34-CMI (autologous cellular therapy CD34-chronic myocardial ischemia trial) выполняемое в 2007 году, изучало эффективность, устойчивость и безопасность применения CD34+ периферической крови с целью улучшения клинической симптоматики больных с ИКМП, получавших максимальные дозы современной медикаментозной терапии, у которых невозможно выполнение реваскуляризирующих процедур [93]. Исследование заключалось в подкожном введении Г-КСФ для мобилизации клеток CD34+ в кровоток ЭПК. Затем осуществляли забор крови, отделение стволовых клеток по стандартной методике, электро-

механическое картирование зоны ишемии с помощью системы и интрамиокардиальном введении культуры клеток. Длительность исследования 12 месяцев, но окончательные результаты пока не опубликованы.

1.4.3.5. Трансплантация эндогенных стволовых клеток сердца

До недавнего времени сердце относилось к постмитотическим органам не способного к регенерации. Однако, несколько групп исследователей недавно выделили популяцию желудочковых миоцитов, способных к делению [212, 281]. Отмечено, что увеличение количества миоцитов при гипертрофии сердца после инфаркта связано именно с пролиферацией эндогенных стволовых клеток [240]. Эндогенные стволовые клетки сердца являются мультипотентными и дают начало клеткам эндотелия, гладким миоцитам и функционирующим кардиомиоцитам, имеют фенотип c-kit$^+$ у всех млекопитающих. В отличии от гемопоэтических стволовых клеток они не экспрессируют ни панлейкоцитарный маркер CD 45, ни маркер CD 34. При трансплантации меченых эндогенных стволовых клеток сердца мышам с индуцированной ишемией было выявлено, что эти клетки заселяют края поврежденной области и претерпевают дифференцировку в кардиомиоциты [131].

Однако собственных эндогенных стволовых клеток недостаточно для полного восстановления мышечной массы и улучшения функции левого желудочка, т. к. сами по себе эндогенные стволовые клетки не способны реагировать на острый инфаркт, им необходимы дополнительные стимулы. Другим возможным объяснением может быть их собственное старение и неспособность к индукции пролиферации в достаточном объеме у пожилых пациентов [133].

Следует отметить, что не существует еще технологий получения этих клеток, открыт вопрос об их культивировании. Необходимо также учитывать, что для выживания трансплантированных кардиомиоцитов в области инфаркта васкуляризация данного участка должна быть больше, чем этого требует миобласты. Таким образом, эффект от трансплантации данных клеток может быть достигнут только при совместной неовакуляризации и ангиогенеза.

1.4.3.6. Трансплантация нефракционированных клеток костного мозга

Из костного мозга выделяют 3 вида популяций СК: ГСК, ЭПК и МСК. ГСК являются родоначальником всех линий форменных элементов крови. ЭПК дифференцируются в эндотелиальные клетки сосудов. МСК выделяются из костного мозга и обладают наибольшим потенциалом к дифференцировке в различные линии соматических клеток среди постнатальных стволовых клеток [8, 196].

Для выделения СК данных видов используют два способа. Первый, заключается в трепанобиопсии костного мозга, затем мозг отмывают от мегакариоцитов и эритробластов, обезжиривают, а затем с помощью проточной цитофлоуметрии освобождают материал от гранулоцитарного ростка и определяют количество МСК в 1 мл полученной суспензии. Такой материал получил название «мононуклеарная фракция костного мозга», в которой на 100 000 мононуклеаров содержится 1 истинная МСК, а также и ЭПК. Кроме того в суспензии содержится большое количество биологических веществ, факторов роста и дифференцировки. Выделение МСК сопровождается длительным и дорогостоящим культивированием мононуклеарной фракции в специальных условиях [345].

Под нефракционированными клетками костного мозга (НККМ), подразумевают все ядросодержащие клетки (главным образом мононуклеарные) после удаления эритроцитов и тромбоцитов. Таким образом под гетерогенной клеточной популяцией костномозговых клеток следует понимать, что данный препарат состоит преимущественно из ГСК с той или иной примесью МСК и ЭСК [123, 125, 299, 326]. Обе эти популяции клеток и используются для восстановления поврежденных органов [210, 252]. Основными преимуществами этого источника клеток являются: 1). костный мозг содержит самое большое количество различных фракций стволовых и прогениторных клеток взрослого населения, которые суммарно присутствуют в мононуклеарной фракции костного мозга; 2). отсутствие этических проблем при заборе аутологичного материала; 3). по нормативно-правовой базе нет необходимости получать дополнительные разрешения на использование данного вида трансплантации; 4). сравнительно несложные технологии получения и процессинга, невысокие финансовые затраты.

Исследованиями Ferrari G. et al. [277] подтверждено, что клетки костного мозга мышей введенные в скелетную мышцу, могут участвовать в процессе ее регенерации и формировать полностью дифференцированные мышечные волокна. Makino S. Et al. [136] при индуцировании клеток стромы костного мозга мышей 5-азацитидином получили дифференцировку клеток в КМЦ. Нами в ИНВХ им. В. К. Гусака АМН Украины, также удалось получить сокращающуюся культуру кардиомиоцитов, полученную в результате индукции мезенхимальных стволовых клеток 5-азацитидином, полученных из костного мозга трубчатых костей крыс [25]. В ряде работ продемонстрирована дифференцировка стволовых клеток костного мозга в эндотелиоциты и кардиомиоциты как in vitro под действием индукторов дифференцировки [117, 128, 200, 201, 202, 233], так и после имплантации в миокард под действием клеточного микроокружения [314, 354]. В работах Briguori C et al. [169] представлены результаты 1 фазы клинического исследования эффективности и безопасности трансэндокардиального изолированного введения свежевыбеленных нефракционированных автогенных моноклональных клеток костного мозга пациентам с рефракторной стенокардией. Эффективность метода подтверждена функциональными тестами и инструментальными диагностическими методиками, однако у трети пациентов в течении года продолжала прогрессировать ИБС и им были сделаны реваскуляризующие операции.

Emerson C. et al. в 2003 году опубликовали результаты американо-бразильского проспективного нерандомизированного открытого исследования трансэндокардиального введения аутологичных мононуклеаров костного мозга больных с терминальной стадией ХСН с целью оценки безопасности метода и возможности стимуляции процессов ангиогенеза, улучшение перфузии и сократимости миокарда [184]. Принимавшие участие в исследование пациенты были разделены на группу контроля и группу клеточной терапии. Аутологичные мононуклеарные клетки костного мозга вводили с помощью навигационной нефлюорисцентной системы NOGA. Через 4 месяца после процедуры в группе клеточной терапии отмечалось увеличение ФВ ЛЖ с 20 до 29 % и уменьшение конечного систолического объема ЛЖ.

Beeres S. et al. в 2006 году применил аутологичные мононуклеарные клетки костного мозга у больных рефрактерной стенокардией и ишемической кардиомиопатией. В исследовании были включены 25 пациентов в возрасте 64±10 лет, страдающих ИБС, стенокардией III-IV ФК, получающих современную адекватную медикаментозную терапию в отсутствие возможности реваскуляризации в связи с дистальным типом поражения коронарного русла. Срок наблюдения 12 месяцев. У всех больных оценивали степень ишемии миокарда и размеры участка ишемии с помощью ОЭТ, а затем с помощью системы NOGA прицельно интрамиокардиально вводили суспензию мононуклеарных стволовых клеток. К концу исследования отмечались уменьшение ФК стенокардии, улучшения качества жизни, уменьшение количества зон ишемии, увеличение ФВ ЛЖ [352].

Седовым В. М. [55] отмечен положительный эффект от интракоронарного транскатетерного введению аутологичных мононуклеаров костного мозга больным ИБС и дилатационной кардиомиопатией. Интракоронарное и интрамиокардиальное хирургическое введение аутологичных клеток-предшественников С133+ пациентам с различными видами сердечной недостаточности выполнялось рядом исследований с положительным результатом [56, 59, 66].

Fuchs S. et al. также в 2006 году изучали безопасность трансэндокардиальной трансплантации аутологичных клеток костного мозга [321]. 27 пациентам траснэндокардиально вводили CD34+ в ишемизированную зону миокарда. Через 3 месяца было отмечено уменьшение ФК стенокардии и увеличение толерантности к физическим нагрузкам.

Patel A. et al. проанализировали результаты рандомизированного исследования по оценке эффективности хирургического лечения ИБС в сочетании с субэпикардиальной трансплантацией аутологичных стволовых клеток костного мозга для лечения ХСН [350]. В исследовании принимали участие 20 пациентов с ишемической кардиомиопатией, длительность наблюдения 12 месяцев. В группе контроля проводилось лишь хирургическое лечение. Через 3 месяца четко отмечалось значительное увеличение ФВ ЛЖ в группе с клеточной терапии.

Dohmann H. et al. [362] проанализировали анатомопатологические, морфометрические и иммуноцитохимические параметры материала, полученного при вскрытии тела больного с рефрактерной ИБС и ХСН ишемического генеза, который скончался через 11 мес. после трансэндокардиального введения аутологичных мононуклеаров костного мозга. В зоне применения клеточной терапии было продемонстрирован активный процесс ангиогенеза.

Kuethe F. et al. [253] сообщили об отсутствии эффекта от применения у 5 больных интракоронарной трансплантации аутологичных мононуклеаров костного мозга. Срок наблюдения составил 12 месяцев, однако достоверность полученных результатов вызывает сомнение в силу маленькой выборки количества исследуемых.

Гуреевым С. В. и др. [27] было сообщено о дополнении АКШ трансплантацией аутологичных СК костного мозга, что приводит к значимому улучшению функции сердца в ранние сроки после операции в сравнении с контрольной группой, однако клиническая значимость симультанных операций в настоящее время только изучается. Данными авторами было продемонстрировано, что ХСН сопровождается иммунной дизрегуляцией, тяжесть степени которой предопределяет отсутствие клинического эффекта от применения аутологичных СК костного мозга. В работе изучена возможность улучшения результатов ремоделирования объемов и функции ЛЖ больных ХСН путем двухэтапной активации клеток костного мозга сначала in vivo, а затем ex vivo в процессе их культивирования [28].

С 2005 года в НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН in vivo проходят клиническое испытание использования аутологичных культивированных клеток костного мозга для лечения больных с ХСН [5, 56].

Общепризнано, что поражение миокарда при сахарном диабете 2 типа определяется совокупностью атеросклеротических процессов в коронарных артериях, а также наличием эндотелиальной дисфункции. В связи с этим ближайший и отдаленный прогноз после операции АКШ у данной категории больных, несколько хуже, чем у пациентов без сахарного диабета, что связано с дальнейшим прогрессированием течения поздних сосудистых осложнений. Предварительные клинические результаты трансплантации клеток костного мозга при АКШ у больных с ИБС и сопутствующим са-

харным диабетом 2 типа, показали, что данная методика лечения является безопасной для пациентов. Было отмечено достоверное снижение инсулинорезистентности и улучшение показателей углеводного и липидного обмена [78].

В ряде работ отмечено, что интрамиокардиальное применение аутологичных клеток костного мозга оказывает выраженное регуляторное воздействие на состояние иммунной системы, особенно с исходно существующим иммунным дисбалансом. Клиническим подтверждением указанного является снижение частоты и тяжести послеоперационных инфекционных осложнений, сокращение сроков антибиотикотерапии, а также длительности пребывания больных в стационаре [52].

В ряде работ было доказано, что повышенная концентрация в крови лимфоцитоподобных остеонектин-положительных клеток костного мозга приводит к рестенозу стентов. Однако данное мнение не поддерживается всеми авторами, например Габбасовой З. А. и др. [40], было продемонстрировано на 17 больных, что высокое содержание в периферической крови больных ИБС лимфоцитоподобных остеонектин-положительных клеток может отражать наличие воспалительного процесса в сосудистой стенке. Различий в уровне остеонектин-положительных лимфоцитоподобных клеток в крови больных ИБС с рестенозом и без него не было выявлено.

Интересен тот факт, что на 7-е сутки ИМ значительно увеличено количество CD133+ по сравнению с 3 сутками. Содержание CD34+38- клеток повышалось на 21-е сутки ИМ относительно 1-х и 3-х суток болезни; наблюдали увеличение количества и CD90+34- клеток на 21-е сутки относительно 7-х суток заболевания. Таким образом, полученные данные позволяют предположить участие и возможное значение CD133+, CD34+38-, CD90+34- стволовых клеток костного мозга в компенсаторно-приспособительных и регенераторных реакциях после ИМ [33].

Однако, несмотря на разночтивые результаты экспериментальных исследований применения нефракционированных клеток костного мозга, в мире более 10 лет проводятся клинические исследования [31]. Выдвигают три основные теории положительного влияния трансплантации клеток костного мозга на поврежденный миокард, которые реализуются самостоятельно или в комплексе: 1) развитие

коронарных сосудов, восстанавливающих питание гибернированного миокарда; 2) формирование de novo миозитов и сосудов; 3) активация роста резидентных клеток-предшественников через паракринный эффект имплантированных КМК [122, 125, 196, 319].

Следует помнить, что значительный остеогенный и хондрогенный потенциал мононуклеарных клеток костного мозга обусловлен присутствием как в прилипающей, так и не прилипающей фракциях мезенхимальных стволовых клеток. Причем в прилипающих фракциях клеток уровень экспрессии рецепторов генов остео- и хондрогенеза (аггрекана, люмикана, остеопонтина) достоверно выше, чем в не прилипающей фракции, что обусловливают необходимость их фракционирования перед интрамиокардиальной имплантацией [4, 50, 73].

1.4.3.7. Трансплантация стволовых клеток пуповинной крови

Одним из наиболее доступных и полноценных источников СК является пуповинная кровь, в которой содержится большое количество клеток-предшественниц, обладающих высоким пролиферативным потенциалом [276, 282]. Технология выделения СК из пуповинной крови довольно проста, СК пуповинной крови обладают потенциалом для быстрого самовоспроизведения и дифференцировки, кроме того, существует возможность длительного хранения подобных клеток в специальных банках для использования «по потребности». К тому же следует отметить меньший риск иммунного отторжения трансплантируемых аллогенных клеток пуповинной крови [106]. Выделенные из пуповинной крови клетки CD34+ и CD133+ способны дифференцироваться в зрелые эндотелиальные и мышечные клетки, а следовательно стимулировать неоваскуляризацию ишемизированной скелетной мышечной структуры [372].

J. Leor et al. в 2005 году на модели крыс продемонстрировали, что введенные клетки CD133+ пуповинной крови способны мигрировать, колонизировать и пролиферировать в зоне ишемии при ИМ [225]. Было показано, что некоторые клетки, введенные в поврежденную зону миокарда, были способны к дифференцировке в клетки, участвующие в процессе ангиогенеза. Помимо прочего, был отмечен эффект предотвращения ремоделирования и дисфункции ЛЖ.

1.4.3.8. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) обладают маркерами CD34 и CD133 и являются одним из наиболее доступных клеток для проведения кардиомиопластики. ГСК не обладают способностью к дифференцировке в кардиомиоциты [212], но возможно, способны к слиянию с ними. Несмотря на то, что маркеры потомства трансплантированных клеток находят в небольшом количестве КМЦ [127, 211, 216, 254], это объясняется тем, что это происходит в результате достройки поврежденных КМЦ хозяина с остатками клеток трансплантата [205, 314, 329, 373]. Выход ГСК из костного мозга происходит в ответ на воздействие факторов мобилизации: гранулоцитарномакрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКФ) и фактора стволовой клетки [369]. Причем воздействие ГМ-КСФ и Г-КСФ увеличивает количество ГСК в периферической крови на порядок [208, 215]. В настоящее время для трансплантации пациентам используют фракции $CD34^+CD45^+$ клеток [371] или $CD133^+$ клеток [112, 127]. На модели инфаркта миокарда у иммунодефицитных мышей был показан дозозависимый эффект человеческих $CD34^+$ клеток при их интрамиокардиальном введении. Выяснилось, что при пересадке большого количества клеток более интенсивно проявляются процессы васкулогенеза и кардиомиогенеза, и при этом менее выражены фибропластические процессы [173]. Объяснением улучшения функции сердца после трансплантации ГСК могут быть:

— неоваскуляризация за счет дифференцировки в эндотелиальные предшественники;

— выделение цитокинов и хемокинов, снижающих воспаление в поврежденной области и участвующих в привлечении других предшественников;

— восстановление внеклеточного матрикса;

— вовлечение эндогенных предшественников сердца [250].

Прямую инъекцию ГСК в инфарктный миокард также исследовали Orlic D et al. После перевязки коронарной артерии, популяцию GPF-меченных Lin- и $c\text{-}kit^+$ клеток вводили в сокращающуюся стенку, ограничивающую зону инфаркта. Через 9 дней у 40 % мышей отмечали регенерацию сердечной мышцы. Приблизительно

68 % области инфаркта было занято вновь сформированным миокардом. Было показано, что донорские клетки не только дифференцируются в кардиомиоциты, но также формируют эндотелиальные клетки и фибробласты. Признаки восстановления миокарда были далее поддержаны длительной продолжительностью жизни мышей и восстановлением сердечной функции [124]. Беляевым Н. Н. и соавт. (2009) изучали влияния гемопоэтических стволовых клеток костного мозга в условиях культивирования ex vivo с цитокинами на их индукционно-регенеративную способность при экспериментальном инфаркте миокарда [17]. Гистоморфологический анализ показал, что в случае введения стимулированных ГСК процессы репаративного моделирования миокарда и неоангиогенез усиливались. Проведенные эксперименты показывают перспективность использования новых подходов к усилению потенциальных регенеративных свойств ГСК костного мозга для лечения острого инфаркта миокарда.

Несмотря на то, что эти исследования демонстрируют, что различные популяции ГСК, вероятно, имеют очень высокую способность к хоумингу в поврежденный миокард и его регенерации, некоторые авторы придерживаются иного мнения. Несколькими исследователями была попытка повторить данный опыт, они инъецировали меченые GPF Lin^-, $c\text{-}kit^+$ клетки в ишемизированный миокард [127]. Другие использовали генетический подход, инъецируя HSC, содержащие LacZ, под контролем кардиоспецифического промотора [212]. Сердце исследовали относительно быстро после ИМ (±10 дней) и в более поздние сроки. Во всех этих исследованиях донорские клетки определялись в сердце, но эти клетки не дифференцировались в кардиомиоциты. Вместо этого, во все временные точки, донорские клетки экспрессировали гемопоэтические маркеры. Необходимо отметить, что Balsam L. B. et al. [127] нашли небольшое, но значимое увеличение ГСК в сердечной функции через 6 недель после ИМ. Следовательно, остается неясным, каков потенциальный морфологический и физиологический вклад ГСК в регенерацию миокарда [11]. В работах C. Murrry et al. [212] было показано, что ГСК введенные интрамиокардиально в нормальную сердечную мышцу и в область ИМ на модели мышей не дифференцировались в кардиомиоциты. Хотя и существует ряд публикаций

представляющие данные о том, что выявляются кардиомиоциты и миоциты с меткой трансплантированных ГСК. Однако это происходит из-за того, что ГСК способны дифференцироваться в моноциты/макрофаги и сливаться с клетками ткани реципиента [205, 328, 379]. Итак, исследования последних лет, продемонстрировали, что ГСК могут дифференцироваться в гепатоциты, клетки эпителия и эндотелия, соответственно при экспериментальном инфаркте миокарда они участвуют только в неоангиогенезе [229, 307, 338].

1.4.3.9. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток

Одним из главных направлений в биологии стволовых клеток является исследование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ПСКЧ), полученных впервые в 2007 году [153, 203, 238]. В настоящее время была продемонстрирована возможность дифференцировки in vitro ПСКЧ во многие специфические типы клеток, такие как кардиомиоциты [342, 385], гепатоциты [179], эпителий сетчатки [232] и др. Данные исследования имеют огромное значение для регенеративной медицины, поскольку дают возможность избежать целого ряда технических трудностей и этических проблем, связанных с получением и использованием специфичных для конкретного пациента линий эмбриональных стволовых клеток. Тем не менее, ПСКЧ еще не достаточно изучены, и, в частности, в настоящий момент отсутствуют полноценные данные по сравнению потенциала к дифференцировке ПСКЧ и эмбриональных стволовых клеток человека [120? 214].

В костном мозге и жировой ткани содержаться $CD34^{-}CD45^{-}$ клеток, которые называют мезенхимальные стволовые клетки (МСК). МСК являются резидентами стромы костного мозга, которые присутствуют в костном мозге в небольших количествах 1 на 10^4–10^5 клеток [188, 224]. МСК экспрессируют CD105, CD 73, CD 166, CD 44 и STRO-1, а также обладают способностью к дифференцировке в хондроциты, остеобласты, адипоциты, фибробласты и могут формировать строму костного мозга, а также другие ткани [129, 248]. При культивировании МСК могут дифференцироваться ортодоксально, т. е. случайно и неортодоксально. Так добавление в среду культивирования МСК дексаметазона приводит к ортодоксальной дифференцировке в адипоцитарном, хондроцитарном, остеоцитарном и миоцитарном направлениях [219, 230, 247, 266, 277]. Однако МСК способны дифференцироваться in vitro в неортодоксальных направлениях — нейрональном, глиальном, кардиомиоцитарном и гепатоцитарном [101, 102, 104, 231, 266, 285, 386]. МСК обладают минимальной экспрессией молекул гласного комплекса гистосовместимости II класса и недостатком ко-стимулирующей поверхностной молекулы B-7, необходимой для запуска Т-клеточного иммунного ответа [201, 232], что при аллогенной трансплантации не приводит к стимуляции реакции отторжения «трансплантат против хозяина».

Трансплантация МСК позволяет значительно улучшить сократительную функцию миокарда у мышей после индуцированного инфаркта [234]. В работе Wang J. S. et al. [260] впервые была выдвинута гипотеза, что при инфаркте миокарда в сердце создаются определенные условия и сигналы под воздействием которых МСК дифференцируются в КМЦ. В работах Rangappa S. et al. [364] было доказано, что трансплантируемые человеческие МСК в мышиный миокард через 8 недель преобразовывались в кардиомиоциты. Помимо прочего установлено, что трансплантация МСК не культивированных с 5-азацитидином, могут выделять фактор роста стволовых клеток SCF [144]. SCF обладает мощным антиапоптотическим действием, усиливает хоуминг, приживление и функционирование эндотелиальных и других предшественников в области повреждения [311]. Помимо прочего SCF является главным активатором $c\text{-}kit^{+}$ тучных клеток, которые инфильтрируют поврежденную область миокарда и стимулируют пролиферацию и сократительную активность миофибробластов [355], происходящих из резидентных кардиальных фибробластов, а не из костного мозга [243]. В исследованиях на животных через 2 недели после обработки мышиных строгальных клеток костного мозга 5-азоцитидином было отмечено формирование миотубарных структур внутри клеток, которые экспрессировали миозин, альфа-актин, GATA-4 (специфический кардинальный транскрипторный фактор), MEF-2 (миоцитарный индуцирующий фактор), предсердный натрийуретический фактор и мозговой натрийуретический пептид [264]. Через 3 недели вновь выращенные кардиомиоциты продуцировали уже электрофизиологические потенциалы действия, аналогичные тем, что выраба-

тывают клетки синусового узла. Кроме того, Toma C. et al. [224, 284] вводили в область ИМ взрослых мышей меченые ферментом lacZ МСК человека. Через 14 дней данные клетки продуцировали кардиоспецифические ферменты Демин и Тропинин Т, а через 60 дней — альфа-актин и фисфобаламин.

МСК соответствуют большинству критериев, которыми должны обладать клетки, используемые в заместительной терапии сердечно-сосудистой системы. По данным ряда исследований наиболее важными критериями являются: 1. способность клеток дифференцироваться в кардиомиоциты, содержать сократительные структуры; 2. присутствие между клетками вставочных дисков со щелевыми контактами для проведения потенциалов возбуждения к пересаженным клеткам от кардиомиоцитов хозяина; 3. отсутствие реакции отторжения; 4. минимальные ишемические повреждения, шок, некроз, и апоптоз пересаженных клеток; 5. способность пересаженных клеток к репарации поврежденного участка (замещение соединительной ткани и формирование полноценной биомеханической архитектоники сердечной ткани) [46, 88].

В 1999 году S. Makino et al. (1999) получили кардиомиогенную клеточную линию из мышиных клеток стромы костного мозга. После обработки 5-азацитидином in vitro около 30 % клеток дифференцировались в КМЦ, которые экспрессировали множество специфических для них генов, имели фенотип фетальных желудочковых КМЦ [136]. Подобные результаты были получены исследователями S. Tomita et al. (1999), которые вызывали повреждение миокарда с помощью жидкого азота [118].

В ФГУ «НИИ трансплантологии и искусственных органов им. В. И. Шумакова Росмедтехнологий» исследовали эффективность применения МСК различного происхождения: эндотелиоцитоподобные, кардиомиоци-топодобные и недифференцированные. Было отмечено, что в сердцах после трансплантации клеток достоверно повышен уровень инициального апоптоза и достоверно снижен уровень позднего апоптоза по сравнению с контролем. Обычно в миокарде крыс через 4 недели после повреждения миокарда в пренекротической зоне преобладают рубцовые процессы, об этом свидетельствуют полученные нами данные об активности каспаз (рубцовая ткань замещает мышечную, что сопровождается

гибелью кардиомиоцитов). При этом процессы противоишемической резистентности сопровождается повышением энергозатрат, формируя порочный круг, что связано с перенапряжением систем обеспечения пластических процессов. Трансплантация МСК вне зависимости от вида их предифференцировки меняет эти процессы: снижается уровень гибели кардиомиоцитов, при этом повышенный уровень инициальной caspase-3 можно трактовать двояко. С одной стороны, это может быть отражением отсроченного начала процессов рубцевания; с другой стороны, повышенная активность этой каспазы свидетельствует о запредельных режимах работы митохондрального аппарата кардиомиоцитов и признаком их адаптации к неблагоприятным условиям. Полученные результаты позволяют прийти к заключению, что клетки костного мозга выступают в пренекротической зоне в роли тканевых адаптогенов за счет сохранившихся резервов адаптации и увеличения дополнительного расхода внутриклеточной энергии повышают противоишемическую резистентность миокарда, что находит отражение в улучшении сократительной функции миокарда [19].

Следует отметить, что МСК стимулируют неоангиогенез путем увеличения уровня VEGF. После интрамиокардиального введения МСК в зону ИМ увеличиваются локальный уровень VEGF и суммарное поперечное сечение сосудистого русла, улучшается региональный кроваток и сократимость миокарда [115]. Аналогичные результаты получил Kamihata H. et al. [229], который отметил увеличение количества коллатеральных сосудов в 5,7 раза через 3 недели после введения мононуклеарных клеток костного мозга в область ИМ крыс.

Парфенова Е. В. и соавт. (2009 г.) исследовали возможность выделения c-kit положительные клетки из ткани аневризмы сердца, иссеченной в ходе хирургического вмешательства. Работа проведена совместно с отделом сердечно-сосудистой хирургии РКНПК и факультетом фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова [69]. В мышечной части аневризмы при иммуногистохимическом окрашивании обнаружены c-kit –позитивные клетки, располагающиеся кластерами между мышечными волокнами. Для получения из мышечной части аневризмы популяции клеток, обогащенных c-kit–позитивными клетками, использовали метод иммуномагнит-

ной селекции. Последующее культивирование обогащенной популяции в дифференцировочных средах показало, что выделенные из аневризмы c-kit –позитивные клетки способны дифференцироваться в эндотелиальном, кардиомиоцитарном и нейрональном направлениях. Таким образом, было продемонстрировано, что ткань аневризмы может стать источником аутологичных СК сердца для их изучения и для клеточной терапии этой категории больных.

Голуховой Е. З. [22] был получен выраженный положительный результат при лечении экспериментального инфаркта миокарда у животных с помощью трансэндокардиального введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток с использованием системы NOGA XP и специального инъекционного катетера.

E. Molina et al. [234] было выполнено введение МСК интракоронарно на экспериментальной модели мышей с гипертрофией «перегрузки» с целью оценки улучшения гемодинамических показателей, толерантности к физическим нагрузкам, уменьшения воспалительного фона и предотвращения ремоделирования ЛЖ. Через 28 дней наблюдения было отмечено улучшение систолической функции ЛЖ, увеличение толерантности к физической нагрузке, уменьшение показателей ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО, мозгового найтрийуретического пептида.

Известно, что при трансплантации МСК в организм взрослого здорового животного до 25 % донорского материала обнаруживается в красном костном мозге [97, 266]. В ряде работ продемонстрировано, что эндогенные МСК мигрируют в область отторжения аллогенного трансплантата [270], в зону механического повреждения тканей [241, 242], а также в зоны ишемического повреждения тканей [160, 170, 275, 316].

В 2005 году коллективом авторов удалось выделить трансформированные МСК из популяции культивируемых клеток и показать онкогенный потенциал таких клеток in vivo [335], однако это единичная работа. В сотнях выполненных исследований по трансплантации культивированных мезенхимальных стволовых клеток не выявлены новообразования. Интересен факт описанный Studeny M. et al. (2004): при трансплантации МСК животным с новообразованиями или при симультанной трансплантации МСК и опухоли, клетки мигрируют в опухоль, где формируют строму. В данной исследовательской модели центральная часть солидной опухоли является зоной ишемии, и репаративные свойства МСК полностью реализуются [267]. Вследствие стимуляции неоангиогенеза, соответственно МСК стимулируют опухолевый рост.

Интересен тот факт, что до сих пор не существует единого протокола культивирования МСК in vitro, практически каждая лаборатория предлагает свои вариации состава ростовой среды, антибиотиков, субстратов. В исследовании Makino S. et al. [136] мышиные костномозговые клетки выращивали в среде IMDM с добавлением 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (250 нг/мл), амфотерицина В (85 мкг/мл). Wenrong Xu et. al [265], человеческие МСК культивировались в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 5 % лошадиной сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина в СО2-инкубаторе. Шахов В. П. и др. [88] для культивирования мышиных МСК использовали среду DI-MEM, которая содержала 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/л L-глютамина, 10–6 М дексаметазона, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Концентрацию жизнеспособных клеток доводили до (0,1–10)х106/мл. Культивирование человеческих МСК проводили в тех же условиях, заменив среду DI-MEM на DMEM. Кругляков П. В. и др. [29] для получения крысиных МСК использовали среду `aMEM, содержавшую 20 % эмбриональной телячьей сыворотки и 100 мкг/мл пенициллина или стрептомицина. В работе Матюкова А. А. [45] клетки костного мозга кролика культивировались в среде `aMEM с 10 % процентами сыворотки эмбрионов коров и гентамицина сульфата (50 мкг/мл).

1.4.3.10. Результаты пилотных клинических исследований

Несмотря на то, что очень многие вопросы требуют дальнейшего изучения в эксперименте, уже имеются ряд клинических пилотных исследований данного вида терапии. Однако все эти рандомизированные исследования, абсолютно различные, не только по подбору групп пациентов, методу и сроку введения, а также и вида клеточного трансплантата. Поэтому не могут быть использованы как доказательная база «за» или «против» клеточной кардиомиопластики. Ниже мы приводим наиболее известные исследования.

BOOST (bone marrow transfer to enhance ST-elevation) выполнялось в Германии, 2002–2003 годах. В исследование было включено 60 больных, которые после стентирования инфаркт-образующей артерии была рандомизированы на 2 группы: группу клеточной терапии (введение через 5 суток после острого ИМ) и группу контроля с оптимальной схемой лечения после острого ИМ. Через 6 месяцев у больных с трансплантацией СККМ, был отмечен больший, чем в контроле, прирост фракции выброса левого желудочка. В контрольной группе через 18 месяцев произошло улучшение фракции выброса и это привело к тому, что разница в изменении показателя между группами вмешательства и контроля исчезла. Однако в контрольной группе зарегистрировано прогрессирование нарушения диастолической функции [244, 268].

ASTAMI (autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction) выполнялось в Норвегии, 2004–2005 годах — в исследование включено 101 больной с передним ИМ. К интракоронарному введению аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга рандомизированы 52, только к обычному лечению — 49. Ни один из примененных методов, оценивающих фракцию сердца, не выявил достоверных различий между группами [63, 251].

REPAIR-AMI (Reinfusion of Enriched Progenitor Cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction) — включены 204 пациента с ИМ, независимо от локализации, подвергнутые в остром периоде первичному чрезкожному коронарному вмешательству с имплантацией стента. В день поступления, у больных брали аспират костного мозга и через 35 дней, после культивирования, вводили аутологичные костномозговые клетки предшественники интракоронарно. Измерение фракции выброса ЛЖ через 4 месяца продемонстрировало, что в группе с вмешательством она выросла на 5,5 %, чем в группе плацебо - +3 %. При анализе подгрупп оказалось, что увеличение фракции выброса было более выраженным у больных с меньшей фракцией выброса и после процедур, выполненных позже 5-х суток ИМ [63, 245].

TORCARE-CHD (Transplantation of Progenitor Cells And Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction). В исследовании участвовали 75 пациентов, перенесших острый ИМ более 6 лет назад и получающих постоянную адекватную медикаментозную

терапию. Больные были разделены на 3 группы: в 1-й группе интракоронарно вводили СК костного мозга; во 2-й — ЭЛК периферической крови, а в 3-й группе — плацебо. В данном исследовании было четко показано эффективность применения МСК, по сравнению с ЭПК и плацебо-группой [361].

Исследование ГУ НИИ кардиологии Томского научного центра СО РАМН. Исследование проведено на 62 больных с ИМ. Всем больным было выполнено эндоваскулярное вмешательство, с назначением стандартной терапией, включающей аспирин, плавикс, статины, ингибиторы АПФ и блокаторы бета-адренорецепторов в подобранных дозировках. Клеточную кардиомиопластику выполняли во время ангиографии на 7–21й день заболевания. Пациентам контрольной группы выполняли только стентирование коронарной артерии. В результате исследования, авторы пришли к мнению, что интракоронарная инфузия аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга (МККМ) больным после острого ИМ не оказывает существенного влияния на сократительную функцию сердца, функциональный класс ХСН, толерантность к физической нагрузке и качество жизни больных. Вместе с тем, такой метод лечения обеспечивает доставку МККМ в миокард, не провоцирует злокачественных нарушений сердечного ритма и не усугубляет течение ИБС [64].

В этом же центре в рамках второго исследования была дана оценка отдаленных клинических результатов лечения больных ИБС, которым выполняли операцию реваскуляризации миокарда в виде АКШ и клеточную терапию мононуклеарными клетками костного мозга и фетальными клетками, также исследована эффективность ЭК. Клинические результаты по внутрисердечному введению мононуклеарных и фетальных клеток у больных ИБС, показали, что методика лечения является безопасной. Однако, улучшение показателей внутрисердечной гемодинамики отмечалось только у больных после лечения фетальными клетками, по сравнению с группой больных леченных мононуклеарными клетками костного мозга. Хоуминг эффект наиболее выражен у эмбриональных клеток. Первый успешный опыт гибридных операций (коррекция функции митрального клапана и уменьшение объемов левого предсердия) с использованием клеточных материалов у больных с ДКМП свиде-

тельствует об уменьшении процессов ремоделирования миокарда спустя 1 год после операции, что позволяет нам и дальше набирать клинический материал и оценивать отдаленные результаты [6].

Исследование НИИ транспалнтологии и искусственных органов МЗРФ. В исследование включены 8 больных с ХСН (5 с ИМ, один больной ИБС, один — с острым ИМ передней стенки ЛЖ, один — с дилатационной кардиомиопатией) [25, 48, 92]. Продолжительность наблюдения составила 1 месяц. Больным выполнили интракоронарную и интрамуральную трансплантацию МСК. Эффективность трансплантации МСК оценивали с помощью сцинтиграфических методов исследования и изменения функционального класса ХСН по классификации NYHA. У наблюдаемых больных было отмечено снижение ФК ХСН, увеличение толерантности к физической нагрузке, тенденция к увеличению ФВ ЛЖ.

1.4.3.11. Способы введения стволовых клеток

Эффективность применения клеточной кардиомиопластики зависит не только от оптимального вида клеточного трансплантата, сроков введения, но и от оптимального пути введения. В настоящее время выделяют: интравенозные [353], интракоронарные [113], трансмиокардиальные, трансэпикардиальные инъекции [292], катетерные трансэндокардиальные инъекции [139, 155, 363] и трансвенозное введение в коронарные вены [178, 367].

Трансторакальное внутримышечное введение было одним из первых и самого распространенного метода введения трансплантата. К достоинствам данного метода относят прямую визуализацию поврежденного участка миокарда и возможность безошибочно ввести трансплантат в область ишемии или рубца. Однако данная методика предполагает наличие хирургического вмешательства с торакотомией, поэтому сейчас в основном используется при выполнении АКШ [162, 293]. В литературе встречается ряд работ, посвященных оптимизации доступа при выполнении интрамиокардиальной пересадки аутологичных мононуклеаров костного мозга в поврежденный миокард [81, 83]. Так по мнению Фетисова К. В. [82] выполнение подмечевидной перикардиотомии через левую прямую мышцу живота является доступом выбора для проведения данной манипуляции. В отличие от торакоскопической перикардиотомии

и миниторакотомии, обеспечивается доступ для пересадки во все стенки правого и левого желудочков, и не требует коллабированного легкого и однолегочной вентиляции. В сравнении с чрездиафрагмальной перикардиотомией не требует введения зонда в желудок и вскрытия брюшной полости.

Внутривенное введение СК — наиболее простой и безопасный метод введения, однако он не позволяет создать большую концентрацию клеток в коронарных сосудах.

Применительно к ишемическому повреждению сердца, существует несколько способов доставки клеточного трансплантата (рис. 1.2). На рисунке представлены основные метооды доставки: интракоронарный, интрамиокардиальный во время оперативного вмешательства на сердце, миокардиальный через эндокард с помощью катетерных технологий, по типу навигационной системы NOGA XP. Необходимо отметить, что существуют еще внутриартериальная и внутривенная методика выполнения введения клеточного трансплантата.

Интракоронарный путь введения — выполняется как правило при экстренных вмешательствах в момент острого инфаркта миокарда, когда необходимо ликвидировать непроходимость артерии путем тромболизиса, ангиопластики и стентирования, либо во время планового стентирования [138]. В таком случае клеточный

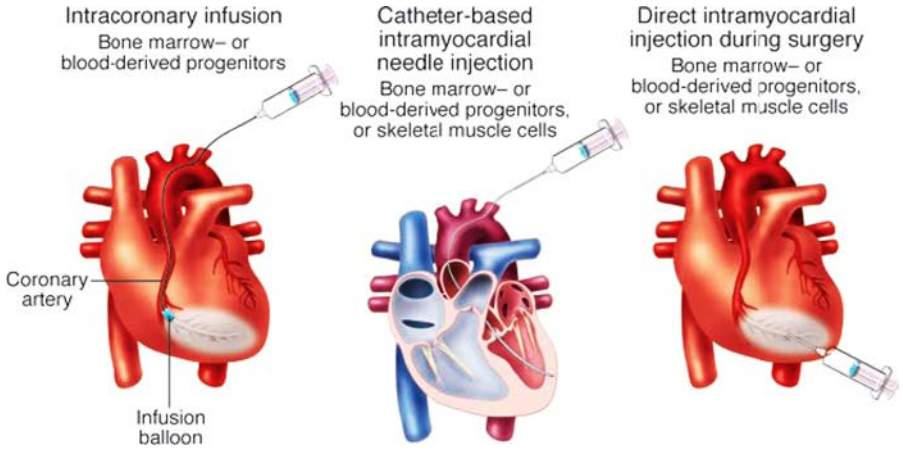


Рис. 1.2. Способы доставки клеточного трансплантата в сердце (Stefani Dimmeler et al. The journal of clinic investigation, 2005)

трансплантат попадает непосредственно в ишемизированную зону и далее реализуется двумя путями (рис. 1.3).

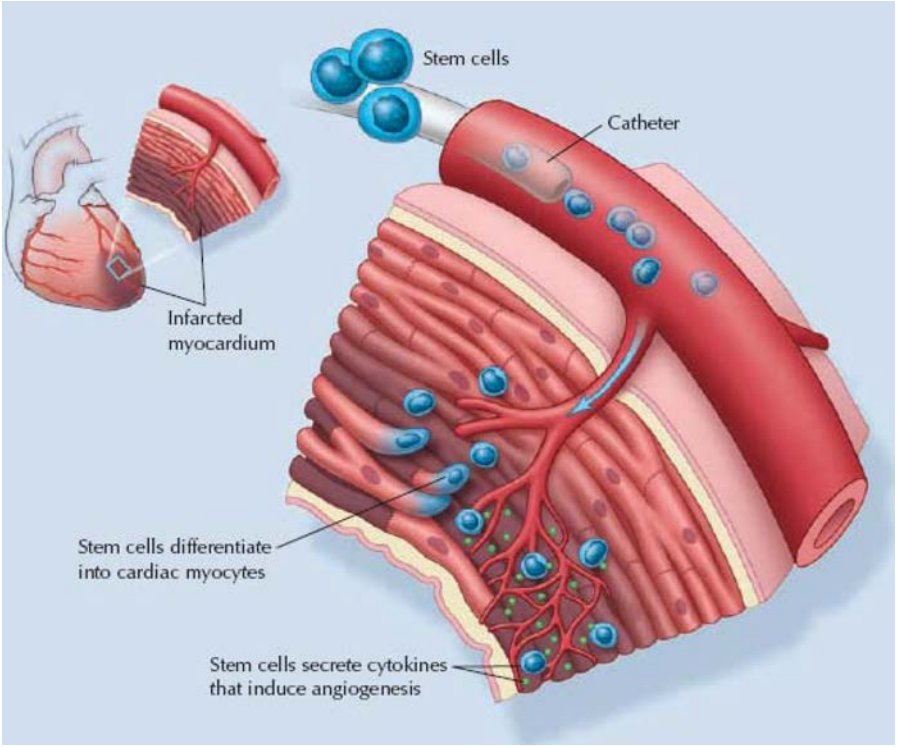


Рис. 1.3. Эффекты интракоронарного введения клеточного трансплантата

Первый путь — стволовые клетки дифференцируются в кардиомиоциты и второй путь — они выделяют различные цитокины, которые индуцируют ангиогенез. Но применение интракоронарного введения стволовых клеток имеет и свои отрицательные черты: во-первых, необходимость инвазии; во-вторых, по ряду исследований отмечено, что применение трансплантации СК во время стентирования приводит к прогрессивному разрастанию неоинтимы в стенте не зависимо покрыт он лекарственными композитами или нет, что приводит к неудовлетворительным результатам в первые полгода послеоперационного период. В литературе описываются так же случаи тромбоза и эмболии коронарной артерии во время

введения трансплантата, при этом необходимо учитывать, что еще нет разработанной методики введения, а именно скорости введения, разведение или концентрация клеточного трансплантата, что существенно может повлиять на результаты данного вида введения [30, 269, 329]. Хотя в отличии от инъекционных видов введения СК, интракоронарный путь введения не вызывает нарушения ритма сердца.

Hyun Jae Kang et al. [226] провели исследование эффективности интракоронарного пути введения. Они выделили три группы пациентов с острым инфарктом миокарда: в 1 группе — интракоронарно вводили аутологичные мезенхимальные стволовые клетки; во 2 группе — интракоронарно вводили Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор); в 3 группе — контроль. В результате исследования отмечено значительное улучшение функции сердца, неоангиогенеза и уменьшение зоны инфаркта в 1 группе, немного хуже результаты во-второй группе. Таким образом, было еще раз подтверждена эффективность интракоронарного введения трансплантата.

Интрамиокардиальный путь введения с помощью катетерной технологии — наиболее перспективный путь введения клеточного трансплантата с помощью навигационной системы NOGA XP, во время процедуры определения зон ишемии с помощью специального катетера вводят трансплантат непосредственно в зону ишемии и гибернирующего миокарда [168]. Необходимо отметить, что несмотря на то, что данная система относительно недавно используется в клинике, уже имеется ряд работ посвященных применения ее для трансплантации клеток. В исследовании CAUSMIC (Catheter-based Delivery of Autologous Skelet Myoblasts for Ischemic Cardiomyopathy) — проводилась оценка возможности и эффективности интрамиокардиальной доставки аутологичных скелетных миобластов с помощью системы NOGA XP [140]. Скелетные миобласты были получены с помощью биопсии мышцы бедра пациента. При контрольном картировании после манипуляции через 6 и 12 месяцев, было отмечено жизнеспособность и улучшение перфузии миокарда не только в области инъекции, но и в окружающих тканях.

Emerson C. et al. в 2003 году опубликовали результаты американо-бразильского проспективного нерандомизированного откры-

того исследования трансэндокардиального введения аутологичных мононуклеаров костного мозга больных с терминальной стадией ХСН с целью оценки безопасности метода и возможности стимуляции процессов ангиогенеза, улучшение перфузии и сократимости миокарда [184]. Принимавшие участие в исследование пациенты были разделены на группу контроля и группу клеточной терапии. Аутологичные мононуклеарные клетки костного мозга вводили с помощью навигационной нефлюорисцентной системы NOGA. Через 4 месяца после процедуры в группе клеточной терапии отмечалось увеличение ФВ ЛЖ с 20 до 29 % и уменьшение конечного систолического объема ЛЖ.

Beeres S. et al. в 2006 году применил аутологичные мононуклеарные клетки костного мозга у больных рефрактерной стенокардией и ишемической каридомиопатией. В исследование были включены 25 пациентов в возрасте 64±10 лет, страдающие ИБС, стенокардией III-IV ФК, получающие современную адекватную медикаментозную терапию в отсутствие возможности реваскуляризации в связи с дистальным типом поражения коронарного русла. Срок наблюдения 12 месяцев. У всех больных оценивали степень ишемии миокарда и размеры участка ишемии с помощью ОЭТ, а затем с помощью системы NOGA прицельно интрамиокардиально вводили суспензию мононуклеарных стволовых клеток. К концу исследования отмечались уменьшение ФК стенокардии, улучшение качества жизни, уменьшение количества зон ишемии, увеличение ФВ ЛЖ [352].

Чернявский А. М. и др. в 2007 году опубликованы данные применения навигационной системы в ФГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина Федерального агентства Росмедтехнологий», Новосибирск, Россия. Исследование проводились на 26 пациентах. Эндокардиальная имплантация аутологичных стволовых клеток с использованием навигационной системы NOGA XP (рис. 1.4) не имела осложнений. Через 3 месяца после введения аутологичных стволовых клеток у пациентов с возвратной или исходной стенокардией отмечалось уменьшение функционального класса стенокардии до 1,4±0,6, сердечной недостаточности до 2,1±0,5, отмечалась тенденция к увеличению фракции выброса на фоне проводимой консервативной терапии [85].

Рис. 1.4. Навигационная система NOGA XP используемая для проведения и оценки эффективности трансплантации стволовых клеток

Первые пилотные исследования в 3-х клинических фазах использования нефлюроскопической навигационной системы были проведены в Аризонском институте сердца и продемонстрированы положительные результаты ее использования [384]. Методика подробна освящена во многих статьях и учебных пособиях [138,154].

Механизм функционирования стволовых клеток при данной методике введения заключается в непосредственной дифференцировке стволовых клеток в кардиомиоциты и эндотелиоциты в зоне ишемии (рис. 1.5), а также выделяют по аналогии с интракоронарным введением цитокины, которые стимулируют мобилизацию собственных стволовых клеток организма.

Регенерация локального повреждения осуществляется в две стадии: на первой стадии происходит мобилизация депонированных СК и их потомков; на второй стадии происходит селективное привлечение (хоуминг эффект) циркулирующих СК в зоны повреждения [89, 169].

В ранний постинфарктный период в сыворотке пациентов обнаруживается повышенное содержание Г-КСФ (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора), приводящее к мобилизации выхода $CD34^+$ клеток с высоким уровнем экспрессии CXCR4-рецептора kSDF-1 (stromal cell derived factor) [255]. Явления гипок-

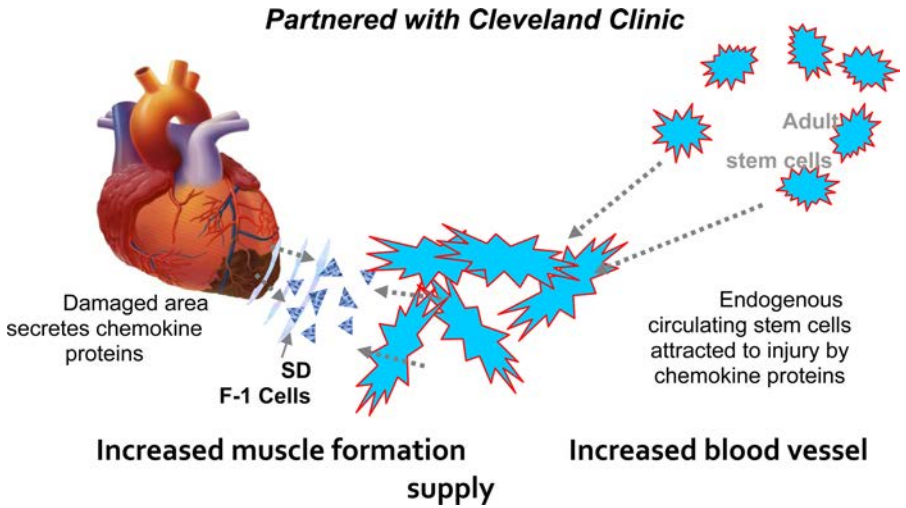


Рис. 1.5. Эффекты катерной интрамиокардальной трансплантации стволовых клеток

сии в зоне инфаркта приводит к резкому увеличению уровня экспрессии фактора HIF-1 (hypoxia inducible factor) [305], который является транскрипционным фактором для гена sdf-1 и активирует его экспрессию в кардиомиоцитах, клетках эндотелия сосудов и фибробластах [159, 294]. При блокаде HIF-1 не наблюдалось гипоксия-зависимого синтеза SDF-1 и снижалась адгезивная способность СК в культуре. Высокий уровень SDF-1 является индикатором пораженной области миокарда и активно участвует в привлечении стволовых клеток в данный участок, т. е. является локальным медиатором приживления. Интересен тот факт, что повышение SDF в сыворотке очень кратковременно и наблюдается лишь в первые 12–24 часов после ИМ [237, 348]. Одновременно с этим процессом происходит повышение содержание VEGF (Vascular endothelial growth factor), который стимулирует неоангиогенез [380]. Все вышеперечисленное приводит к стимуляции других проангиогенных факторов, таких как angiopoietin-1, placental growth factor и erythropoietin [189, 300 301]. Параллельно с этим резко возрастает число циркулирующих EPC (endothelial progenitor cell), которые участвуют в ангиогенезе. Интересен тот факт, что если в этот момент больному с острым ИМ назначить ингибиторы редуктазы HMG-CoA (группа статинов) и эстрогены, что значительно возрастает число эндотелиальных прогениторных клеток [191, 217, 297, 318]. Сигнальная молекула PPAR gamma играет центральную роль в осуществлении влияния статинов на прогениторные клетки. Когда PPAR gamma блокирована, статины больше не оказывают влияния на клетки. Поскольку PPAR gamma является основной мишенью некоторых препаратов для борьбы с диабетом, которые активируют его, исследователи предположили, что эти препараты также оказывают эффект на прогениторные клетки. Кроме того, нередки случаи, когда пациенты принимают одновременно и статины и препараты от диабета, что усиливает их влияние на прогениторгные клетки [318]. Таким образом, регенерация эндотелия и неоваскулогенез являются самыми мощными агентами мобилизации стволовых клеток.

После попадания мобилизованных клеток в инфаркт-зависимую артерию или критически суженую, наступает непосредственно эффект хоуминга. Хоуминг является трехступенчатой каскадной реакцией, включающей в себя: адгезию к эндотелию или оставшемуся матриксу, транс миграция через эндотелий и конечная стадия — миграция и инвазия в поврежденные и/или переживающие ткани. Естественно первые два этапа не берут участие при внутримышечном введении трансплантата. Первым, как уже отмечалось выше, цитокином «привлекающим» стволовые клетки является SDF-1. Другим цитокином регулирующим различные биологические процессы, такие, как миграция клеток, воспаление является высокомобильный групповой белок 1 (High mobility group box 1) (HMGB1)-негистоновый белок, требующийся для поддержания архитектуры хроматина. Ранее показано, что HMGB1 может пассивно освобождаться гибнущими в результате травмы клетками, являясь сигналом повреждения тканей, он индуцирует стволовые клетки к трансмиграции через эндотелиальный барьер [289]. Более того, было установлено что, вслед за мобилизацией стволовые клетки способны к возврату в свои изначальные локусы. Инвазия СК происходит за счет протеиназы катепсин-L, который является важным протеолитическим ферментом и вовлечен в процессы развития, роста, ремоделирования и ангиогенеза, в пост синтетическую модификацию предшественников пептидных гормонов и нейромедиаторов, а также в различные патологические процессы. Расщепляя белки на поверхности клеточных мембран либо вблизи нее,

катепсин-L-подобные протеиназы принимают участие в деградации внеклеточного матрикса и тем самым способствуют пролиферации СК, опухолевых клеток и инвазии в пограничные ткани [18]. После того как СК попали в «востребуемую зону» под действием тригерных стимулов они дифференцируются в кардиомиоциты и клетки эндотелия, а также другие сателитные клетки микроокружения.

На взаимодействие SDF-1 с его рецептором влияет множество факторов, образующихся в зоне повреждения. К числу таких факторов, в частности, относятся фибронектин, фибриноген, тромбин, гиалуроновая кислота и сфингозин-1-фосфат, способные усиливать хемотаксис CXCR4 клеток по градиенту SDF-1 [24, 360]. Данный механизм позволяет усилить контроль за доставкой циркулирующих СК именно в зоны повреждения, где они участвуют в процессах регенерации сосудов и стромы. Однако, это не может длиться постоянно, поэтому при восстановлении локального кровоснабжения останавливается миграция СК из крови. Данный факт подтвержден в ряде экспериментальных работах (рис. 1.6).

Действительно, циркуляция СК не обнаруживалась в поврежденных тканях после нормализации в них напряжения кислорода [306]. Работа такого контролирующего механизма может нарушиться в зонах хронического воспаления и опухолевого микроокружения [323, 324], хемотаксис к которым приобретает перманентный характер для циркулирующих СК и их потомков.

Таким образом, в данном обзоре продемонстрирован современный взгляд на проблему хоуминга СК к поврежденному миокарду, в зависимости от метода введения клеточного трансплантата или мобилизации собственных СК резервов организма при той или иной патологии. Необходимо подчеркнуть, что ряд механизмов имеет общие черты с поведением злокачественных опухолей человека при поломке того или иного механизма регуляции роста и дифференцировки.

Несмотря на большое количество исследований посвященных лечению и профилактики инфаркта миокарда и ИБС, приходится констатировать, что современные терапевтические и кардиохирургические стратегии лечения данной патологии недостаточно эффективны или недоступны для широкого клинического применения (трансплантация сердца, имплантация искусственного левого

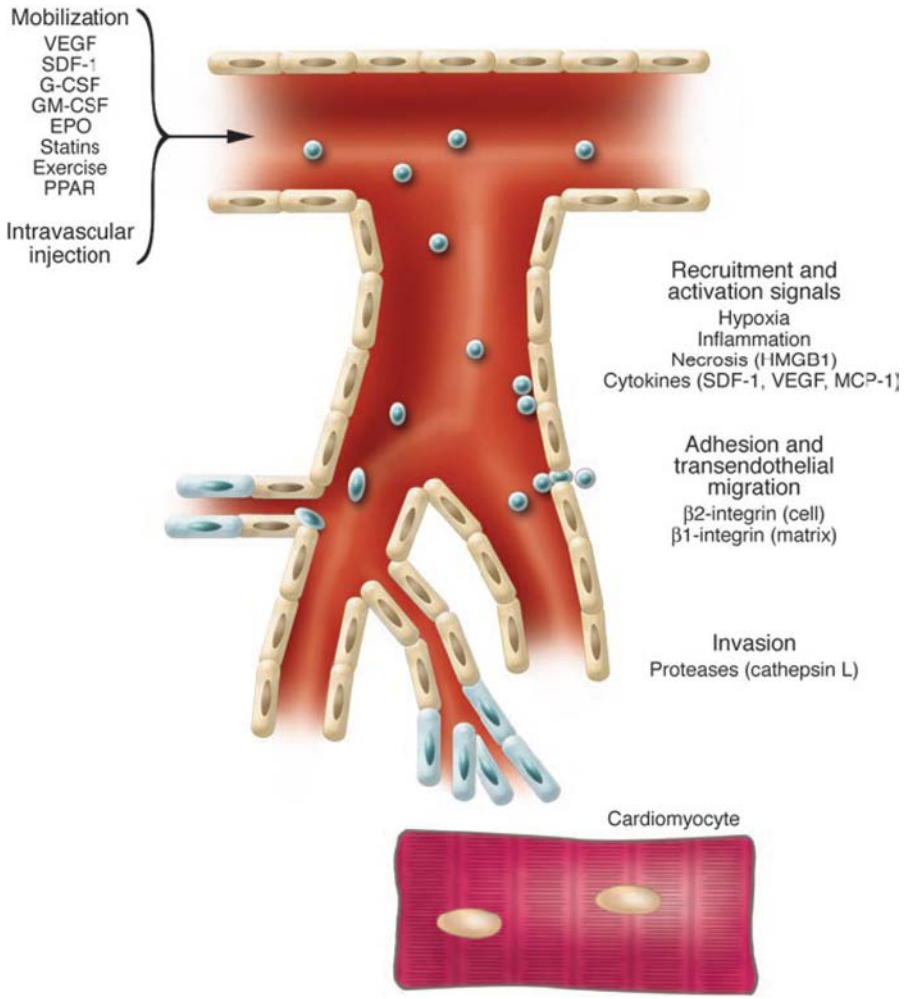


Рис. 1.6. Мобилизация и хоуминг мезенхимальных стволовых клеток при внутрисосудистом ведении или собственных стволовых клеток

желудочка сердца и др.). Поэтому имеются все основания считать, что в новом тысячелетии разработка новых эффективных методов восстановительного лечения поврежденного миокарда будет интенсифицирована и эта работа будет проводиться с учетом онто- и филогенетических особенностей физиологической и репаративной регенерации миокарда.

Раздел 2
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика методов моделирования инфаркта миокарда и экспериментальных групп

Экспериментальное моделирование острого инфаркта миокарда в сочетании с классическими и современными методами исследования незаменимо в решении проблемы патогенетических механизмов развития данного заболевания и разработки новых способов его лечения. Нами был проведен тщательный анализ существующих способов моделирования острого ИМ (фармакологические, термические — воздействие высоких и низких температур, ультразвука, лазера, КВЧ, токсинов, стресса и др.), в результате которого, мы остановились на двух общепринятых методиках. Нам импонировала методика воздействия тока на миокард, которая легка в исполнении и не требует особых технологических затрат. Вторая методика заключалась в хорошо воспроизводимой технике — перевязки коронарной артерии, которая проста в исполнении и полно имитирует ситуацию, возникающую при данной патологии. Помимо прочего, она позволила четко локализовать инфаркт в одной области сердца у всех животных (что невозможно при фармакологическом способе, использовании токсинов, стрессе), приблизительно одинаковой площади, 100 % возникновение процесса и в отличии от физических моделей альтерации (температурным режимом, ультразвуком, высокочастотным током и т. д.) при патогистологическом исследовании обнаруживаются те же изменения, что и при инфаркте миокарда у человека.

Прежде чем приступить к выполнению основной части экспериментального исследования, мы решили исследовать две модели инфаркта миокарда (путем высокочастотной электродеструкции и лигирования коронарного сосуда), а далее использовать наиболее приемлемую для поставленных задач. Моделирование ИМ с помощью высокочастотного электроповреждения проводилось на фоне наркоза по ниже описанной методике (рис. 2.1).

Затем выполняли торакотомию и высокочастотную электродеструкцию аппаратом ЭХВЧ 120 (по разработ. нами методике) (рис. 2.2).

Рис. 2.1. Обработка операционного поля перед выполнением торакотомии

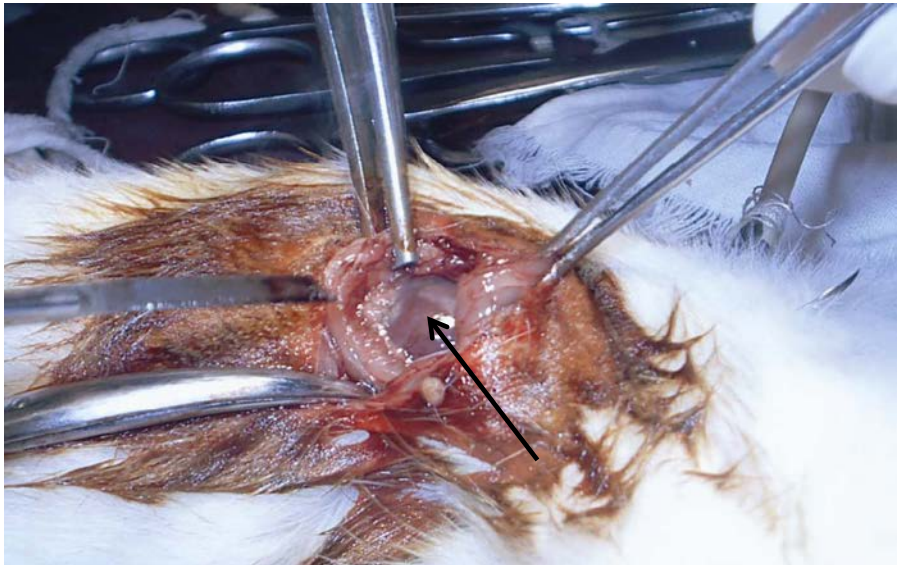


Рис. 2.2. Доступ к сердцу и нанесение электроповреждения (указано стрелкой)

У всех крыс в первые часы после высокочастотной электродеструкции было зарегистрировано типичная для острого ИМ электрофизиологическая картина повреждения миокарда со значительным подъемом сегмента ST выше изоэлектрической линии, которое значительно отличалось от начальной ЭКГ начальной (то есть в начале эксперимента) (рис. 2.3–2.4). В ранние сроки непосредственно после нанесения повреждения формировался очаг коагуляционного некроза в миокарде. При этом отмечалась коагуляция цитоплазматических белков, отсутствие поперечной пестроты волокон, гемолиз эритроцитов в капиллярах (рис. 2.5–2.9).

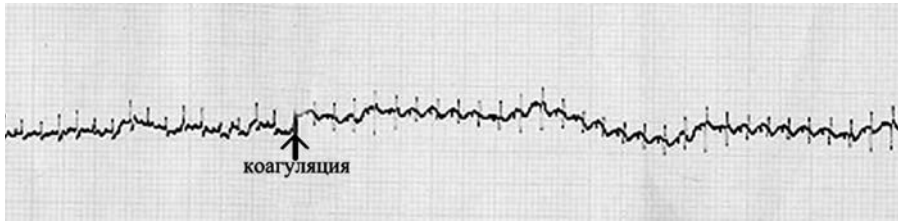


Рис. 2.3. Электрокардиограмма крысы после нанесения электроповреждение

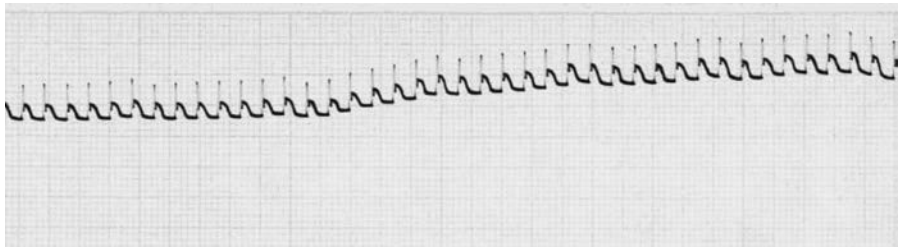


Рис. 2.4. Формирование некроза (первые сутки после электроповреждения)

На третьи сутки после нанесения повреждения формировался очаг коагуляционного некроза, вокруг которого формировалось демаркационное воспаление с наличием в инфильтрате большого количества нейтрофилов. К концу 1 недели эксперимента наблюдались практически полный лизис некротизированных волокон, разрастание грануляционной ткани, количество нейтрофилов, инфильтрирующих участок некроза, уменьшилось, на смену им приходили лимфоциты и макрофаги.

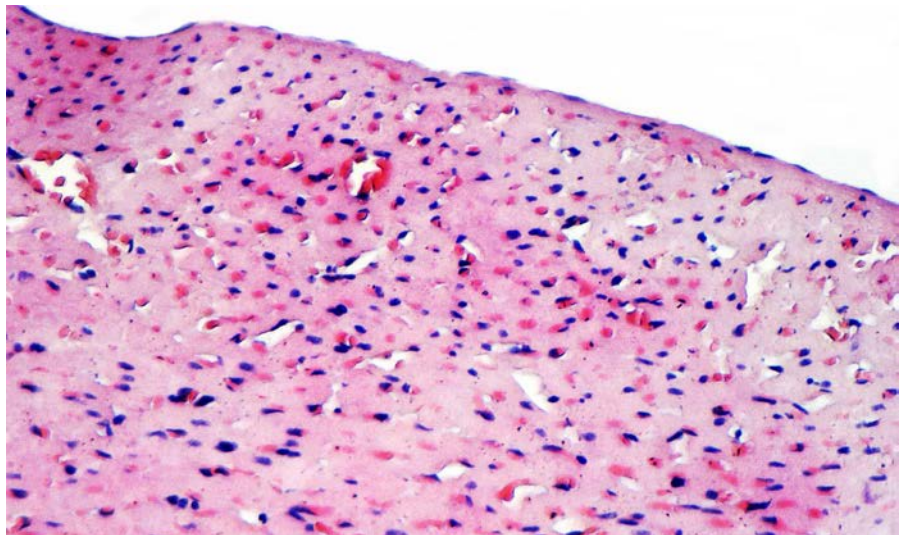


Рис. 2.5. Морфологические изменения в сердце крыс с электроповреждением миокарда. Окраска гематоксилином и эозином. Х120

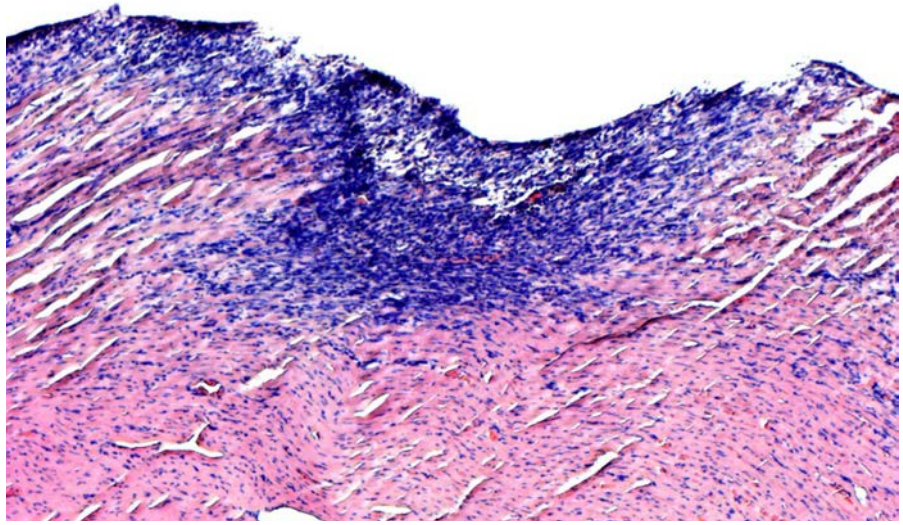


Рис. 2.6. Очаг коагуляционного некроза сразу после нанесения электроповреждения. Коагуляция цитоплазматических, отсутствие поперечной пестроты волокон, гемолиз эритроцитов в капиллярах. Окраска гематоксилином и эозином. Х40

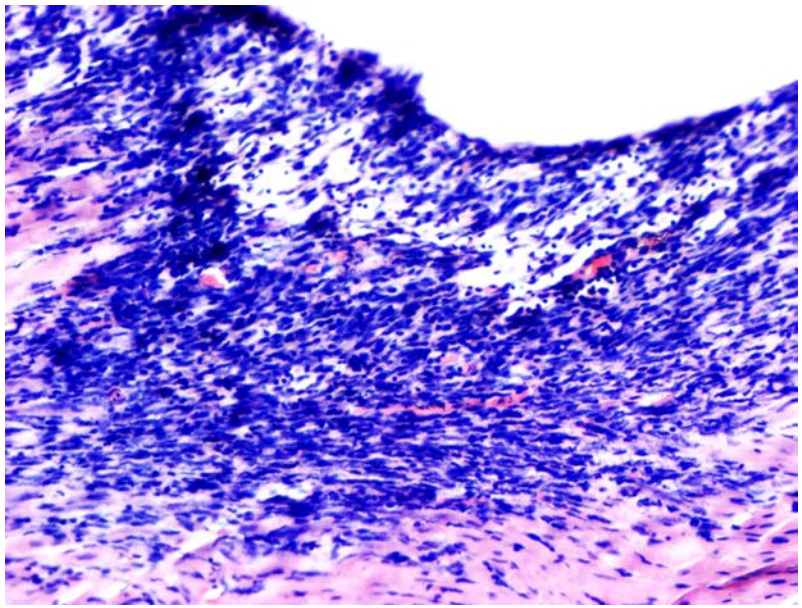


Рис. 2.7. Участок субэпикардиального инфаркта миокарда, который формируется, на 14 сутки после нанесения электроповреждения. Окраска гематоксилином и эозином. Х120

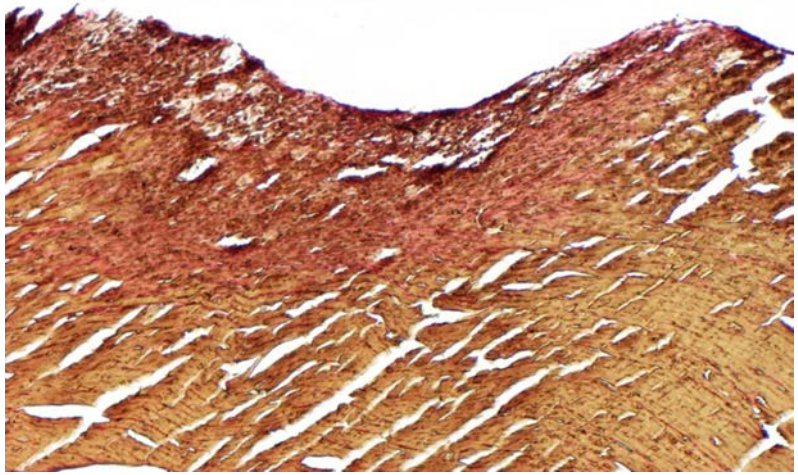


Рис. 2.8. Участок субэпикардиального инфаркта миокарда, который формируется, на 14 сутки после нанесения электроповреждения. Молодые коллагеновые волокна. Окраска по Ван Гизон. Х120

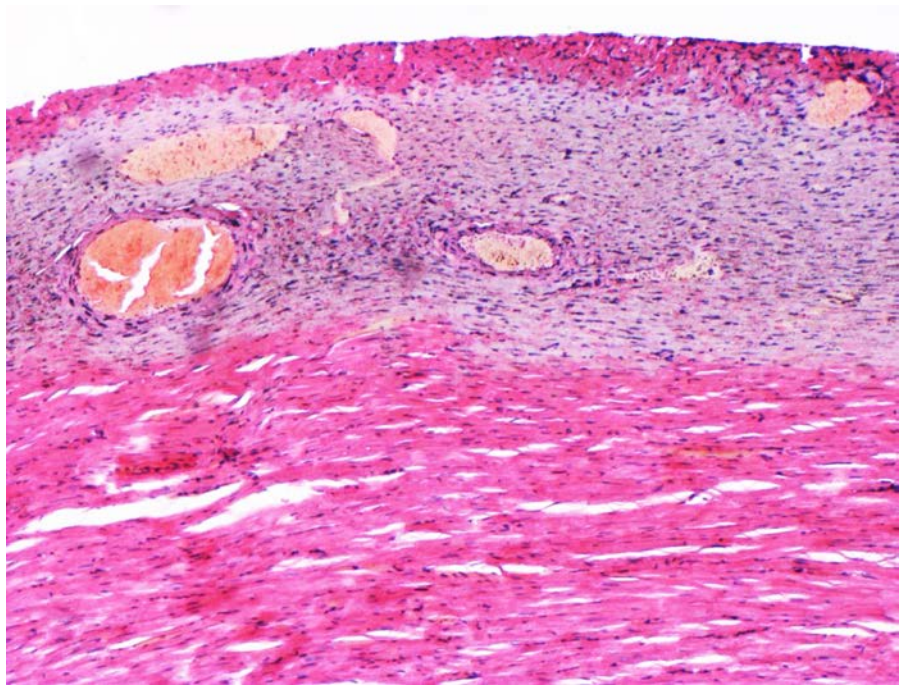


Рис. 2.9. Острая дистрофия миокардиоцитов после электроповреждения. Окраска гематоксилином-эозином. Х45

К концу 2 недели эксперимента в зоне повреждения наблюдалось полное отсутствие некротизированных волокон, на их месте обнаруживалась молодая соединительная ткань с начальными признаками коллагенизации.

Характерно в эти сроки после нанесения повреждения была и электрофизиологическая динамика. Все вышесказанное свидетельствует об адекватности модели в сроки 2 недель для подострого ИМ с переходом в стадию рубцевания.

Следует отметить, что модель технически проста в выполнении по сравнению с лигированием коронарного сосуда, но имеет ряд недостатков: непосредственное воздействие тока высокой частоты и коагуляция всех капилляров и клеточных структур в зоне повреждения. При данной модели не будет зон оглушенного и гибернирующего миокарда. К тому же следует отметить, что несмотря на одинаковую частоту тока и экспозицию у большого количества

животных (более 50 %) получался субэпикардиальный инфаркт, а у других прожигание всей стенки левого желудочка, что приводило к моментальной смерти крысы (около 20 %). Все вышесказанное привело нас к отказу от данной модели острого инфаркта миокарда у крыс. Поэтому в эксперименте мы брали модель ИМ путем лигирования коронарного сосуда.

Экспериментальное исследование проводилось на инбредной линии крыс Вистар-Кайото (№ 202), которые содержались в обычных условиях вивария ГУ «ИНВХ им В. К. Гусака НАМН Украины». Исследования на животных выполнялись при соблюдении международных правил биоэтики, предъявляемые международными организациями и ассоциациями, протокол экспериментального исследования был одобрен локальным этическим комитетом (председатель — проф. А. А. Штутин) и соответствует Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации 2010 г. пересмотра.

В качестве экспериментального животного нами были избраны крысы инбредной линии Вистар-Кайото, это было связано с тем, что мы выполняли аллогенную трансплантацию клеток, а инбредные животные характеризуются высокой степенью гомозиготности по большинству генов, т. е. чистая линия, что в определенной степени нивелировало отторжение клеточного трансплантата и приближало до условий аутотрансплантации, как наиболее перспективного метода в клинической практике. Помимо прочего моделирование ИМ мы выполняли на самках, а использовали культуру клеток полученных из костного мозга самцов, чтобы в дальнейшем по Y-хромосоме верифицировать трансплантируемые клетки в организме реципиента.

Смертность в ходе наших экспериментов при моделировании инфаркта миокарда по нашей методике составляла у крыс Вистар 15 %. Главной её причиной являлись ранние ишемические аритмии. Данный результат полностью соответствует данным, приводимым в оригинальной методике Selye H. (Selye H., 1960), при которой смертность составляет 40–60 % по данным различччных авторов. Для экспериментов отбирали животных с трансмуральными инфарктами, наличие которых определяли визуально и по наличию зубца и инверсии Т на ЭКГ в I отведении. При этом величина зубца составляла не менее 0,15 мВ.

Экспериментальное исследование выполнялось на 182 самках-крыс и 20 самцах (всего 202 животных). Самцы использовались нами в качестве доноров костного мозга трубчатых костей, из которого в дальнейшем получали клеточный трансплантат и 2 самки-крысы с беременностью до 5 суток — для получение эмбрионов. Следует отметить, что группу контроля составили 20 самок, на которых до моделирования инфаркта миокарда и исследовали все основные нормальные физиологические показатели. Эксперимент состоял из 3 частей: в 1 части исследования мы изучали морфофункциональные изменения при ИМ и влияние на них различных способов клеточной кардиомиопластики; во 2 части — мы использовали трансплантацию МСК в различные по сроку введения (через 1, 7 и 14 суток) после моделирования ИМ; в 3 части — исследовалась эффективность различных способов введения клеточного трансплантата. Из 200 самок — 20 самок были взяты для контроля и стандартизации инструментальных и лабораторных данных. В 1 часть исследования вошли 100 животных были разделены на 5 групп (по 20 крыс в каждой соответственно): 1 группа — контрольная — животные на которых была выполнена модель инфаркта миокарда и животные не получали какого-либо лечения; 2 группа — животным, которым на фоне ИМ выполняли трансплантацию эмбриональной культуры клеток; 3 группа — на фоне ИМ выполняли трансплантацию МСК; 4 группа — на фоне ИМ выполняли трансплантацию комитированых МСК; 5 группа — на фоне ИМ выполняли инъекцию Г-КСФ. Необходимо отметить, что в первой части исследования клеточную кардиомиопластику осуществляли через 1 сутки после моделирования ИМ. Во 2 части мы изучали эффективность применения наиболее эффективного способа клеточной кардиомиопластики (по нашим данным МСК) в сроки через 7 и 14 суток (по 20 животных в каждой группе), а контрольную группу составили животные из 1 части исследования, которым была выполнена трансплантация в 1 сутки после моделирования ИМ. В 3 части экспериментальной работы мы изучали наиболее эффективный метод введения клеточного трансплантата (внутрисердечный и интрамиокардальный — по 20 животных в каждой группе) в наиболее перспективное время после моделирования ИМ (в нашем исследовании через 1 сутки) и сравнивали их с группой контроля, которая была из 1 части исследования (внутривенный путь введения). Таким

образом, дизайн эксперимента состоял из 3 поэтапно выполняемпых частей и выглядел следующим образом — рис. 2.10. Клиническая часть исследования описана в соответствующих главах.

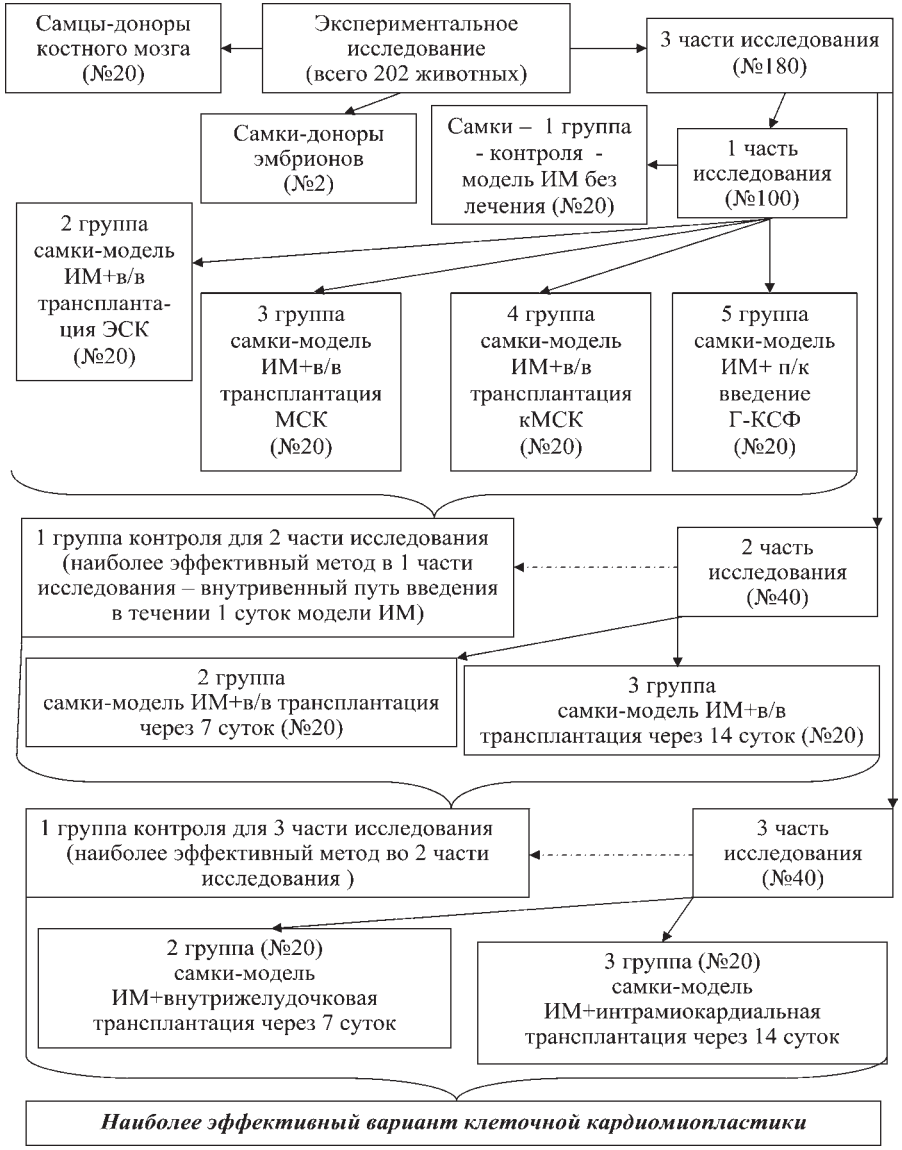


Рис. 2.10. Дизайн экспериментального исследования

Всем животным входящих в три части исследования моделировали ИМ по разработанной нами методике (Патент України №39599; зарєестр. 14.04.08 р. опубл. 10.03.09 р. Бюл. №5).

Оперативные вмешательства проводили в условиях общего обезболивания, путем интраоперитонеального введения калипсола и ксилазина в дозах 60мг/кг и 7,5 мг/кг соответственно. Медикаментозный сон при правильном введении наступал через 2–3 минуты после введения и продолжался 110±5 минут. После достижения 3 ст хирургического наркоза, выполняли трахеостому: линейным разрезом до 1 см по средней линии рассекали кожу животных и тупо зажимом раздвигали мышцы на передней поверхности шей (Патент України № 39647; зарєестр. 10.03.09 р. опубл. 10.03.09 р. Бюл. № 5). Трахею брали на зажим, поперечно в межкольцевом промежутке на 3 мм ниже перстневидного хряща рассекали трахею и в ее просвет вводили пластиковый катетер 14G (диаметр до 2 мм). После чего катетер соединяли с аппаратом искусственной вентиляции легких. Вентиляцию проводили с частотой 50–60 в минуту и объемом 1,5 мл на 100 г веса животного (рис. 2.11). Адекватность вентиляции оценивали по сердечной деятельности и состояния кровоснабжения слизистой оболочки ротовой полости.

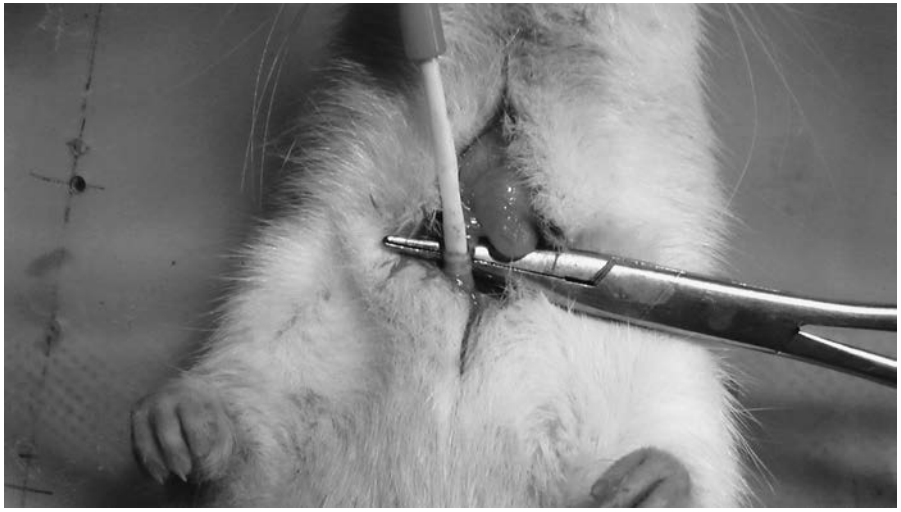


Рис. 2.11. Выполнение трахеотомии крысе и интубация ее через трахеостомное отверстие

Искусственная вентиляция легких при моделировании острого инфаркта миокарда у крыс, необходима по нескольким фактам, во-первых при торакотомии и осуществления доступа к сердцу, происходит вскрытие плевральной полости, учитывая, что анатомически у крысы она общая, то мы получаем двухсторонний пневмоторакс, который помимо шокового состояния за счет контакта воздуха с плеврой, приводит также к пнематическому сдавлению легких. Во-вторых при моделировании крупноочагового инфаркта миокарда, происходит снижение давления и остановка дыхания, сопровождая развитие кардиогенного шока и кардиопульмонального рефлекса. Поэтому если при двух вышеописанных патофизиологических состояниях не будет произведена искусственная вентиляция легких, то животное обречено на смерть.

При моделировании инфаркта миокарда выполняли левостороннюю торакотомию в 5 межреберье, продольно вскрывали перикард. Инфаркт моделировали путем прошивания передней левожелудочковой артерии на уроне нижнего ушка левого предсердия (рис. 2.12), после первого деления, нитью Prolene 7/0 (фирмы Ethicon, Inc.) и лигирования ее, затем нить обрезали, непрерывность перикарда не восстанавливали.

Рис. 2.12. Прошивание передней левожелудочковой артерии

При проведении прошивания коронарной артерии необходимо проявлять осторожность, т. к. малейшее грубое движение может привести к травме и разрыву миокарда, что вызовет кровотечение и летальный исход экспериментального животного. Следует отметить, что прошивается и перевязывается артерия вместе с веной, т. к. разделить их не представляется возможно из-за высокой частоты сокращения сердца крысы, анатомического интимно связанного расположения двух сосудов, а также микроскопические размеры не позволяющие без специального оборудования ижентифицировать данные структуры.

Формирование ИМ у крысы оценивали макроскопически, сразу же после завязывания лигатуры (рис. 2.13).

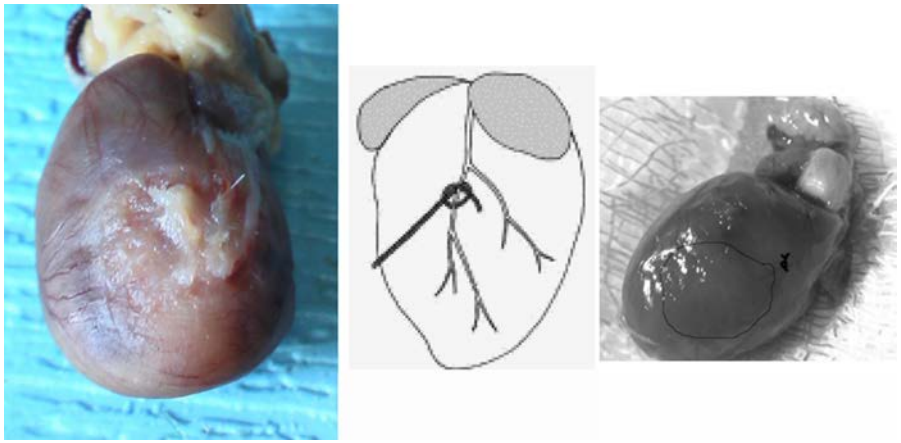


Рис. 2.13. Макропрепарат, прошитой передней левожелудочковой артерии и сформированной зоны инфаркта

После чего грудную полость ушивали послойно и во втором межреберье по среднеключичной линии пунктировали плевральную полость и эвакуировали воздух. Далее отключали аппарат искусственной вентиляции от катетера, при правильно выполненной методике у крысы восстанавливаются адекватные дыхательные движения. Затем убирали катетер из трахеи и ушивали ее проленом 7/0, путем наложения узловых швов. После чего послойно ушивали мышцы на трахеи. Во время выполнения оперативного вмешательства выполняли мониторинг сердечной деятельности (Патент України № 44250; зареєстр. 25.09.09 р. опубл. 25.09.09 р. Бюл. № 18)

аппаратом для Холтеровского исследования (рис. 2.14) Getemed HL5 (Германия).

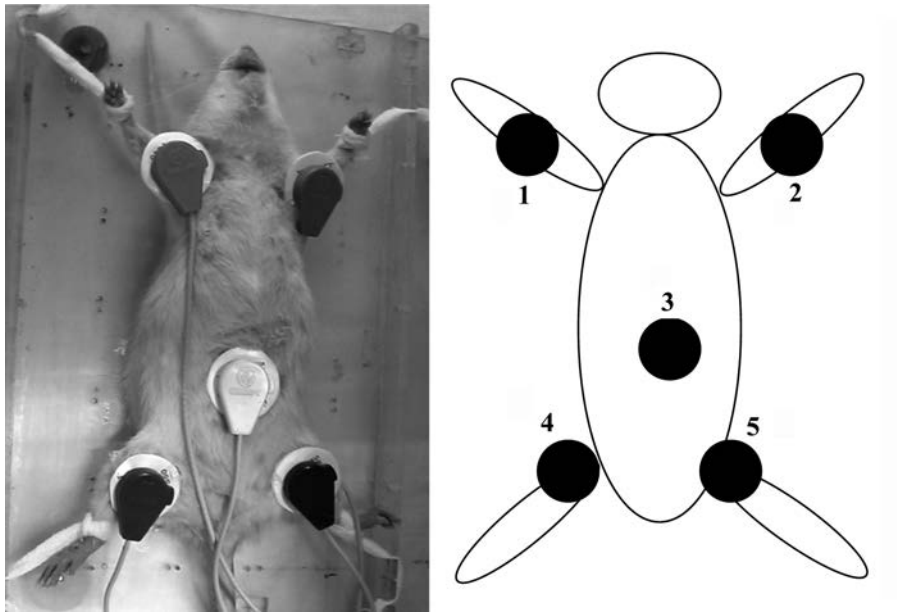


Рис. 2.14. Методика ЭКГ-мониторирования крысы аппаратом для Холтеровского исследования. (Электроды: 1 — красный; 2 — зеленый; 3 — белый; 4 — коричневый; 5 — черный)

После выхода животных из наркоза и восстановления адекватного дыхания, их помещали в улучшенные условия вивария по одному животному в клетку. Операция продолжалась 7–8 минут, после окончания действия наркоза крысе внутримышечно вводили 20 мг антибиотика гентамицин производства «Дарница», Украина, для профилактики гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде.

2.2. Методика проведения электрокардиографии и стресс-нагрузки изопропилнорадреналином

Электрокардиографическим данным принадлежит, как правило, важнейшая роль в диагностике инфаркта миокарда, определение его локализации и размеров. В экспериментах неоднократно было показано, что некроз миокарда находит отображение в изменениях комплекса QRS ЭКГ; повреждение миокарда соотносятся с изменениями сегмента ST (систолический ток повреждения), а проявление ишемии — с характером зубца Т.

В условиях медикаментозного сна, животные фиксировали в положении на спине. Выполняли электрокардиографическое исследование электрической активности миокарда крысы в стандартном I отведении с помощью ЭКГ аппарата ЭК01Т (рис. 2.15). Импульс 1 мВ, амплитуда 20 мм, скорость протяжки ленты 50 мм/с. После того, как мы предварительно зарегистрировали ЧСС, моделировали стрессовую нагрузку внутримышечным введением 1 % раствора изопропилнорадреналина в дозе 3мкг/кг. Следует отметить, что данная методика регистрации ЭКГ не всегда эффективна для определение размеров рубцов. Это обусловлено тем, что при создании инфаркта миокарда повреждается перикард, вследствие чего происходит смещение сердца и соответственно его электрической оси. По этой причине по данным ЭКГ сложно определить локализацию и размер рубца. Поэтому для более эффективного из-

Рис. 2.15. Расположение электродов ЭКГ

учения ЭКГ на протяжении длительного времени в дальнейшем мы использовали отведения по Нэбу.

После этого регистрацию ЧСС повторяли. В дальнейшем измерения проводили каждые 3 минуты в течение 15 минут. Таким образом у нас было контрольные 5 точек изучения реакции сердца на стресс-имитирующие условия.

По окончании измерений электроды кардиографа извлекали, возможные повреждения кожных покровов обрабатывали антисептиком. Для выхода из наркоза животное помещали в теплое, сухое помещение со свободным доступом к воде. В среднем через 10±5 минут животные вели активный образ жизни и через 60 минут не чем не отличались от интактных крыс. В дальнейшем животные находились в обычных условиях вивария ГУ «ИНВХ им. В. К. Гусака НАМН Украины».

При ЭКГ исследованиях в отведениях по Нэбу (рис. 2.16), при которой задняя часть треугольника (D) воспроизводит преимущественно потенциал задней стенки сердца (основание задней стенки левого желудочка); передняя сторона треугольника (A) — в основном потенциалы передней стенки и верхушки сердца; нижняя сторона (J) — преимущественно потенциалы верхушки и перегородки. Отведение D ориентировочно соответствует отведениям $V_{5–6-8}$, A — $V_{4–5}$, J — $V_{2–3}$. Диагностические преимущества данной системы исследователи усматривают в приближении электродов к сердцу, полагая, что они дадут «топографическое» отображение потенциалов сердца, а также в удобстве положения электродов при нагрузочных пробах.

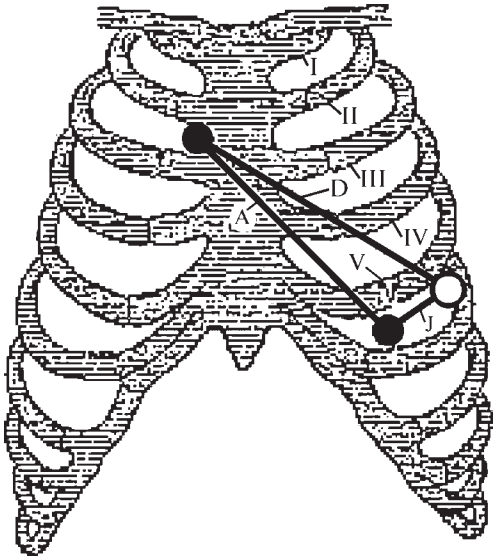


Рис. 2.16. Схематическое изображение отведений по Нэбу

2.3. Методика изучения сократительной функции сердца

Через 1 и 3 мес после создания инфаркта у крыс, находящихся под наркозом изучали показатели функции сердечнососудистой системы. С помощью полиэтиленового катетера (РЕ 10) в правой сонной артерии регистрировали систолическое и диастолическое артериальное давление. Затем катетер продвигали в полость левого желудочка (ЛЖ) и регистрировали параметры функции сердца с помощью монитора Enmove 1200 (рис. 2.17) и систем датчиков (рис. 2.18) производства Mennen medical (Израль).

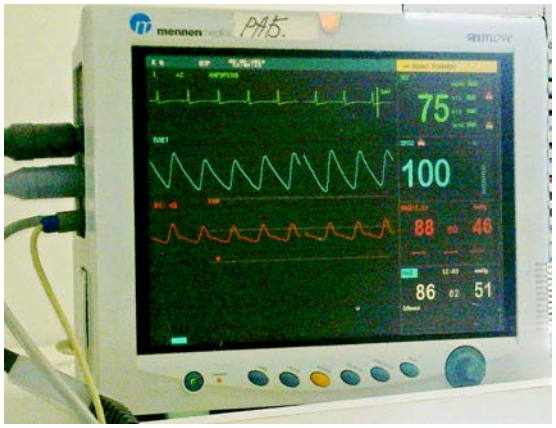


Рис .2.17. Монитор контроля пациента Enmove 1200

Рис. 2.18. Система датчиков для измерения давления инвазивной методикой

Данный монитор подходил к экспериментальному исследованию, т. к. он рассчитан не только для мониторирования взрослых и новорожденных, но и научных исследований (параметры регистрации давления в мм рт. ст. от –10 до +300).

По монитору получали и рассчитывали следующие показатели: систолическое, конечно-диастолическое (КДД) и развиваемое давление (РД); произведение ЧСС на РД — двойное произведение (индекс Катца); максимальную скорость сокращения и расслабления миокарда (+dp/dt и –dp/dt), которые рассчитывали соответ-

ственно по скорости развития и падения давления в ЛЖ. Сократительную функцию сердца оценивали также по интегральному показателю — интенсивности функционирования структур (*ИФС*), характеризующего количество функции, осуществляемой единицей массы органа. *ИФС* рассчитывали по формуле:

$$ИФС = ЧСС \cdot РД / М,$$

где *ЧСС* — частота сердечных сокращений; *РД* — развиваемое давление ($РД = Д_с - Д_д$); *ЧСС·РД* — двойное произведение (индекс Катца); *М* — масса левого желудочка (в мг).

По определяемым параметрам также рассчитывали *СИ* (сердечный индекс) — отношение *МОС* (минутного объема сердца) к массе тела животных. Общее периферическое сопротивление рассчитывали по следующей формуле:

$$ОПСС = АД_{ср}\ [\text{мм рт. ст.}] \ /\ СИ\ [\text{мл/мин/100 г}].$$

2.4. Методика выполнения ультразвукового исследования сердца

УЗИ сердца крыс выполняли в условиях общего обезболивания по вышеописанной методике на аппарате GE Vivid (США) с датчиком 12МГц (рис. 2.19). Изображения были получены с использованием трансдусера 10 S (5,5–12,0 MHz) с высоким пространственным и временным разрешением. Датчик ультразвука был помещен на бритой грудной клетке, выполнялось 2-х мерное и М-режим исследование в соответствии со стандартами American Society of Echocardiography с использованием цветовой и тканевой допплерографии.

Рис. 2.19. Кардиоваскулярная ультразвуковая система GE Vivid (США), датчик 12 МГЦ

Цветная допплерография выполнена на частоте 205–230 кадров в сек., под 30 градусным углом и увеличением изображения от 15 мм используя электронное увеличением компьютера. Тканевое допплеровское эхоисследование отслеживалось в ручном режиме, с последующим высчитыванием средних показателей по данным 3-х последовательных циклов сердца, которые были записаны в цифровом режиме. Систолические показатели измеряемые в 2-D режиме отслеживались с помощью природных акустических маркеров в течении двух последовательных кадров с помощью лицензионного программного обеспечения Echo Pac, GE Medical System прилагающегося к аппарату УЗИ.

2.5. Определение эндотелина-1 и эндотелиального фактора роста сосудов

Определение уровня эндотелина 1 (ЭТ-1) в плазме крови у крыс проводили иммуноферментным методом с использованием набора Endotelin (1–21), фирмы «Biomedica» (Австрия). Концентрацию VEGF определяли методом ИФА с использованием анти-VEGF кроличьих поликлональных антител (Genesis Biotech. Inc., Тайвань).

2.6. Определение активности аденозиндезаминазы эритроцитов

Активность АДА определяли по убыли аденозина в инкубационной среде, которую регистрировали спектрофотометрически при λ=265 нм. Уменьшение концентрации аденозина прямо пропорционально активности АДА.

Состав инкубационной среды: 0,03 мл раствора аденозина +1,5 мл Na-фосфатного буфера, pH 7.0. Концентрация аденозина в инкубационной среде — $3{,}6 \cdot 10^{-5}$ моль/л. В инкубационную среду вносили 0,01 мл разведенного гемолизата эритроцитов.

Измерения проводили на спектрофотометре Genesys 10UV фирмы Thermo Spectronic (США);

Активность фермента рассчитывали по формуле ([А] = нмоль/мин·л):

$$A = \frac{\Delta D \cdot 1000 \cdot 16}{10 \cdot 0{,}0149 \cdot 267{,}24 \cdot 0{,}01},$$

где ΔD — разность оптической плотности ($D_2 - D_1$),
1000 — коэффициент пересчета на 1 л крови,
16 — разведение гемолизата эритроцитов,
10 — время инкубации,
0,0149 — молекулярный коэффициент экстинкции аденозина,
267,24 — молекулярный вес аденозина,
0,01 — количество разведенных эритроцитов.

Определение активности ферментов аспартатаминтрансферазы (АСТ), МВ-фракции креатинкиназа (МВ-КК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) плазмы крови и белков плазмы гаптоглобина и церулоплазмина определяли на приборе Cobas Integra 400+ с использованием стандартных оригинальных наборов фирмы Roche-Diagnostics (Швейцария).

2.7. Получение субклеточных фракций кардиомиоцитов

Сердце нормальных и подвергнутых экспериментальной модели инфаркта миокарда крыс изолировали путем перерезки магистральных сосудистых стволов и помещали на находящуюся во льду чашку Петри. Ножницами удаляли сосуды, остатки соединительной и жировой ткани, вскрывали полость левого желудочка и отмывали от крови охлажденным раствором 50 мМ трис-НС1-буфера. Промытое сердце осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и тщательно измельчали ножницами. Измельченную ткань гомогенизировали в фарфоровой ступке в 3-х кратном объеме охлажденной среды выделения, приготовленной на основе 0,05 М трис-НС1-буфера, рН 7,8 и содержащей 0,3 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 1 % β-меркаптоэтанол, 3 мМ $MgCl_2$. Гомогенат фильтровали через слой капрона и центрифугировали при 3500–4000 % в течение 10 мин. для отделения неразрушенных клеточных элементов и ядер клеток. Для разделения цитоплазматической и митохондриальной фракций клеток миокарда использовали стандартный метод дифференциального центрифугирования: полученную надосадочную жидкость вновь центрифугировали в режиме 15000 % в течение 15 минут (Прохорова, 1982). Полученный супернатант, содержащий цитоплазматические ферменты, использовали для дальнейших исследований. Осадок, содержащий в основном митохондрии, ресуспендировали в той же среде выделения и вновь центрифугировали. Полученный таким образом осадок растворяли в среде следующего состава: 0,05 М трис-НС1-буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 20 % глицерин, 1 % (3-меркаптоэтанол. Митохондрии разрушали с помощью детергента тритона Х-100 (1 % раствор) и методом замораживания-оттаивания. Полученный экстракт использовали в дальнейших экспериментах. Маркерным ферментом митохондрий служила сукцинатдегидрогеназа (СДГ). В качестве маркерного фермента цитоплазмы использовали лактатдегидрогеназу (ЛДГ).

2.8. Определение содержания малонового диальдегида

Принцип используемого метода состоит в том, что при высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК), образуя окрашенный триметиловый комплекс с максимумом поглощения при 532 нм. Для проведения анализа 1 мл биологической пробы помещали в центрифужные пробирки и осаждали балластные белки добавлением 0,4 мл 17 % раствора трихлоруксусной кислоты с конечной концентрацией 5 %. Образующийся осадок отделяли центрифугированием в течение 10 минут при 4000 об/мин на центрифуге типа Т-62. Надосадочную жидкость по 1 мл количественно переносили в пробирки, добавляли по 0,5 мл 0,8 % водного раствора тиобарбитуровой кислоты и помещали пробы на 10 минут в кипящую водяную баню. В качестве контроля использовали пробы, содержащие вместо надосадочной жидкости 0,05 М трис-НС1 буфер (рН 7,8).

Количество МДА рассчитывали по формуле (Стальная И. Д., 1977):

$$МДА = D \cdot Vг / L \cdot M \cdot Vn \cdot €,$$

где $Vг$ — объем гомогената, мл; D — величина оптической плотности, отн. ед.; L — длина оптического пути, см; M — масса навески, г; € — коэффициент молярной экстинции, равный $1{,}36 \cdot 10^{-5}$ $М^{-1}см^{-1}$; Vn — объем вносимой пробы, мл.

2.9. Определение содержания диеновых конъюгатов

Принцип метода определения продуктов ПОЛ состоит в следующем: в ходе ПОЛ на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением максимума в спектре поглощения при 233 нм. В ходе проведения анализа 0,25 мл гомогената суспендировали в течении 15 минут в гомогенизаторе Поттера с 9 мл экстрагирующей смеси гептан-изопропанол в объёмном соотношении 1:1. Полученную суспензию количественно переносили в полиэтиленовые плотно закрытые пробирки в целях избежания испарения. Пробы центрифугировали 10 минут при 4000g на центрифуге типа Т-62. Надосадочную жидкость переносили в градуированные пробирки и добавляли 1/10 объёма дистиллированной воды. После 2-х кратного встряхивания и расслаивания фаз отбирали гептановую фазу. К равным объёмам добавляли по 0,5 мл этанола в объёмном соотношении 1:5 ÷ 1:10. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре СФ-56 при 233 нм. В качестве контроля использовали пробы 0,05 М трис-HCl буфера (pH 7,8).

Содержание диеновых конъюгатов в пробе рассчитывали по следующей формуле (Стальная И. Д., 1977):

$$ДК = D \cdot Vг / L \cdot M \cdot Vn \cdot €,$$

где $Vг$ — объем гомогената, мл; D — величина оптической плотности, отн. ед.; L — длина оптического пути, см; M — масса навески, г; € — коэффициент молярной экстинции при волне 233 нм, равный $2{,}2 \cdot 10^{-5}$ $M^{-1}см^{-1}$; Vn — объем вносимой пробы, мл.

2.10. Определение содержания нитратов и нитритов в плазме крови

Метаболиты *NO (суммарную концентрацию нитрат* и *нитрит ионов) определяли* в *сыворотке крови колориметрическим методом* с *реагентом Грисса* и предварительным восстановлением нитрат—ионов в нитрит хлоридом ванадия.

Плазму получали центрифугированием цельной крови при 3000 об/мин в течение 10 мин и депротеинизировали путем добавления 1/20 объема $ZnS0_4$ в концентрации 300 г/л. После центрифугирования при комнатной температуре (15 мин при 3000 об/мин) в супернатанте проводили восстановление нитратов до нитритов с помощью редуктора нитратов (Круглов, 2000) в присутствии 0,5М NH_4OH, pH 9,0 в качестве буфера (отношение объема плазмы к объему буфера 9:1). После восстановления супернатант смешивали с равным объемом реактива Грисса, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре для развития окраски и измеряли интенсивность поглощения на спектрофотометре КФК-3 (Россия) при 540 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой.

2.11. Методика получения эмбриональной культуры клеток

Для получения культуры плодов крыс использовали крысиные 5-дневные эмбрионы (рис. 2.20–2.21). Для предотвращения бактериальной контаминации их промывали физиологическим раствором, содержащим антибиотики. Промытые эмбрионы крыс обрабатывали механически и ферментативно. Затем помещали в термостат при 37°С на 10–15 минут.

Рис. 2.20. Забор 5-дневного эмбриона крысы из левого рога матки

Через 10–15 минут заингибированную клеточную суспензию центрифугировали и сливали супернатант. Клеточный осадок заливали ростовой средой, содержащей 10 % ЭТС (Биолот, Санкт-Питербург) и помещали в культуральный матрас. Конфлуэнтную культуру клеток промывали, ферментативно снимали с культурального флакона, центрифугировали. Полученную суспензию клеток в физиологическом растворе отдавали на трансплантацию. Культуру клеток вводили крысам из расчета 1000000 на 1 животное.

Рис. 2.21. Эмбрионы крысы помещенные в питательную среду

2.12. Методика получения мезенхимальных стволовых клеток

Для получения культуры мезенхимальных стволовых клеток использовали костный мозг здоровых животных. Для предотвращения бактериальной контаминации их промывали физиологическим раствором, содержащим антибиотики. Костный мозг трубчатых костей крыс обрабатывали механически и ферментативно. Затем помещали в термостат при 37°С на 10–15 минут. Через 10–15 минут заингибированную клеточную суспензию центрифугировали и сливали супернатант. Клеточный осадок заливали ростовой средой, содержащей 10 % ЭТС (Биолот, Санкт-Питербург) и помещали в культуральный матрас. Клеточный осадок ресуспендировали в ростовой среде Игла (Биолот, Санкт-Петербург), содержащей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург). Клетки, в количестве 1,5–2,0´106 кл/мл, помещали в культуральный флакон и культивировали в СО2-инкубаторе при 37°С с 5 % содержание СО2 и 95 % влажности. Среду заменяли через каждые три дня во всех культурах. Перед трансплантацией конфлуэнтную культуру клеток промывали буферным раствором и переводили в суспензию, используя стандартный раствор трипсина (2,5 г) на Хэнксе без Mg2+ и Ca2+ (Sigma, USA). Ингибировали суспензию клеток добавлением сыворотки, затем центрифугировали, супернатант удаляли и суспензию клеток в физиологическом растворе отдавали на трансплантацию. Культуру клеток вводили крысам в бедренную вену из расчета 1 000 000 на 1 животное.

2.13. Методика получения комитированых мезенхимальных стволовых клеток

На 3-и сутки культивирования (рис. 2.22) МСК стимулировали к дифференцировке добавлением в культуральную среду 5-азацитидина в концентрации 6 мкМ/л на 24 часа (Tomita, 1999); после этого среду заменяли на среду IMDM («Gibco», Великобритания), содержащую дополнительно 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург), инсулин 0,4 мкМ/л, дексаметазон 10 нМ/л и фактор роста фибробластов b (FGFb) («Sigma», USA) в концентрации 20 нг/мл. Среду заменяли через каждые 3 суток. Через 2–3 недели культивирования материал был готов для трансплантации животным. Удлинение сроков культивирования (до 4–6 недель) предпринималось нами для выявления состоявшейся в культуре предифференцировки МСК КМ в кардиомиоцитоподобные клетки.

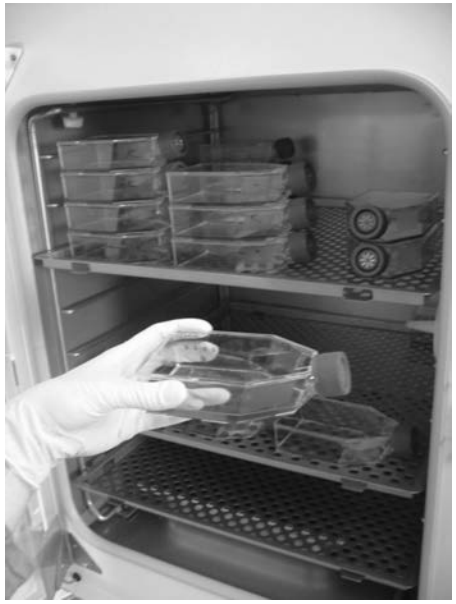


Рис. 2.22. Инкубация культуры

Для подтверждения состоявшейся предифференцировки МСК в кардиомиоцитоподобные клетки использовали иммуногистохимический метод идентификации в культурах этих клеток кардиоспецифического белка — тропонина I Культура предифференцированных МСК через неделю культивирования представляла собой монослой фибробласто-

подобных МСК. На 2-й неделе в культуре МСК мы наблюдали появление продольных кардиомиоцитоподобных клеток (1–2%). к концу 3-й — началу 4-й недели культивирования. К концу 3-й — началу 4-й недели количество тропонин I положительных клеток достигает 35–40 %, эти клетки содержали от 1 до нескольких ядер и спонтанно сокращались. Микрофотографирование, микровидеосъемку и морфологические исследования проводили на исследовательском микроскопе Olympus AX70 (Япония) с использованием программы AnalySIS Pro 3.2 (фирма SoftImaging, Германия) согласно рекомендациям изготовителя программного обеспечения.

Первично выделенную культуру МСК велели на ростовой среде Игла (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия), аскорбиновой кислоты (Sigma, США) и основного фактора роста фибробластов (Sigma, США) для ускорения пролиферации и масштабирование культуры (рис. 2.23).

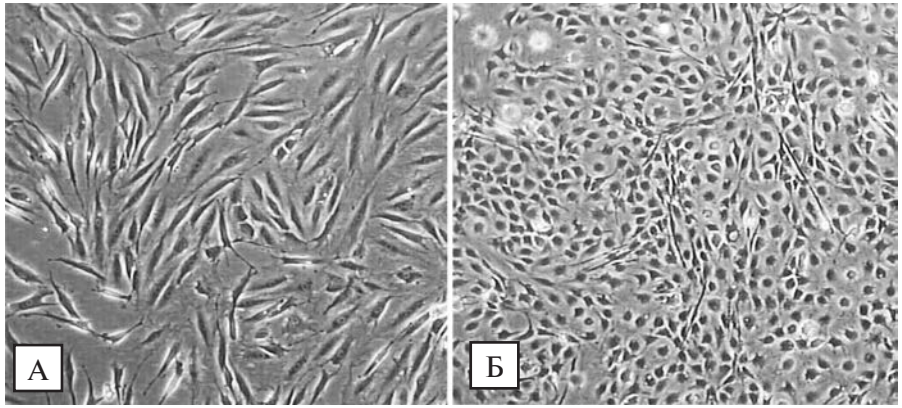


Рис. 2.23. Культура МСК (А) и после масштабирования (Б) (ФКМ Х200)

2.14. Конечный результат дифференцирования мезенхимальных стволовых клеток («потенциирование»)

Для исследования принадлежности клеток, полученных с МСК, к дифференцированным КМЦ и для подтверждения предифференцирования, которое состоялось в кардиомиоцитоподобные клетки, использовали иммуногистохимический метод идентификации кардиоспецифического белка — тропонина I и актина с помощью мышиных моноклональных антител (рис. 2.24).

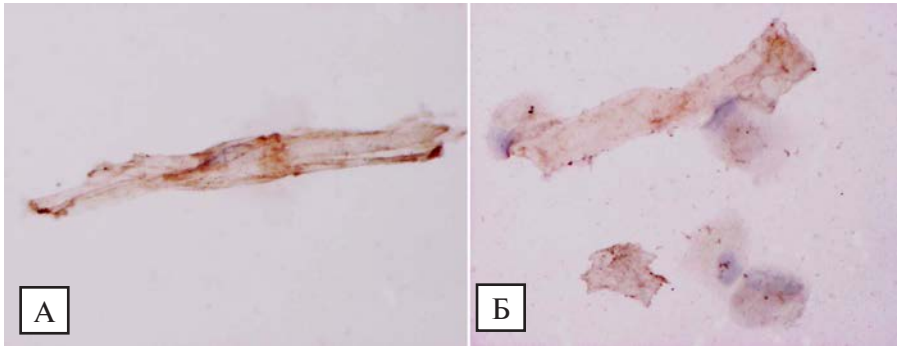


Рис. 2.24. Иммуногистохимическое окрашивание на актин (А) и тропонин (Б)

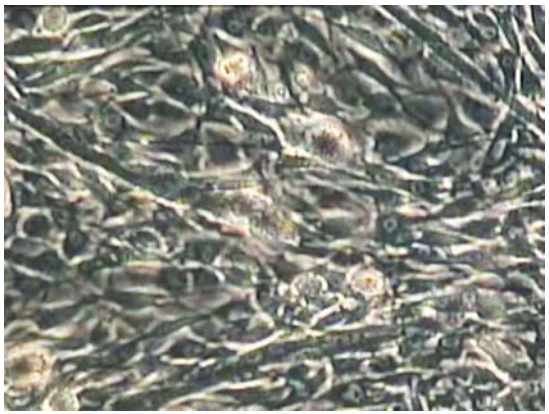


Рис. 2.25. Результаты роста культуры МСК с азацитидином (происхождение кардиомиоцитоподобных клеток, которые сокращаются)

Таким образом, проведенные манипуляции с стволовыми клетками костного мозга инбредных крыс позволили выделить и масштабировать в необходимых для исследования количествах МСК, которые под действием индукторов дифференцирования способны к трансформации в «веретенообразные» клетки (рис. 2.25), которые сокращаются, в культуральной среде, которые соответствуют по физиологическими и иммуногистохимическим характеристикам — кардиомиоцитам, что разрешило перейти нам к следующему этапу исследований — непосредственно к трансплантациям указанных клеток крысам с моделью ИМ.

2.15. Методика интракардиального введения клеточного трансплантата

После моделирования инфаркта миокарда производили инъекцию клеточного трансплантата в зону формирования ишемии с

помощью инсулинового шприца. Операцию заканчивали стандартно по вышеописанной методике.

2.16. Методика внутривенно введения клеточного трансплантата

После наркотизирования, животное фиксировали в положении на спине, линейным разрезом до 0,5 см рассекали шкуру над сосудистым пучком левой нижней конечности в районе верхней трети бедра. Выделяли бедренную вену, последнюю пунктировали инсулиновым шприцом и вводили трансплантат (рис. 2.26). После выполнения манипуляции иглу извлекали из просвета бедренной вены, кровотечение останавливали путем прижатия выходного отверстия в течении 2 минут.

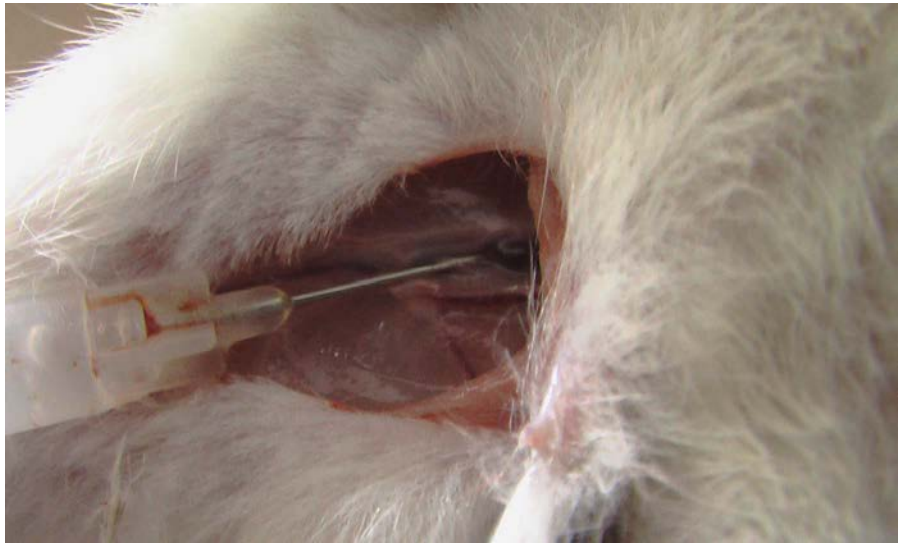


Рис. 2.26. Пункция бедренной вены у крысы

2.17. Методика внутрижелудочкового введения клеточного трансплантата

После наркотизирования, животное фиксировали в положении на спине, линейным разрезом до 0,5 см рассекали шкуру над сосудистым пучком левой нижней конечности в районе верхней трети бедра. Выделяли бедренную артерию, брали ее на держали.

Далее выполняли артериотомию и ее дилатацию, вводили катетер заполненный урографином, для визуализации. Рентгенвизуализацию производили на рентген-аппарате GE Legend 4DX (производство США), катетер подводили максимально близко к левому желудочку и вводили культуру клеток (Патент України № 36860; зарєестр. 10.11.08 р. опубл. 10.11.08 р. Бюл. №21). Правильность выполнения методики подтверждалась распространением контраста в полость левого желудочка и коронарные сосуды, а затем по всему организму (рис. 2.27).

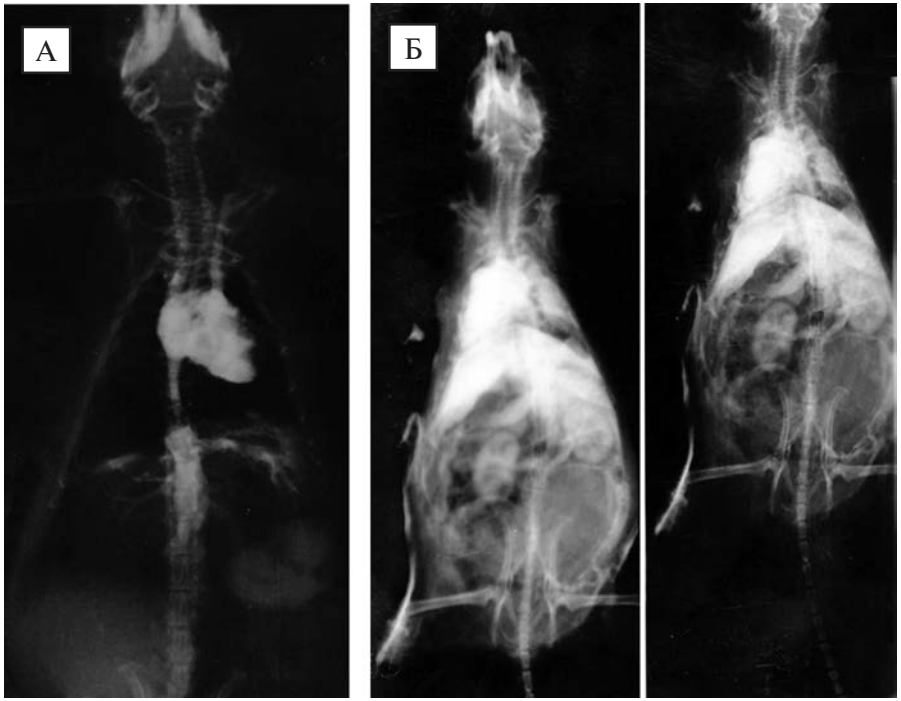


Рис. 2.27. Вентрикулография в момент выполнения трансплантации (А) и через 20 сек. (Б)

2.18. Методы гистологическое исследование

Органы и ткани, предназначенные для морфологического исследования, фиксировали в 10 % растворе забуференого формалина (pH 7,0) на протяжении 24 часов. Перед фиксацией удаляли окружающие ткани.

Далее кусочки ткани обезвоживали и заливали в формалин при температуре не выше 60°С на заливочной станции Leica EG1140 H/C. Срезы толщиной 5±1 мкм приготовляли на ротационном микротоме Microm HM325 с системой переносов срезов (STS) и размещали на стеклах Super Frost (Menzel, Германия). Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. При исследовании срезов сердечной мышцы ее также окрашивали по Ван-Гизон. Окрашенные срезы размещали в канадский бальзам.

Также проводилось окрашивания ткани миокарда иммуногистохимическими методами для выявления актина, тропинина, пролиферирующих клеток. Нами были использованы первичные антитела к актину (клон HHF35, DAKO, Дания), тропонину Т (клон JLT-12, Sigma-Aldrich, Германия), PCNA (клон PC10, DAKO, Дания). Для их визуализации использовали системы детекции DAKO Advance и краситель DAB+. Методика окрашивания соответствовала рекомендациям изготовителя.

Перед окрашиванием срезов, выполняли регенерацию антипенных возможностей ткани в растворе Antigen Retrieval Solution (DAKO, Дания) с использованием микроволновой печи Samsung 430 (Корея). Докрашивание препаратов выполняли гематоксилином Майера.

Для детекции введенных клеток взятых от самца, использовали гибридизацию in situ с определением Y-хромосомы. Процесс гибридизации состоял из 2 этапов. На первом этапе подготовленные срезы после депарафинизации и дегидратации обрабатывали раствором протеиназы К. Срезы денатурировали в гибридизаторе DAKO Hybridizer на протяжении 10 минут при температуре 65°С, а затем при 37°С на протяжении 1 часа. Далее наносили раствор для денатурации, подогретый до 65°С. Затем наносили смесь проб до 12 и Y-хромосомы (ID Labs Biotechnology, США), меченные биотином и FITC, соответственно. После этого срезы покрывали покровным стеклом, края запечатывали уплотнителем и гибризовали при 37° на протяжении 6 часов. На следующий день срезы промывали и проводили детекцию с помощью систем DAKO GenPoint с тирамидною амплификацией (рис. 2.28). Докрашивание препаратов выполняли гематоксилином Майера и размещали в канадский бальзам.

Исследование препаратов с помощью световой микроскопии выполняли на микроскопе Axiostar (Carl Zeiss, Германия). Микро-

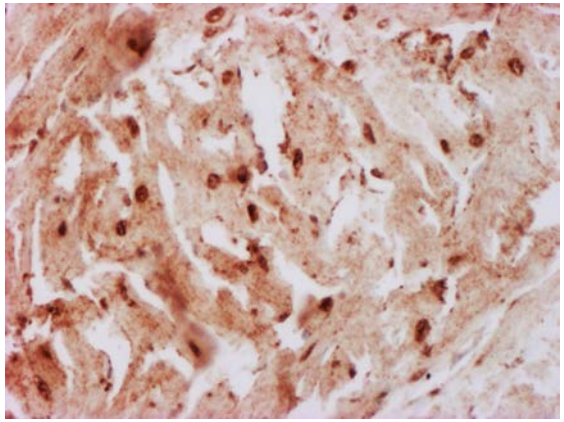


Рис. 2.28. Контрольное окрашивание миокарда крыс-самцов на Y-хромосому методом гибридизации in situ, х150

фотографирование и морфометрическое исследование проводили на исследовательском микроскопе Olympus AX70 (Япония) с использованием программы AnalySis Pro 3.2 (фирма Softimaging, Германия) согласно рекомендациям производителя программного обеспечения. Статистическую обработку выполняли с помощью пакета программ Statistica 6.0.

2.19. Статистические методы исследования

Статистическую обработку данных результатов экспериментального исследования проводили на компьютере Pentium V Core Due 2 с помощью лицензионного пакета программ Microsoft Excel 2010, Statistica 6.0. Для проверки распределения данных на нормальность использовали тест Шапиро-Уилка (W), что позволило использовать его даже при небольшой выборке ($n < 30$). Для выявления существенных различий между средними значениями различных совокупностей сопоставимых групп применяли методы вариационной статистики с использованием t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений при вероятности ошибки I рода $p = 0{,}05$. Данные считали достоверными при $p < 0{,}05$. Для выявления наличия статистической связи между парой признаков применяли корреляционный анализ.

Раздел 3
РЕЗУЛЬТАТЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для инфаркта миокарда (ИМ) характерно развитие ишемического очага некроза сердечной мышцы, который сопровождается запуском каскада метаболических сдвигов для поддержания гомеостаза. Хроническая ишемия миокарда вызывает развитие диффузного кардиосклероза, ремоделирование сердца с развитием ишемической кардиомиопатии. Нарушение баланса между поступлением кислорода и потребности миокарда в нем приводит к некрозу части кардиомиоцитов (КМЦ). Функциональноактивные КМ находятся в состоянии компенсаторного гиперкинеза и гипертрофии. В результате, кроме существующей ишемии миокарда, обусловленной коронарной недостаточностью, развивается также и относительная коронарная недостаточность — несоответствие между повышенными требованиями гипертрофированного участка миокарда и его кровоснабжением. При этом миоциты переключаются с эффективного аэробного на энергетически не выгодный анаэробный путь метаболизм. В результате метаболических сдвигов формируется гипоксический тип метаболизма.

Энергетический гомеостаз КМЦ в условиях нормальной оксигенации обеспечивается благодаря утилизации жирных кислот (до 67 %), глюкозы (17,9 %) и молочной кислоты (16,5 %). В процессе метаболизма они превращаются в ацетил-КоА и подвергаются окислению в митохондриях с образованием CO_2 и H_2O. Развитие ишемии резко меняет метаболизм КМЦ. Дефицит кислорода вызывает снижается аэробного пути окисления свободных жирных кислот и глюкозы. При ишемии глюкоза окисляется преимущественно путем анаэробного гликолиза до молочной кислоты, в результате развивается внутриклеточный лактатацидоз. Лактоацидоз вызывает перегрузку кардиомиоцитов Ca2+ и активирует фосфолипазу A_2, которая обуславливает повреждение мембранных структур, инициацию процессов перекисного окисление липидов (ПОЛ) и развитие воспалительной реакции. В свою очередь, избыток свободных жирных кислот и ацетил-КоА, приводят к дальнейшему ингибированию аэробного метаболизма и активации ПОЛ. Порочный круг метаболизма замыкается. Клеточный ацидоз, локальное воспаление и перекисная модификация липидов, углубляют энергодефицит и лежат в основе развития электрофизиологической и функциональной дисфункции миокарда.

Биохимические исследования по изучению влияния трансплантации МСК на метаболизм миокарда после перенесенного ИМ проводили в нескольких направлениях:

— активность процессов ПОЛ оценивали по уровню накопления продуктов пероксидации (диеновых коньюгатов и ТБК-активных продуктов) и содержанию плазменных белков церулоплазмина и гаптоглобина, как компонентов неферментативного звена антиоксидантной защиты и, одновременно, белков острой фазы воспаления;

— степень некроза характеризовали по активности кардиоспецифических ферментов плазмы АСТ и МВ-фракции креатинфосфокиназы (МВ-КК);

— метаболическими маркерами ишемии были выбраны активности ЛДГ сыворотки крови, которая характеризует уровень накопления лактата и интенсивность гликолиза обеспечивающего энергетические нужды КМЦ, и аденозиндезаминазы (АДА) эритроцитов;

— эффективность ангиогенеза и состояние сосудистого тонуса оценивали по уровню эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), вазоконстриктора эндотелина и выраженного вазодилататора — оксида азота.

Биохимические показатели изучали через 1 сутки после выполнения моделирования ИМ.

3.1. Влияния трансплантации МСК на метаболические показатели плазмы крови

В таблицах 3.1 и 3.2 приведены результаты исследуемых биохимических показателей у экспериментальных животных.

Как следует из приведенных данных, для ишемизированного миокарда характерен повышенный анаэробний обмен и гипоксичесий тип метаболизма. Однако даже максимально усиленный метаболизм не способное продолжительное время защищать уже поврежденный миокард. Гипоксия закономерно вызывает активацию процессов ПОЛ.

Так при моделировании инфаркта миокарда происходит накопление ТБК-активных продуктов (табл. 3.1) с 1,09 ± 0,1 до 2,81 ± 0,8 мкмоль/л (при t = 2,13; p < 0,05). Интересен факт, что в группе с трансплантацией МСК данный показатель равнялся 1,74±0,5 мкмоль/л, что достоверно не отличалось от показателя у здоровых животных (при t = 1,11; p > 0,05). По абсолютному приросту был на 1,2 мкмоль/л ниже чем при ИМ, но тем не менее выше нормы, что свидетельствует, о минимизации повреждающего фактора трансплантацией МСК и снижения интенсивности ПОЛ. При изучении содержания гаптоглобина, мы обнаружили повышение его при ИМ с 37 ± 8 до 58 ± 6 мг/дл (при t = 2,2; p < 0,05), отсутствие разницы между животными с ИМ и ИМ с трансплантацией МСК (при t = 0,63; p > 0,05) и между нормой и ИМ+трансплантация МСК (при t = 0,95; p > 0,05). Иная картина присутствует при изучении содержания церулоплазмина: отсутствует разница между нормой 13,2 ± 1,1 и животными с ИМ 15,5 ± 4,1 (при t = 0,54; p > 0,05), так же нет разницы между ИМ и ИМ+трансплантация МСК 21,5 ± 3,1 (при t = 1,2; p > 0,05). Однако существует значительное повышение церулоплазмина при сравнении нормы и группы с ИМ+трансплантация МСК (при t = 2,5; p < 0,05).

Накопление ТБК-активных продуктов и компенсаторное повышение содержания церулоплазмина и гаптоглобина свидетельствует о срыве компенсаторных механизмов. Соответственно при образовании обширного инфаркта миокарда, происходит разрушение мембран кардиомиоцитов и активация ПОЛ, что отражается в повышении ТБК-активных продуктов. Интересен факт, что трансплантация МСК вызывает значительное снижение концентрацию ТБК-активных продуктов. При изучении уровня белков плазмы с антиоксидантными свойствами установлено, что при ИМ значимо повышается уровень гаптоглобина, хотя в группе с трансплантацией МСК повышение менее выраженное, возможно в связи с уменьшением альтерации миокарда вызванного ишемией. Полученные данные свидетельствуют также о возможной активации перекисного гемолиза эритроцитов, вызванного гипоксией. Значительное почти 2-х кратное повышение церулоплазмина в группе ИМ+трансплантация МСК свидетельствует о стимуляции трансплантированными МСК факторов естественной антиоксидантной системы. Церулоплазмин защищает миокард от прооксидантного действия двухвалентного железа и, таким образом, тормозит процессы ПОЛ.

Таким образом, трансплантация МСК значительно ограничивает скорость ПОЛ и снижает экспрессию антиоксидантных белков плазмы крови.

Таблица 3.1

Показатели перекисного окисление липидов и антиоксидантного статуса кардиомиоцитов при экспериментальном инфаркте миокарда и после трансплантации МСК

Условия эксперимента	Содержимое белков плазмы		ТБК-активные продукты, мкмоль/л
	Гаптоглобин, мг/дл	Церулоплазмин, мг/дл	
Контроль n= 12	37±8	13,2±1,1	1,09±0,1
ИМ n=12	58±6[1]	15,5±4,1	2,81±0,8[1]
ИМ+МСК n=12	50±11	21,5±3,1[2]	1,74±0,5

[1] Различие между нормой и группой с ИМ достоверна (p <0,05).
[2] Различие между группами норма и ИМ+МСК достоверна (p <0,05).

Таблица 3.2

Биохимические маркеры метаболической активности кардиомиоцитов при экспериментальном инфаркте миокарда и после кардиомиопластики МСК

Условия эксперимента	Активность ферментов			
	МВ-КК, Е/л	АСТ, Е/л	АДА, нмоль/мин·л	ЛДГ, Е/л
Контроль n=12	5125±123	150±22	102±32	780±101
ИМ n=12	7700±140[1]	273±15[1]	170±48	1071±215*
ИМ+МСК n=12	5855,5±129[2]	262±28	83±31	671±150[3]

[1] Различие между нормой и группой с ИМ достоверна (p < 0,05).
[2] Различие между группами ИМ и ИМ с трансплантацией МСК достоверна (p < 0,05).
[3] Различие между группами норма и ИМ+МСК достоверна (p < 0,05).

Степень повреждения миокарда при ИМ оценивали по активности кардиоспецифических ферментов креатининкиназы (МВ-КК) и АСТ (табл.3.2). Так, при моделировании ИМ уже через сутки возникает значительное повышение МВ-КК с 5125 ± 123 до 7700 ± 140 Е/л (при t = 13,8; p < 0,001), что свидетельствует об крупноочаговом ИМ у крыс. Существует различие в данных этого показателя между группами ИМ и ИМ + трансплантация МСК, в группе с трансплантацией МСК уровень МВ-КК равняется 5855,5 ± 129 Е/л, что значительно меньше, чем при ИМ у не леченных животных (при t = 9,7; p < 0,001) и не отличается от показателей здоровых животных (при t = 0,62; p > 0,05). Менее специфическим для объема ИМ, оказался АСТ, так в группе с ИМ она повысилась с 150 ± 22 до 273 ± 15 Е/л (при t = 4,6; p < 0,001). В группе с трансплантацией МСК данный показатель равнялся 262 ± 28 Е/л, что не отличалось от группы с ИМ (при t = 0,35; p > 0,05) и было значительно выше чем в норме (при t = 3,1; p < 0,01).

Таким образом, можно сделать выводы, что при обширном ИМ происходит повышение МВ-КК и АСТ, но по чувствительности относительно размеров некроза МВ-КК является более прогностическим, чем АСТ, которая только подтверждает наличие ИМ.

Об уровне кислородного снабжения кардиомиоцитов судили по активности ферментов АДА эритроцитов и ЛДГ плазмы крови. Защитные эффекты аденозина при ишемии показаны в многочисленных работах. Установлено, что АДА играет важную роль при гипоксическом типе метаболизма. Гораздо меньше информации об изменении активности АДА в эритроцитах. Так при ИМ, не установлено достоверных различий активности АДА между группами здоровых животных и крыс с ИМ, 102 ± 32 и 170 ± 48 нмоль/мин*л соответственно при t = 1,17; p > 0,05. Так же не наблюдалась разница в группах ИМ и ИМ+трансплантация МСК — 83 ± 31 нмоль/мин*л при t = 1,5; p > 0,05.

Значения ЛДГ в группе с ИМ значительно выше, чем в группе здоровых животных 1071 ± 215 и 780 ± 101 Е/л соответственно (при t = 1,97; p < 0,05). В группе с трансплантацией МСК он равнялся 671 ± 150 Е/л, что не отличалось от нормальных показателей (при t = 0,6; p > 0,05) и было гораздо ниже, чем в группе животных с ИМ (при t = 2,1; p < 0,05).

Снижение активности ЛДГ косвенно свидетельствует об увеличении оксигенации миокарда и активации аэробных путей окисления энергодающих субстратов.

Вовлеченный в катаболизм пуриновых нуклеозидов фермент АДА локализован в цитоплазме клеток всех тканей и катализирует дезаминирование аденозинина и превращение его в инозин, а дезоксиаденозина — в дезоксиаденозин. Увеличение скорости дезаминирования аденозина препятствует аденозинкиназной реакции, что усугубляет энергодефицит. Накопление гипоксантина, в который превращается аденозин после дезаминирования, усиливает реакции свободнорадикального окисления при участии ксантиноксидазы.

Стимуляция аденозином постсинаптических А1-аденозиновых рецепторов, локализованных в пуринергических синапсах, расположенных на клеточных мембранах сократительных кардиомиоцитов предсердий и желудочков сердца, вызывает уменьшение содержания в них цАМФ и, следовательно, понижение сократимости сердечной мышцы, т. е. реализуется отрицательное инотропное действие аденозина. Помимо специфического действия на А1-аденозиновые рецепторы, аденозин уменьшает активирующее действие на сердце катехоламинов. Источником аденозина эритроцитов является катаболизм АМФ. Можно предположить, что торможение некомпенсированного распада АТФ в эритроцитах уменьшает уровень субстрата для АДА. Снижение активности фермента после трансплантации МСК сохраняет пул аденозина и является хорошим прогностическим признаком.

Таким образом, кардиомиопластика МСК вызывает положительный метаболический эффект. Трансплантация МСК сопровождается снижением активности ферментов АДА, ЛДГ в поврежденном миокарде, что косвенно свидетельствует о повышение энергетического баланса энергообразующих субстратов и снижение степени ишемии миокарда. Снижение накопления продуктов ПОЛ и напряжение неферментативного звена антиоксидантной защиты является хорошим прогностическим критерием восстановления функциональной активности поврежденного миокарда.

Исходя из анализа полученных экспериментальных данных можно предположить два основных направления метаболической терапии МСК при инфаркте миокарда:

— оптимизацию процессов образования и затраты энергии;

— нормализацию баланса между интенсивностью свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты.

3.2. Содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в субклеточных фракциях кардиомиоцитов

После исследования влияния трансплантации МСК на суммарный показатель уровеня пероксидации в плазме крови после перенесенного ИМ, представлялось важным оценить интенсивность ПОЛ непосредственно в кардиомиоцитах на уровне субклеточных фракций. У экспериментальных животных было изучено содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в субклеточных фракциях кардиомиоцитов крысы через 1 час и через сутки после перенесенного ИМ. Содержание МДА и ДК определяли в цитоплазматической и митохондральной фракциях кардиомиоцитов.

Полученные результаты представлены в таблицах 3.3 и 3.4. Ишемия миокарда закономерно вызывала повышение содержание МДА и ДК — продуктов ПОЛ. Через 1 час после ИМ наиболее значимое увеличение содержания первичных продуктов ДК — в 5,8 и 3,3 раза соответственно в цитоплазматической и митохондриальной фракциях. Концентрации МДА после часовой ишемии также увеличивалась: в цитоплазматической фракции кардиомиоцитов отмечено повышение в 4,6 раза, а в митохондральной фракции — в 2,7 раза по сравнению с контролем (табл. 3.2).

Из полученных результатов следует, что в условиях ишемии в субклеточных фракциях кардиомиоцитов процессы пероксидации после перенесенного ИМ выражены в большей степени, чем суммарные показатели плазмы крови. Происходит накопление как диеновых конъюгатов, так и малонового диальдегида, что свидетельствует о наиболее значимой перекисной модификации кардиомиоцитов. Характерно снижение, отношение МДА и ДК, отражающее глубину развития ПОЛ в ткани миокарда в норме и при ИМ.

При изучении показателей первичных и вторичных ПОЛ в субклеточных фракциях кардиомиоцитов крыс через 1 сутки после ИМ (табл. 3.2.2), установлено, что не значительное снижение уровня ДК в цитоплазме и в митохондриях. Суммарный показатель — соотношение МДА/ДК в цитоплазме уменьшался только на 8 % по сравнению с уровнем пероксидации через 60 минут после ИМ.

Таблица 3.3

Содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в субклеточных фракциях кардиомиоцитов крыс в норме и через 60 минут после ИМ

Фракция миокарда	Условия эксперимента	ДК, моль/г сырой массы-$10'^5$	МДА, моль/г сырой массы-$10'^5$	Соотношение МДА/ДК
Цитоплазма	Контроль	1,39 ±0,07	0,146 ±0,006	0,102 ±0,003
	ИМ 60 мин.	8,26 ±0,34[1]	0,652 ± 0,031[1]	0,081 ± 0,005[1]
Митохондрии	Контроль	0,43 ± 0,03	0,047 ± 0,002	0,106 ±0,004
	ИМ 60 мин.	1,48 ±0,04*	0,14 ±0,003*	0,089 ±0,004*

Таблица 3.4

Содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ в субклеточных фракциях кардиомиоцитов крыс через 1 сутки после ИМ и в группе ИМ+МСК

Фракция миокарда	Группа	ДК, моль/г сырой массы-10’5	МДА, моль/г сырой массы-10’5	Соотношение МДА/ДК
Цитоплазма	Контроль n = 10	1,39 ± 0,07	0,146 ± 0,006	0,102 ± 0,003
	ИМ n = 10	7,13 ± 0,24[2]	0,533 ± 0,027[2]	0,072 ± 0,004[2]
	ИМ+МСК n = 10	2,42±0,08	0,188 ± 0,014	0,095 ± 0,005
Митохондрии	Контроль n = 10	0,43 ± 0,03	0,047 ± 0,002	0,106 ± 0,004
	ИМ n = 10	1,21 ± 0,03[2]	0,12 ± 0,011[2]	0,089 ± 0,004[2]
	ИМ+МСК n = 10	0,61 ± 0,04	0,057 ± 0,003	0,094 ± 0,005

Так в группе с ИМ концентрация ДК в цитоплазме равняется 7,13 ± 0,24 моль/г сырой массы-$10'^5$, а в контроле 1,39 ± 0,07 моль/г сырой массы-$10'^5$ при $p < 0,05$. В группе животных с транс-

[1] Различие между нормой и группой с ИМ достоверна ($p < 0,05$).

[2] Различие между нормой и группой с ИМ достоверна ($p < 0,05$).

[3] Различие между группами ИМ и ИМ с трансплантацией МСК достоверна ($p < 0,05$).

[4] Различие между группами норма и ИМ+МСК достоверна ($p < 0,05$).

плантацией МСК установили снижение уровня ДК в цитоплазме до 2,42 ± 0,08 моль/г сырой массы-$10'^5$, что значительно ниже чем в группе ИМ, но тем не менее выше чем в контроле.

Подобная картина наблюдается и при изучении уровня МДА в цитоплазме кардиомиоцитов. Так в контроле уровень МДА равняется 0,146 ± 0,006 моль/г сырой массы-$10'^5$, а при ИМ данный показатель снижался по сравнению с группой животных через 60 минут после перенесенного ИМ, но, тем не менее, оставался гораздо выше контроля — 0,533 ± 0,027 моль/г сырой массы-$10'^5$ при $p < 0,05$. Такая же тенденция наблюдалась и в группе ИМ+трансплантация МСК: уровень МДА был несколько выше контроля — 0,188 ± 0,014 моль/г сырой массы-$10'^5$ при $p < 0,05$, но гораздо ниже показателя группы с ИМ. Особо значимо, что коэффициент отношения (МДА/ДК), который при ИМ значительно снижался до 0,072 ± 0,004 моль/г сырой массы-$10'^5$ при $p < 0,05$, не отличался от контроля в группе ИМ + трансплантация МСК при $p > 0,05$ и составлял 0,095 ± 0,005 моль/г сырой массы-$10'^5$.

При исследовании содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ в митохондриальной фракции кардиомиоцитов наблюдали подобную картину. Так через 1 сутки после моделирования ИМ, уровень ДК по сравнению с нормой снижался незначительно 1,21 ± 0,03 моль/г сырой массы-$10'^5$ при $p < 0,05$. В группе ИМ+трансплантация МСК он составлял 0,61 ± 0,04 моль/г (сырой массы-$10'^5$ при $p < 0,05$, что достоверно было выше чем у здоровых животных, но ниже чем в группе крыс с ИМ.

Содержание МДА в митохондриях кардиомиоцитов в группе животных с ИМ оставалось на высоком уровне 0,12 ± 0,011 моль/г сырой массы-$10'^5$ при $p < 0,05$ по сравнению с контролем, а в группе ИМ+трансплантация МСК он составлял 0,057 ± 0,003 моль/г сырой массы-$10'^5$, что ниже чем в группе с ИМ, но выше по сравнению с показателями здоровых животных при $p < 0,05$. Интересен тот факт, что интегральный показатель МДА/ДК, снижался в группе с ИМ до 0,089 ± 0,004 при $p < 0,05$, а в группе ИМ + трансплантация МСК достоверно не отличался от нормы и составлял 0,094 ± 0,005 при $p < 0,05$.

Таким образом, трансплантация МСК значительно нивелирует активацию процессов ПОЛ в субклеточных фракциях кардиомиоцитов, что сопровождается снижением первичных и вторичных продуктов ПОЛ.

Необходимо подчеркнуть, что показатель МДА/ДК как в цитоплазме, так и в митохондриях кардиомиоцита после трансплантации МСК, возвращался к контрольным значениям, что свидетельствует о нормализации процессов ПОЛ при трансплантации МСК на фоне ишемического повреждения сердца.

Полученные результаты свидетельствует о цитопротекторном действии МСК за счет различных механизмов, приводящих к сохранению большего числа пулов клеток, по сравнению с в группой животных не получавших какое-либо лечение.

3.3. Влияние МСК на эффективность ангиогенеза и состояние сосудистого тонуса

Как известно, основным активатором ангиогенеза при физиологических и патологических состояниях является недостаток кислорода (гипоксия или ишемия), который через активатор транскрипции факторов ангиогенеза — индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), индуцирует экспрессию многих ангиогенных факторов и прежде всего основного регулятора — фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецепторов. VEGF избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток (ЭК), их предшественников и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к нему, увеличивает сосудистую проницаемость, способствуя пропотеванию белков плазмы в околососудистое пространство, которое необходимо для миграции ЭК. VEGF также индуцирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и образование NO, что способствует вазодилатации и стимулирует экспрессию протеаз, разрушающих связи между ЭК и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток.

При изучении уровней вазоконстриктора эндотелина-1, вазодилататора оксида азота и эндотелиального фактора роста сосудов в динамике в течении 1 месяца после ИМ, была определена общая закономерность для всех трех показателей: они достигают максимального значения к 1 суткам после моделировании ИМ у крыс (табл. 3.5).

Так через 1 час после ИМ, концентрация оксида азота возрастает с 0,58 ± 0,03 до 0,86 ± 0,04 мкг/мл, подобная ситуация на-

Таблица 3.5

Динамика изменения концентрации показателей ангиогенеза в сыворотке крови крысы

Показатель	Контроль	Срок после ИМ					Группа
		1 час	6 часов	1 сутки	7 сутки	1 месяц	
Оксид азота (мкг/мл) n = 10	0,58 ± 0,03	0,86 ± 0,04[3]	0,92 ± 0,03	1,12 ± 0,05[3]	0,99 ± 0,04[1]	0,88 ± 0,03[1]	ИМ без лечения
		0,89 ± 0,05[3]	1,04 ± 0,04[1]	1,26 ± 0,03[3]	1,24 ± 0,04	0,96 ± 0,05[3]	ИМ + трансплантация МСК
VEGF (пг/мл) n = 10	66,98 ± 12,47	70,21 ± 11,36	126,72 ± 24,05[1]	220,45 ± 22,13[1]	134,89 ± 25,24	89,74 ± 21,38	ИМ без лечения
		71,42 ± 13,45	134,86 ± 28,11[1]	288,22 ± 23,46[3]	189,57 ± 28,47[1]	132,74 ± 19,87	ИМ + трансплантация МСК
Эндотелин-1 (моль/мл) n = 10	5,2 ± 0,4	10,6 ± 0,7[3]	12,8 ± 0,5[1]	12,9 ± 0,4	8,8 ± 0,3[3]	5,3 ± 0,4[3]	ИМ без лечения
		10,4 ± 0,5[3]	12,8 ± 0,6[2]	9,1 ± 0,3[3]	6,9 ± 0,4[3]	5,1 ± 0,2[3]	ИМ + трансплантация МСК

[1] При сравнении с предыдущим показателем $p < 0,05$.
[2] При сравнении с предыдущим показателем $p < 0,01$.
[3] При сравнении с предыдущим показателем $p < 0,001$.

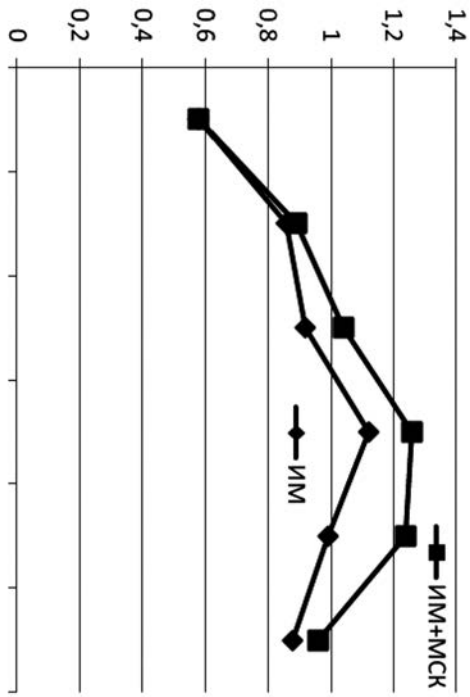


Рис. 3.1. Динамика концентрации оксида азота (мкг/мл) в разные сроки эксперимента

блюдается и в группе ИМ + трансплантация МСК (рис. 3.1). Далее, через 6 часов в группе с ИМ содержание NO возрастает до 0,92 ± 0,03 мкг/мл и достигает максимального значения к концу 1 суток и составляет 1,12 ± 0,05 мкг/мл. К 7 суткам после ИМ уровень оксида азота снижается и эта тенденция сохраняется до конца 1 месяца, когда уровень вазодилататора достигал 0,88 ± 0,03 мкг/мл, что гораздо выше нормы. В группе ИМ + трансплантация МСК также максимальный пик концентрации NO приходится на 1 сутки и равен 1,26 ± 0,03 мкг/мл. Во все временные сроки после ИМ концентрация оксида азота продолжала снижаться. Через 1 месяц после ИМ уровень NO достигал 0,96 ± 0,05 мкг/мл, тем не менее оставался на более высоком уровне по сравнению с нормой. Следует отметить, что начиная с 7 суток концентрация оксида азота в группе ИМ + трансплантация МСК была выше чем в группе ИМ при $t = 4,42$; $p < 0,001$, а к концу опыта между показателями двух групп достоверных различий не наблюдали.

Полученные результаты свидетельствуют о повышении выработки оксида азота в течение первых 7 суток после трансплантации МСК, а, следовательно, о вазодилататорном эффекте после трансплантации МСК в острый постинфарктный период.

При изучении динамики вазоконстриктора эндотелина-1 в группе ИМ, установили 2-х кратное увеличение содержания по сравнению с нормой (10,6 ± 0,7 моль/мл). К концу 7 суток концентрация эндотелина-1 сохранялась на высоком уровне (рис. 3.2). Максимальный пик 12,9 ± 0,4 моль/мл данный показатель достигал к 1 суткам, а к концу опыта возвращался к норме. В группе ИМ + трансплантация МСК также к концу 1 часа после моделирования инфаркта миокарда отмечалось возрастание эндотелина-1 до 10,4 ± 0,5 моль/мл. Также как и в предыдущей группе уровень вазоконстриктора достигает максимального пика к концу 1 суток. Далее с 1 суток уровень эндотелина снижается до 9,1 ± 0,3 моль/мл и к концу 1 месяца не отличается от показателей здоровых животных. Следует отметить, что начиная с 1 суток концентрация эндотелина-1 значительно ниже в группе ИМ + трансплантация МСК по сравнению с ИМ.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствует о снижении степени ишемии миокарда после трансплантации МСК, что приводит к снижению уровня такого мощного возоконстриктора как эндотелин-1.

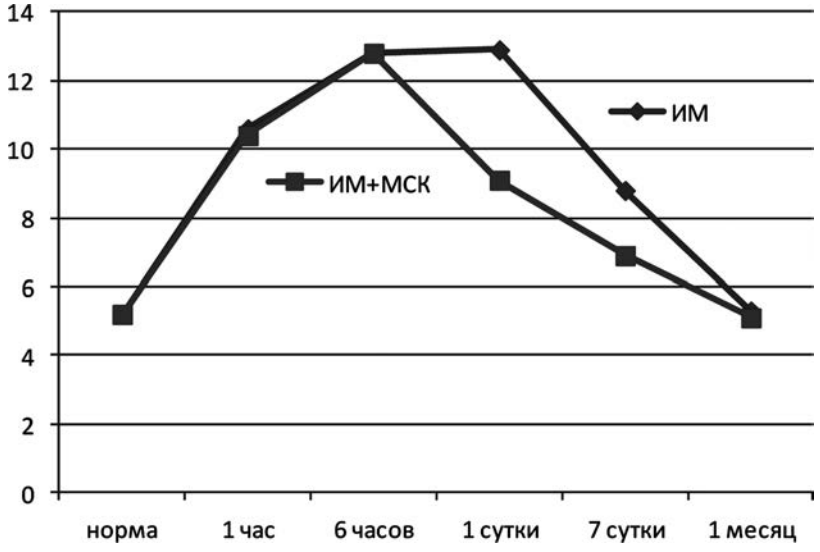


Рис. 3.2. Динамика концентрации эндотелина 1 (моль/мл) в разные сроки эксперимента

При изучении динамики концентрации VEGF (рис. 3.3), который отражает интенсивность ангиогенеза, установили, что до 6 часов после развития ИМ, данный показатель не отличался от контрольных значений.

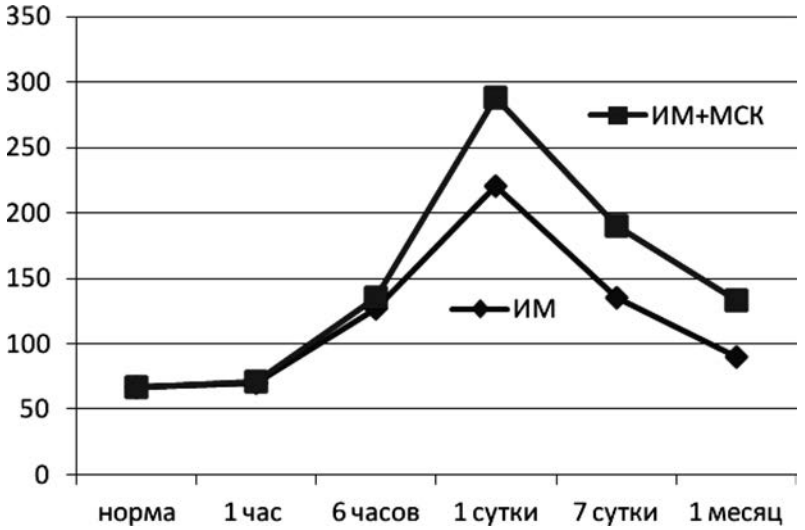


Рис. 3.3. Динамика VEGF (пг/мл) в разные сроки эксперимента

К 6 часу в группе с ИМ содержание VEGF возрастало до 126,72 ± 24,05 пг/мл и достигало максимального пика к концу 1 суток — 220,45 ± 22,13 пг/мл. К концу месяца VEGF снижался до 89,74 ± 21,38 пг/мл, что не отличается от нормы при $t = 0,91$; $p > 0,05$. В группе ИМ + трансплантация МСК также к 6 часу наблюдали значительное повышение уровня VEGF до 134,86 ± 28,11 пг/мл и достижение максимума к концу 1 суток — 288,22 ± 23,46 пг/мл. Далее VEGF незначительно снижается и к концу опыта составлял 132,74 ± 19,87 пг/мл, что в 2 раза выше нормы при $t = 2,8$; $p < 0,05$. Следует отметить, что начиная с 1 суток и до конца наблюдения, данный показатель в группе ИМ + трансплантация МСК был выше, чем в группе ИМ. Данный факт свидетельствует о том, что трансплантация МСК стимулирует ангиогенез, усиливает экспрессию VEGF в течение всего срока наблюдения.

Таким образом, анализируя влияние трансплантации МСК на показатели сосудистого тонуса после ИМ, установили, что миопла-

стика уже с 1 суток оказывала выраженное вазодилататорное действие, что отражалось в повышении уровня NO с одновременным снижением содержания вазоконстриктора эндотелина-1. Характерно, что повышенное содержание оксида азота сохранялось до конца наблюдения.

Как известно, NO отвечает за эффект релаксирующего фактора, выделяемого эндотелием. В ответ на ишемическое повреждение эндотелия сосудов вырабатывает семейство аминопептидов, к которым относится эндотелин1. Полагают, что вазодилататорное действие NO направлено против вазоконстрикторного эффекта эндотелинов. Полученные результаты позволяют сделать вывод о снижении степени ишемии у животных после трансплантации МСК.

Высокий уровень фактора роста эндотелия сосудов VEGF у животных после перенесенного ИМ, на фоне трансплантации МСК, является хорошим прогностическим признаком. Трансплантация МСК позволяет целенаправленно изменить процессы ремоделирования миокарда, повлиять на его регенерацию и в конечном счете улучшить функцию сердечной мышцы.

Полагают, что восстановление функции миокарда может быть достигнуто путем увеличения количества сократительных клеточных элементов в миокарде и/или путем повышения функционального резерва кардиомиоцитов реципиента за счет стимуляции в них процессов внутриклеточной регенерации, изменения биомеханических свойств сердечной мышцы, улучшения васкуляризации миокарда.

Раздел 4
РЕЗУЛЬТАТЫ УЛЬТРАЗВУКОВОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ И МАКРОМОРФОМЕТРИИ

4.1. Показатели макроморфометрии

В исследования вошли 100 животных, которые были разделены на 5 групп (по 20 крыс в каждой соответственно): 1 группа — контрольная — животные на которых была выполнена модель инфаркта миокарда и животные не получали какого-либо лечения; 2 группа — животным, которым на фоне ИМ выполняли трансплантацию фетальной культуры клеток; 3 группа — на фоне ИМ выполняли трансплантацию МСК; 4 группа — на фоне ИМ выполняли трансплантацию коммитированых МСК; 5 группа — на фоне ИМ выполняли инъекцию Г-КСФ. Необходимо отметить, что в первой части исследования клеточную кардиомиопластику осуществляли в течении 1 суток после моделирования ИМ.

При исследовании массы сердца у крыс в срок 1 месяц после начала лечения, мы видим, что нет различий между показателями группы контроля 1,064 ± 0,025 г и 3 группой животных (трансплантация МСК) 1,054 ± 0,02 г при $t = 1,34$, $p = 0,18$ (табл. 4.1), в остальных группах было существенное уменьшение массы сердца. Причем следует отметить, что нет различия в массе сердца во 2 и 5 группах при $t = 0,001$, $p = 1,0$.

При сопоставлении данных массы левого желудочка мы получили, следующую картину: не было различий между группой контроля 0,62 ± 0,05 г и 3 группой 0,6 ± 0,05 г при $t = 1,15$, $p = 0,25$, в остальных группах масса ЛЖ значительно меньше нормы. Причем так же, не было различий между показателями 1 и 2 группы при $t = 0,79$, $p = 0,43$, а также между 2 и 5 группами при $t = 0,01$, $p = 1,0$.

При изучении изменений интегрального показателя LW/BW мы отметили, что между нормой 0,2 ± 0,02 и 3 группой 0,2 ± 0,02 нет различий при $t = 0,93$, $p = 0,36$. Однако существует различия группы контроля по сравнению с 4 группой 0,18 ± 0,01 при $t = 4,5$, $p = 0,001$; 2 группой 0,16 ± 0,01 при $t = 8,67$, $p = 0,001$; 5 группой

0,16 ± 0,01 при t = 9,69, p = 0,001, а также 1 группой 0,16 ± 0,01 при t = 9,18, p = 0,001. Причем следует отметить, что нет различий в показатели между 1 и 2 группой при t = 0,87, p = 0,4; 1 и 5 группой при t = 0,14, p = 0,99, а также между 2 и 5 группами при t = 0,84, p = 0,4.

Таблица 4.1

Морфометрические показатели сердца крысы[1]

Показатель	Группа					
	Контроль	1	2	3	4	5
BW — масса тела (г)	302,4 ± 13,2	301,5 ± 12,8	299 ± 15,9	300 ± 14,2	303,9 ± 14,6	303,2 ± 12,4
HW — масса сердца (г)	1,064 ± 0,025	1,029 ± 0,012	1,039 ± 0,015	1,054 ± 0,02	1,045 ± 0,02	1,039 ± 0,013
LW — масса ЛЖ (г)	0,62 ± 0,05	0,48 ± 0,018	0,49 ± 0,017	0,6 ± 0,05	0,56 ± 0,024	0,49 ± 0,019
HW/BW (г/г)	0,354 ± 0,019	0,345 ± 0,021	0,354 ± 0,02	0,355 ± 0,02	0,354 ± 0,019	0,349 ± 0,018
LW/BW (г/г)	0,2 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01

Таким образом, через месяц после применения различных способов кардиомиопластики, масса сердца в группе животных с трансплантируемыми МСК не отличается от нормы и не существует различия в группах животных с внутривенным введением ЭСК и подкожным Г-КСФ. При изучении массы левого желудочка, наблюдается сохранение данного показателя в группе с трансплантируемыми МСК, наиболее близкий показатель к норме является в группе с трансплантируемыми коммитируемыми МСК, а в группах с трансплантацией ЭСК, введения Г-КСФ и у животных с ИМ без какого-либо лечения разницы в массе левого желудочка нет. Интересен факт, что при изучении интегрального показателя отношения массы левого желудочка к массе тела животного, мы видим подобную картину, в группе с трансплантацией МСК и нормой, наиболее близким показателем к норме является группа с трансплантацией кМСК, причем в группах ИМ без лечения, трансплантации ЭСК, подкожного введения Г-КСФ разницы не было (p > 0,05). Интересен тот факт, что при изучении интегрального показателя отношения массы сердца к массе тела животного разницы между группами не было, это можно объяснить тем, что уменьшение массы левого желудочка происходит за счет замены нормального миокарда рубцовой тканью и его растяжению, что приводит к снижению насосной функции сердца. Далее процесс ремоделирования приводит к митральной регургитации крови и увеличению объема левого предсердия, а это в свою очередь к увеличению давления в малом круге кровообращения. Данный патофизиологический процесс сопровождается гипертрофией правых отделов сердца, за счет чего HW/BW остается неизменным.

[1] Статистическая достоверность показателей представлена в тексте.

4.2. Данные ультразвукового исследования

Для подтверждения наших предположений мы выполняли всем животным ультразвуковое исследование функции сердца (табл. 4.2). Нами изучались пять основных показателя функции левого желудочка: конечный диастолический и систолический внутренние диаметры левого желудочка, ударный объем, а также фракцию укорочения и выброса. При анализе полученных данных, мы видим, что по аналогии с морфометрическими показателями,

Таблица 4.2

Ультразвуковые показатели функционирования сердца у крыс[1]

Показатель	Группа					
	Контроль	1	2	3	4	5
LVIDd, mm	6,16 ± 0,12	7,19 ± 0,16	6,68 ± 0,18	6,18 ± 0,11	6,29 ± 0,15	6,79 ± 0,16
LVIDs, mm	2,82 ± 0,18	3,82 ± 0,11	3,53 ± 0,14	2,85 ± 0,14	2,91 ± 0,12	3,51 ± 0,14
FS, %	45,3 ± 1,7	26,8 ± 0,8	27,7 ± 0,6	45,0 ± 0,9	43,7 ± 0,11	28,8 ± 0,8
EF, %	76,9 ± 2,5	55,3 ± 3,4	56,4 ± 4,6	75,8 ± 3,2	71,9 ± 2,7	56,7 ± 4,1
SV, ml	0,25 ± 0,08	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,24 ± 0,07	0,23 ± 0,03	0,14 ± 0,03

[1] Статистическая достоверность показателей представлена в тексте. LVIDd — end-diastolic left ventricular internal dimensions (конечный диастолический внутренний диаметр левого желудочка); LVIDs — end-systolic left ventricular internal dimensions (конечный систолический внутренний диаметр левого желудочка); FS — fractional shortening (ФУ, фракция укорочения); EF — ejection fraction (ФВ, фракция выброса); SV — stroke volume (УО, ударный объем).

фракция выброса в группе с трансплантацией МСК не отличается от здоровых животных (при $t = 0,16$; $p < 0,05$) и равняется $55,0 \pm 0,9$ %. Следует отметить, что в группе с ИМ без лечения ФУ снижалась до $26,8 \pm 0,8$ % ($t = 4,53$; $p > 0,05$), при сравнении данного показателя в остальных группах, отмечается наиболее близкий по значению к норме в группе с трансплантацией кМСК ($t = 0,94$; $p < 0,05$), что не отличается от 3 группы ($t = 1,43$; $p > 0,05$). Значительное снижение ФУ наблюдается во 2 ($t = 4,21$; $p < 0,05$) и 5 ($t = 3,5$; $p < 0,05$) группах до $27,7 \pm 0,6$ и $28,8 \pm 0,8$ % соответственно, что приближается к значению 2 группы. Такая же тенденция наблюдается и при изучении LVIDd и обратно пропорциональная связь показателя LVIDs.

При изучении ФВ, мы видим, что в норме у крыс она равняется $76,9 \pm 2,5$ %, уже через месяц после моделирования ИМ, он снижается до $55,3 \pm 3,4$ % ($t = 5,12$; $p < 0,001$). Причем в группе с трансплантацией ЭСК и введения Г-КСФ нет различия с 1 группой, $56,4 \pm 4,6$ ($t = 0,19$; $p > 0,05$) и $56,7 \pm 4,1$ ($t = 0,3$; $p > 0,05$) соответственно. Однако в 3 и 4 группе ФВ гораздо выше, чем в 1 и равняется $75,8 \pm 3,2$ ($t = 4,4$; $p < 0,001$), а также $71,9 \pm 2,7$ ($t = 3,82$; $p < 0,001$) соответственно. Следует отметить, что нет различий в показатели ФВ между нормой и 3, 4 группой — $75,8 \pm 3,2$ ($t = 0,27$; $p > 0,05$) и $71,9 \pm 2,7$ ($t = 1,36$; $p > 0,05$). При изучении УО, мы наблюдали подобную картину, так при моделировании ИМ, УО снижался с $0,25 \pm 0,04$ до $0,13 \pm 0,03$ мл при $t = 2,4$; $p < 0,05$, во 2 группе до $0,147 \pm 0,04$ при $t = 1,96$; $p < 0,05$, в 5 до $0,14 \pm 0,03$ при $t = 2,2$; $p < 0,05$, а в 3 и 4 группах не отличался от нормы и равнялся соответственно $0,24 \pm 0,02$ ($t = 0,22$; $p > 0,05$) и $0,23 \pm 0,03$ ($t = 0,4$; $p > 0,05$). УО был равным в 2 и 5 группе по сравнению с 1 группой при $t = 0,2$; $p > 0,05$ и $t = 0,24$; $p > 0,05$ соответственно. ПО сравнению с 1 группой в 3 и 4 показатели были значительно выше при $t = 3,05$; $p < 0,01$ и $t = 2,36$; $p < 0,05$ соответственно. Таким образом мы видим четкую аналогию в динамике ФВ, ФУ и УО, а также КДВД и КСВД левого желудочка.

Из качественных характеристик следует отметить: наличие систолического утолщения пораженного сегмента миокарда при ИМ в систолу либо снижено, либо вообще отсутствует. В сроки от 1 месяца отмечается истончение пораженного сегмента миокарда. Истонченный сегмент обладает повышенной эхогенностью по сравнению с прилегающими сегментами вследствие большего количества соединительной ткани (рис. 4.1).

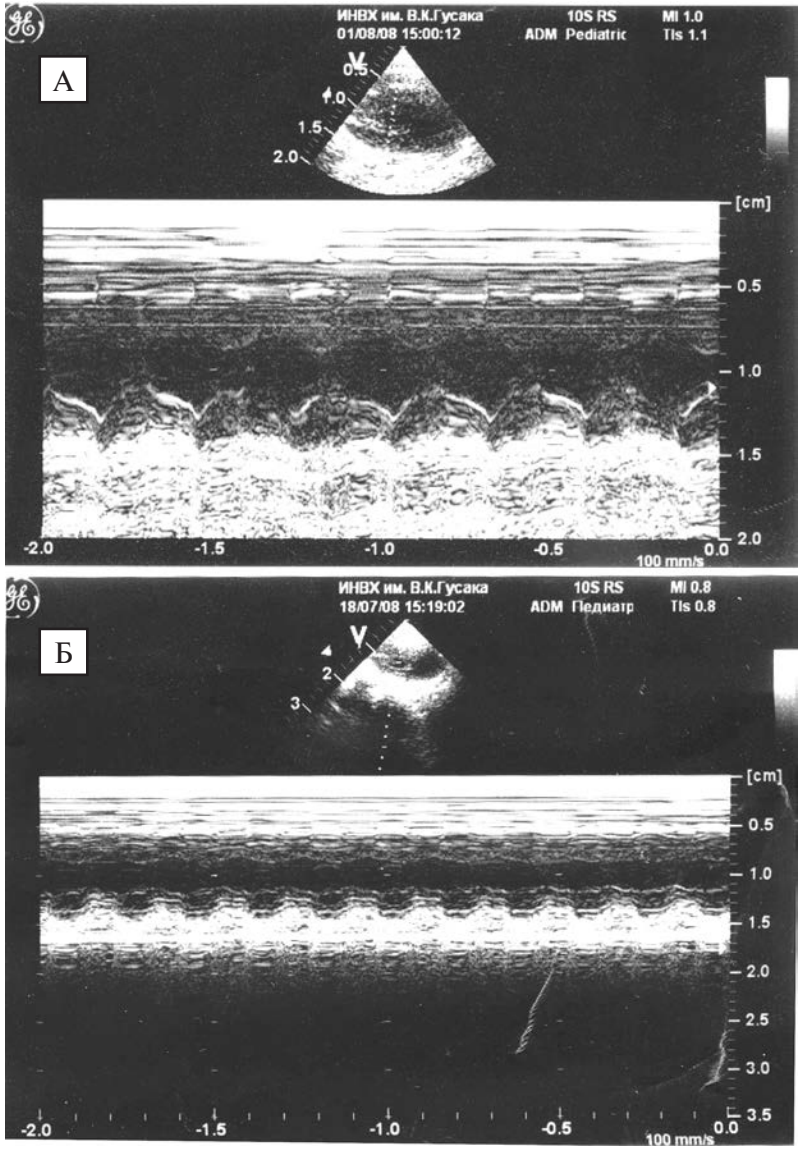


Рис. 4.1. ЭХО-кардиография сердца у крысы в норме (А) и через 1 месяц после моделирования ИМ (Б)

Визуализируется нарушение подвижности стенки: гипокинезия, акинезия или дискинезия, т. е. движение пораженного сегмента в систолу внутрь частично снижено, отсутствует или пародоксально направлено наружу. Сегменты стенки противоположной пораженной при остром инфаркте миокарда, как правило, компенсаторно гиперкинетичны. У ряда животных в 1 группы визуализировалась аневризма левого желудочка, в виде выпячивания «молчащей» стенки.

На рис. 4.2 представлено ЭХО-КГ крыс в норме и 3 группе, четко видны номинальные изменения в 3 группе, являющимися по сути вариантом нормы.

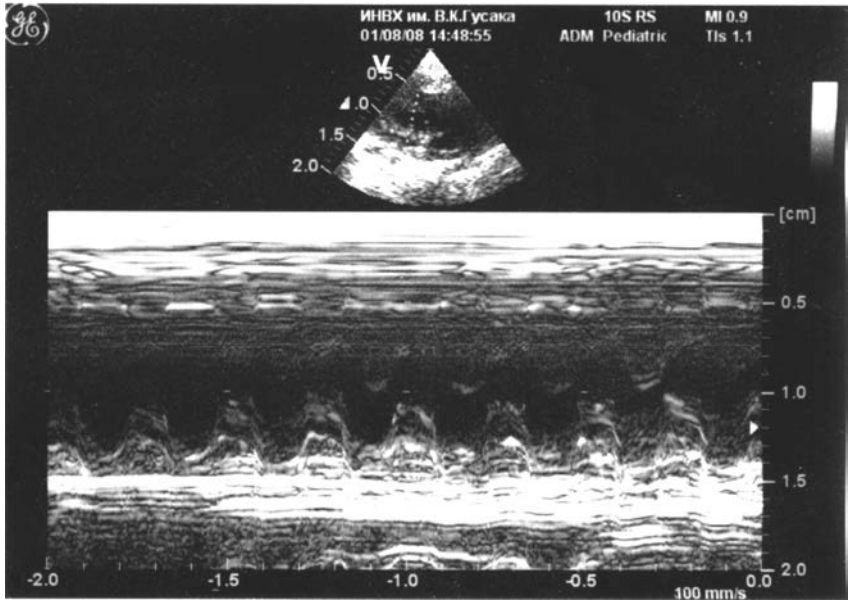


Рис. 4.2. ЭХО-кардиография сердца у крысы через 1 месяц после трансплантации МСК при ИМ

Подтверждает ИМ, существенное снижение кинетики миокарда в участке стенки ЛЖ, совпадающем с ЭКГ-топографией предполагаемого инфаркта. Роль эхокардиографии в диагностике ИМ, оценка динамики развития процесса и возникающих осложнений существенно повышается при использовании доплер ЭХОКГ, ЭХО-кимографии. Графическое движение переднесептальной и

задней стенки левого желудочка при норме и через 1 месяц после моделирования инфаркта миокарда, представлены на рис. 4.3. Четко видна гипокинезия стенки левого желудочка.

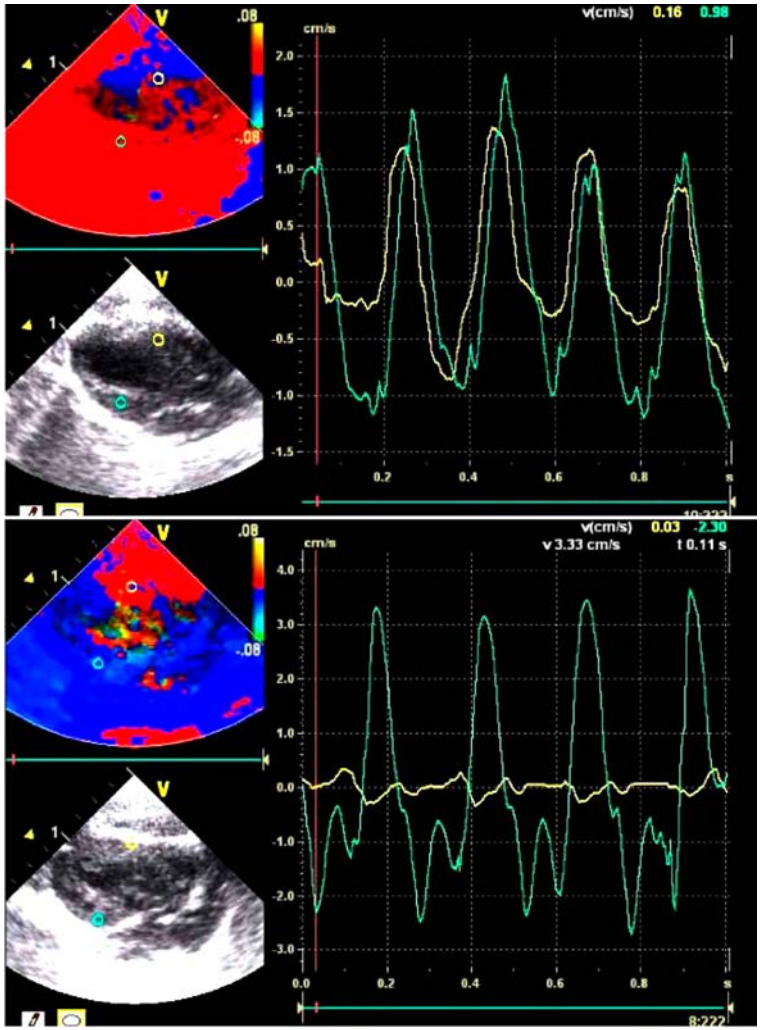


Рис. 4.3. ЭХО-кардиография сердца у крысы в норме (А) и через 1 месяц после трансплантации МСК при ИМ (В), где зеленая кривая демонстрирует работу переднесептальной, а желтая — задней стенки ЛЖ

Таким образом ИМ сопровождается, в зависимости от площади поражения, снижением сократительной функции сердца в зоне некроза и повреждения. При этом появляется гипокинезия, акинезия и дискинезия участка миокарда. В менее пораженных областях наблюдается диссинхронизация — замедление процесса сокращения по сравнению с неповрежденным миокардом. В то же время функция последнего, по данным литературы, компенсаторно возрастает за счет механизма Старлинга и повышенного уровня катехоламинов в крови. Компенсаторная гиперкинезия обычно постепенно снижается в течение первых двух недель заболевания. При обширном трансмуральном инфаркте миокарда значительно уменьшается функция левого желудочка, сердечный выброс, ударный объем (рис. 4.4).

Таким образом, исходя из рис. 4.4, мы видим, четкую зависимость между ударным объемом, фракцией выброса и фракцией укорочения. Для исследования на сколько сильна эта связь,

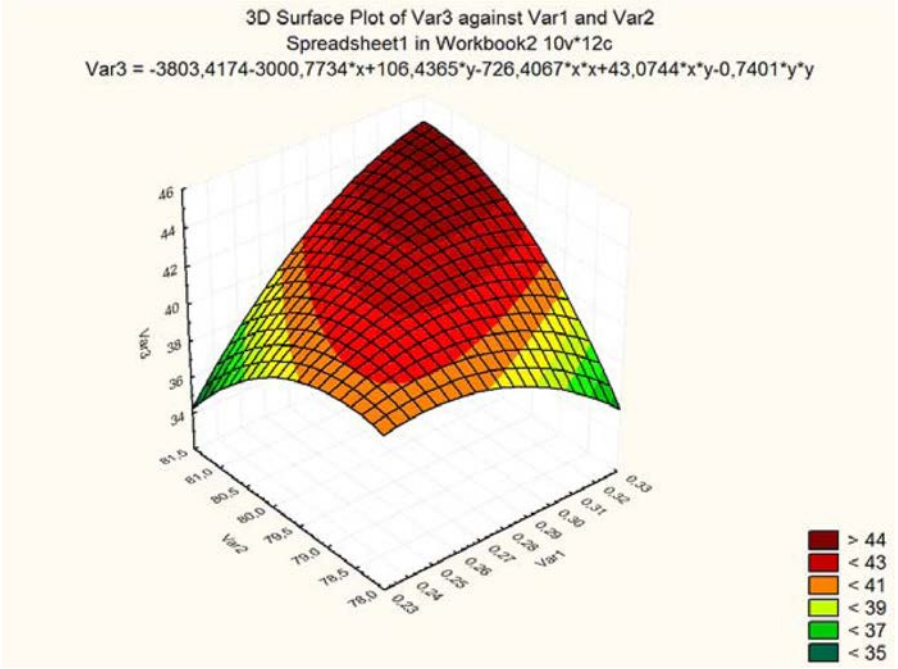


Рис. 4.4. График 3D-зависимость ударного объема (Var 1), фракции выброса (Var 2) и фракции укорочения (Var 3) в норме

мы исследовали линейную корреляционную связь между этими показателями (рис. 4.5). Корреляционная связь и компьютерное моделирование процесса выполнялось для 12 животных из каждой группы, при выполнении закона нормального распределения.

Причем следует отметить, что между УО и ФУ существует положительная корреляционная связь при корреляционном коэффициенте Пирсона r = 0,91 при p < 0,05, меньшая связь между ФВ и ФУ — r = 0,71 при p < 0,05 и меньше между УО и ФВ r = 0,62 при p < 0,05. Интересен то факт, что ФВ — один из пока-

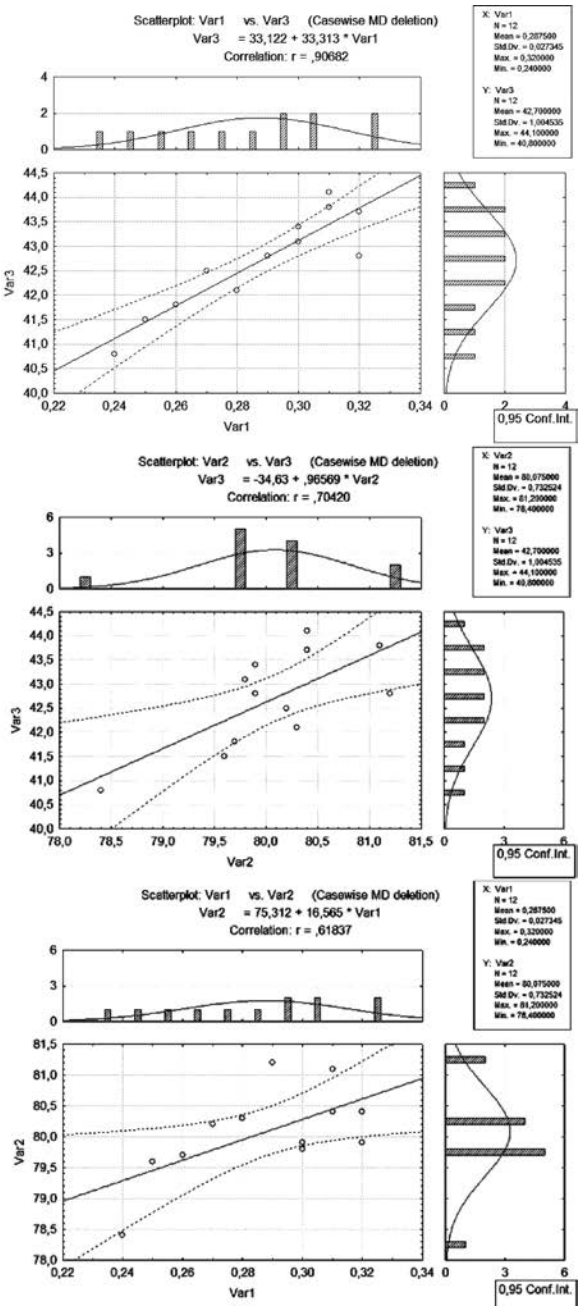


Рис. 4.5. Графики коэффициента корреляции между сравниваемыми величинами (УО, ФВ, ФУ) в норме у крыс

зателей ударной функции левого желудочка, также как и ФУ и УО, они вычисляются по формулам:

$$EF = (EDV - ESV/EDV) \times 100\ \%;$$

$$FS = (LVIDd - LVIDs/LVIDd) \times 100\ \%;$$

$$SV = EDV - ESV.$$

Таким образом, это все взаимосвязанные математически величины, и логично было бы, что бы наибольшая связь была между УО и ФВ, т. к. УО — представлен в числители ФВ, другими словами FV = SV/EDV. Но следует помнить, что ФВ будучи показателем относительным не зависит ни от размеров сердца, ни от EDV и ESV порознь. Какого бы размера не были сердца и каким бы не было их конечное диастолическое наполнение, по ФВ они сопоставимы друг с другом. Таким образом ФВ, как ударный показатель, частично характеризует насосную функцию сердца. ФВ, как норма, вводилась для возможностей сопоставления с соответствующими нормативами, но не для оценки индивидуальных геометрических свойств сердца. По мнению Н. И. Яблучанского: УО — степень актомиозинозависимого расхождения и одна сила сердечного толчка, а ФВ производная КДО и УО, т. к. сила сердечного сокращения, определяемая законом Франка-Старлинга, заложена в диастоле, то КДО первична для ФВ, а УО нужен не только для насосной функции левого желудочка, но и определения кровообращения в большом кругу. К тому же надо учитывать влияние пред — и постнагрузки на ФВ и УО, поэтому математическая жесткая логика зависимости этих величин не может быть в данном случае. Эффективность кровообращения определяется минутным объемом, равным произведению УО на частоту сердечных сокращений.

Исходя из данных корреляционной зависимости LVIDd от УО, ФУ и LVIDs (рис. 4.6), мы видим, что существует четкая корреляционная положительная прямая связь между LVIDd и ФУ r = 0,81 при p < 0,05; УО r = 0,77 при p < 0,05 и LVIDs r = 0,75 при p < 0,05.

Однако при изучении корреляционной связи LVIDs с изучаемыми показателями (рис. 4.7), мы видим, что с ФУ имеется положительная прямая корреляционная сильная связь r = 0,92 при p < 0,05, с УО r = 0,84 при p < 0,05, ФУ и LVIDd r = 0,75 при p < 0,05.

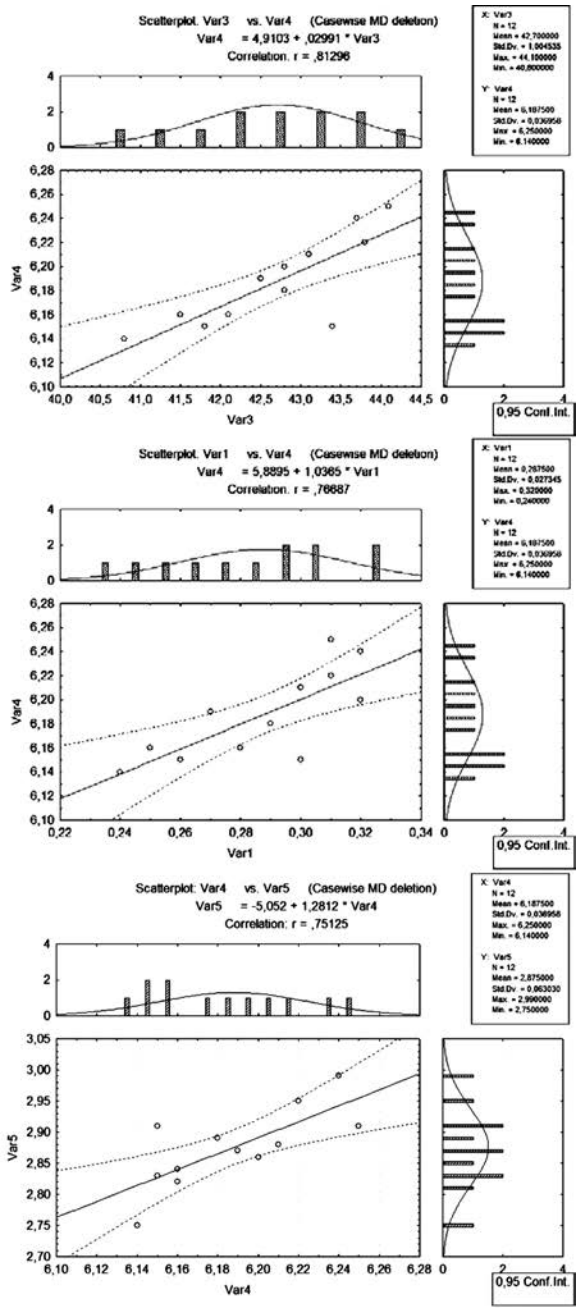


Рис. 4.6. Графики коэффициента корреляции между сравниваемыми величинами LVIDd — var 4 и УО — var 1; ФУ — var 3; LVIDs — var 5 у крыс при ИМ

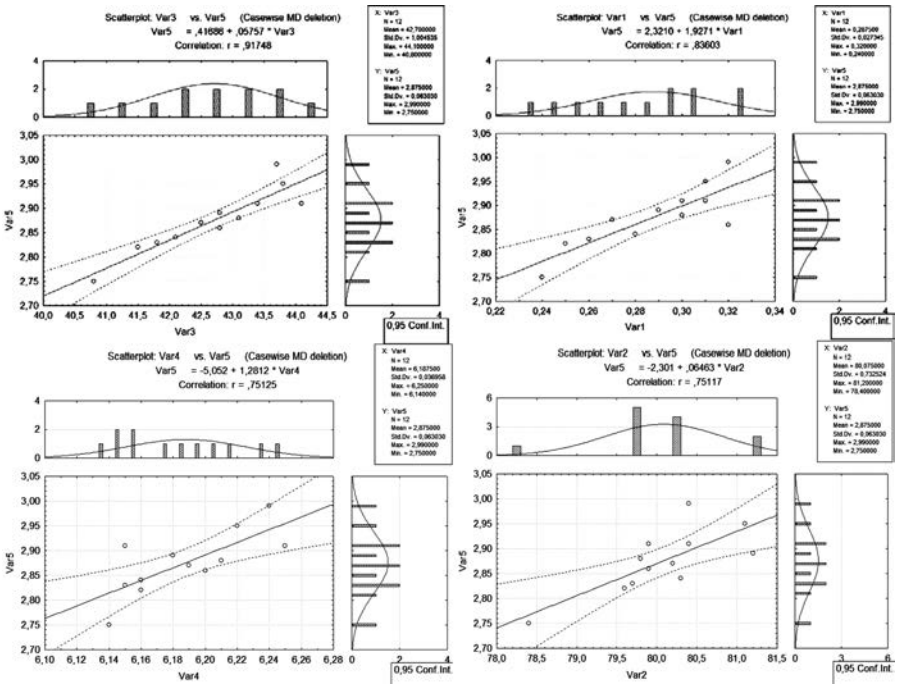


Рис. 4.7. Графики коэффициента корреляции между сравниваемыми величинами LVIDs — var 5 и УО — var 1; ФВ — var 2; ФУ — var 3; LVIDd — var 4 у крыс при ИМ

Таким образом, мы видим, что наши исследования показали, что LVIDd и LVIDs влияют на ФУ и УО, причем преимущественно за счет LVIDs, но не сильно влияют вместе на ФВ.

При моделировании ИМ у крыс через месяц после введения в эксперимент, так же как и норме отмечается положительная линейная корреляционная связь между тремя показателями УО, ФВ, ФУ (рис. 4.8), но акцент сместился в сторону связи ФВ и ФУ $r = 0,84$ при $p < 0,05$, между УО и ФВ $r = 0,73$ при $p < 0,05$ и между УО и ФВ $r = 0,61$ при $p < 0,05$.

На рис. 4.9, мы видим графическое изображение зависимости УО, ФВ и ФУ при инфаркте миокарда через 1 месяц у крысы, Из рисунка видно, что акцент поверхности сместился в сторону ФУ (ФВ в норме), т. е. происходит акцент работы сердца в зависимости от внутреннего размера левого желудочка в систолу и диастолу, а

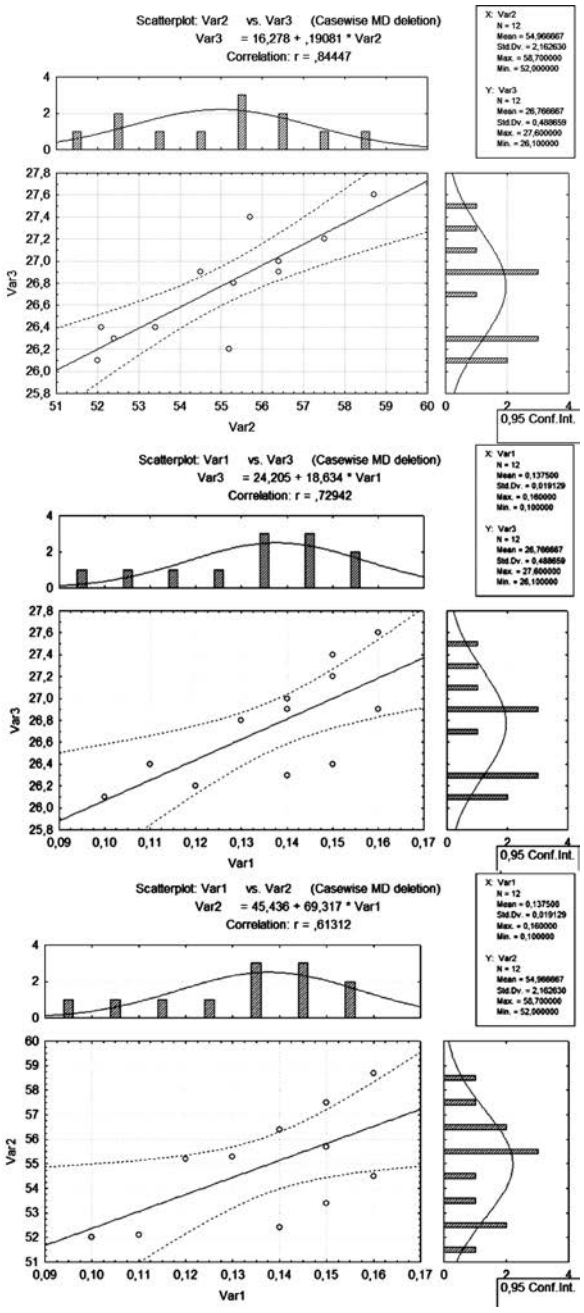


Рис. 4.8. Графики коэффициента корреляции между сравниваемыми величинами (УО, ФВ, ФУ) у крыс при ИМ

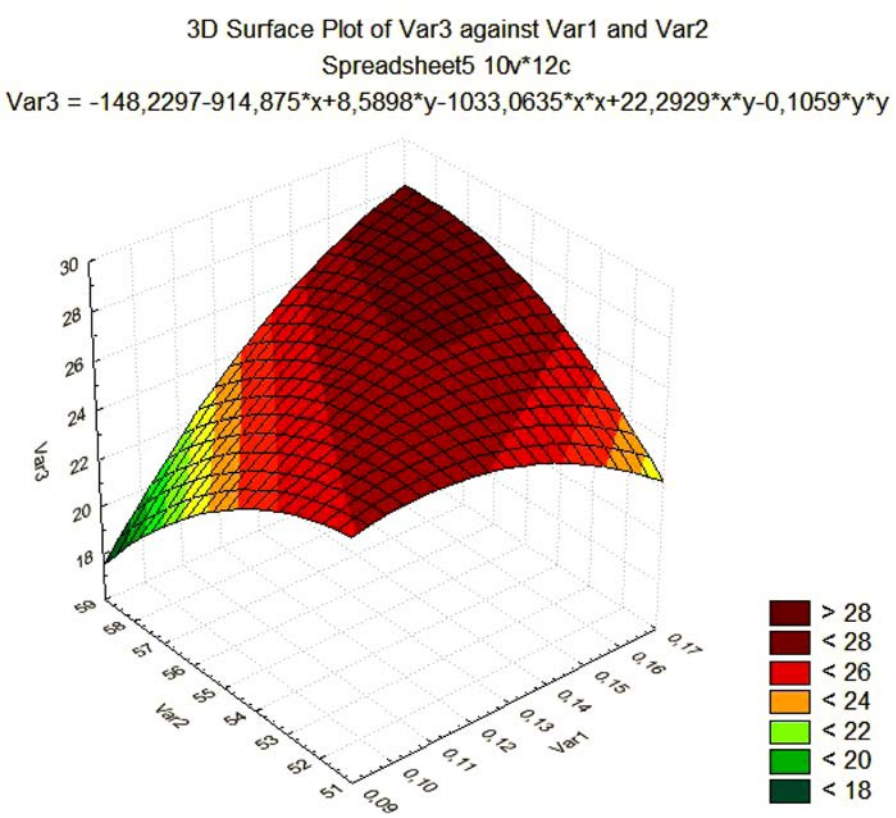


Рис. 4.9. График 3D-зависимость ударного объема (Var 1), фракции выброса (Var 2) и фракции укорочения (Var 3) у крыс при ИМ

не столько от его объема, т. к. в зависимости от геометрического размера по закону Франка-Старлинга меняется и сила сокращения сердечной мышцы.

Для подтверждения этого, мы изучили наличие корреляционной связи между конечным диастолическим и систолическим размером левого желудочка, с УО, ФВ, ФУ, мы получили следующие данные: LVIDd имеет сильную положительную корреляционную связь с УО $r = 0,88$ при $p < 0,05$, с ФУ $r = 0,87$ при $p < 0,05$ и менее выраженную с ФВ $r = 0,79$ при $p < 0,05$. При изучении данного явления конечного диастолического размера с конечным систолическим размером левого желудочка, мы получили самую сильную

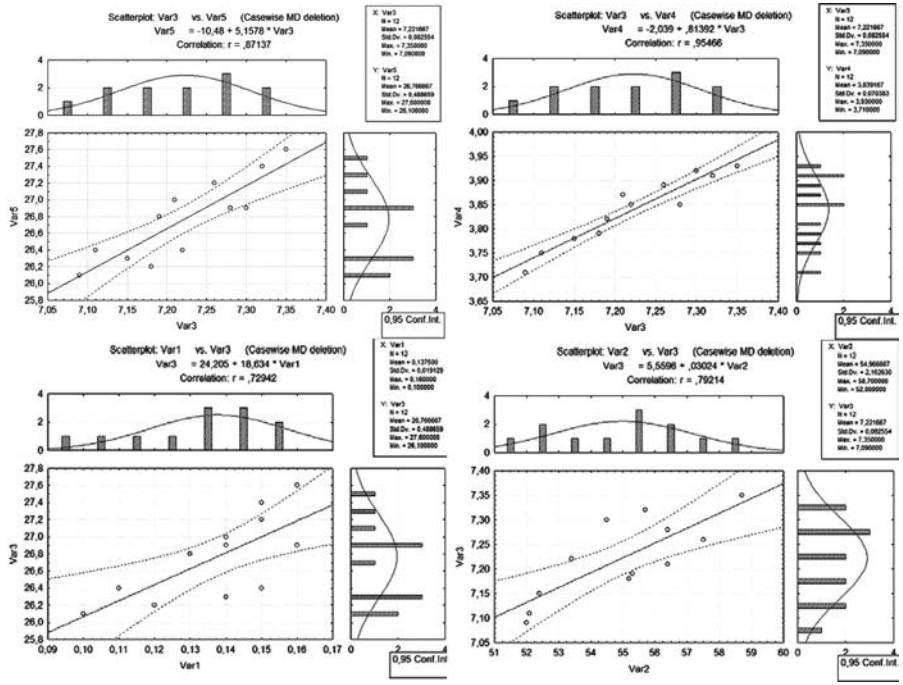


Рис. 4.10. Графики коэффициента корреляции между сравниваемыми величинами LVIDd — var 3 и УО — var 1; ФВ — var 2; LVIDs — var 4; ФУ — var 5 у крыс при ИМ

связь только $r = 0,96$ при $p < 0,05$, с остальными параметрами корреляционной связи не было (рис. 4.10).

При изучении корреляционной связи между LVIDs и УО, ФВ, ФУ, мы получили следующие данные: существует сильная положительная корреляционная связь между LVIDs и УО $r = 0,93$ при $p < 0,05$, несколько слабее с ФУ $r = 0,88$ при $p < 0,05$ и с ФВ $r = 0,78$ при $p < 0,05$ (рис. 4.11).

Таким образом, исходя из вышесказанного мы видим, что по мере влияния LVIDd и LVIDs на изучаемые параметры, они по мере убывания влияния определились в следующем порядке УО, ФУ и ФВ, при частном сравнении выяснилось, что большее влияние на УО и ФУ имеет LVIDs, а на ФВ — LVIDd.

Итак, анализируя полученные данные, мы видим, что в норме LVIDs имеет главенствующее влияние, чем LVIDd на основные

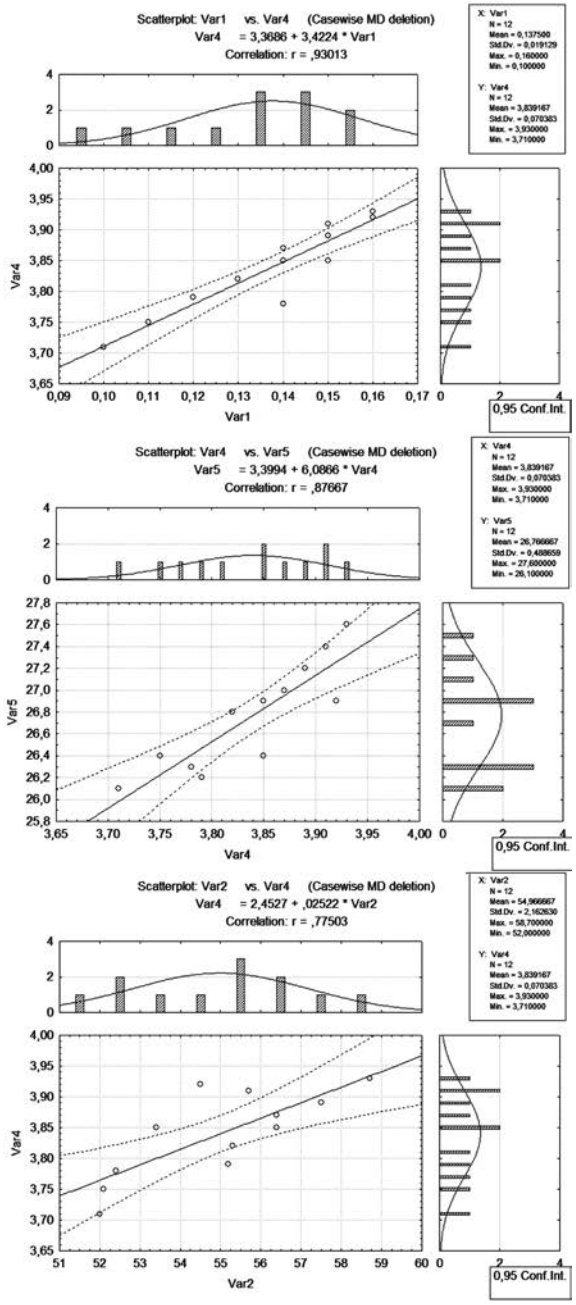


Рис. 4.11. Графики коэффициента корреляции между сравниваемыми величинами LVIDs — var 4 и УО — var 1; ФВ — var 2; ФУ — var 5 у крыс при ИМ

показатели работы левого желудочка сердца, такие как УО и ФУ. При патологии, в частности остром инфаркте миокарда происходит влияние LVIDs и LVIDd на УО, ФУ, ФВ, причем как и в норме LVIDs влияет на УО и ФУ, а LVIDd преимущественно на ФВ.

Систолический объем крови (рис. 4.12), это объем крови нагнетаемый каждым желудочком в магистральный сосуд при одном сокращении сердца, обозначают как систолический или ударный объем крови. В покое объем крови, выбрасываемый из желудочка, составляет в норме от трети до половины общего количества крови, содержащейся в этой камере сердца к концу диастолы. Оставшейся объем в сердце после систолы — резервный объем крови является своеобразным депо, обеспечивающим увеличение сердечного выброса при ситуациях, в которых требуется быстрая интенсификация гемодинамики, например при физической нагрузке, стрессе и др.

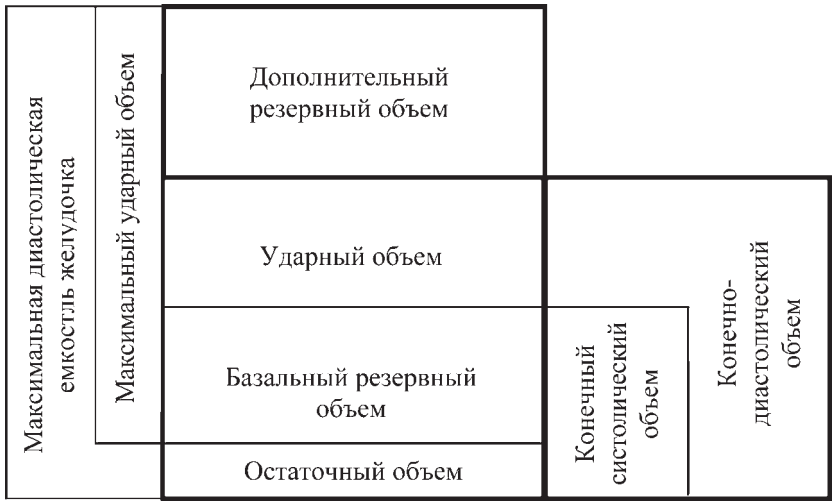


Рис. 4.12. Фракции диастолической емкости левого желудочка

Величина ударного объема крови во многом предопределена конечным диастолическим объемом желудочков. В условиях покоя диастолическая емкость желудочков сердца представляется на три фракции: ударного объема, базального резервного объема и остаточного объема. После выброса в аорту систолического объема крови оставшейся в желудочке объем крови — это конечно-систолический объем. Он подразделяется на базальный резервный объем и

остаточный объем. Базальный резервный объем — это количество крови, которое может быть дополнительно выброшено из желудочка при увеличении силы сокращения миокарда, например при физической или эмоциональной нагрузке. Остаточный объем — это то количество крови, которое не может быть вытолкнуто из желудочка даже при самом мощном сердечном сокращении. Величина резервного объема крови является одной из главных детерминант функционального резерва сердца по его специфической функции — перемещению крови в системе. При увеличении резервного объема, соответственно, увеличивается максимальный систолический объем, который может быть выброшен из сердца в условиях его интенсивной деятельности. Регуляторные влияния на сердце реализуются в изменении систолического объема путем воздействия на сократительную силу миокарда. При уменьшении мощности сердечного сокращения систолический объем снижается.

Таким образом, мы видим, что влияние на диастолический объем сердца, на прямую отражает изменение основных функций сердца. Следует учитывать, минутный объем сердца, т. е. объем крови, выбрасываемый сердцем в сосудистую сеть в течение одной минуты. Нами был изучено изменение МО при стресс-имитируемой нагрузке с изопропилнорадреналином, в результате чего мы получили данные представленные на рис. 4.13.

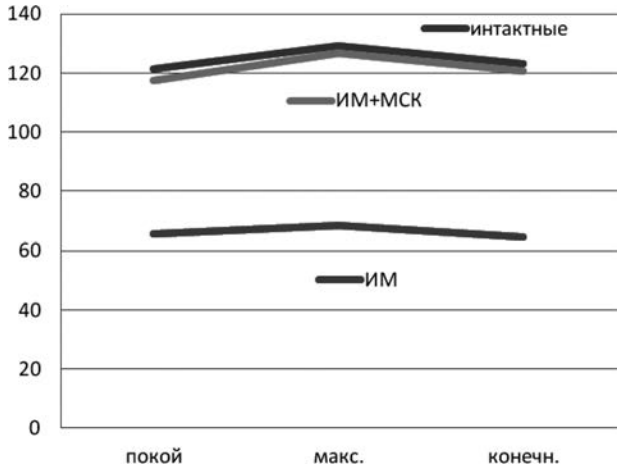


Рис. 4.13. Динамика МО при стресс-имитируемой нагрузке

Из рисунка, мы видим, что при сравнении трех групп животных: интактных, модель ИМ и животным которым на фоне ИМ пересадили МСК, что у крыс с ИМ МО существенно снизился по сравнению с нормой с 121,25 ± 2,49 до 65,39 ± 1,12 мл/мин при t = 20,26; p < 0,001 и был гораздо меньше, чем в группе с трансплантацией МСК (117,36 ± 2,15 мл/мин при t = 21,43; p < 0,001). Интересен тот факт, что МО при максимальной нагрузке изопропилнорадреналином, достоверно увеличивался у здоровых животных с 121,25 ± 2,49 до 129,25 ± 3,2 мл/мин при t = 1,97; p < 0,05 и у группе ИМ + МСК с 117,36 ± 2,15 до 126,72 ± 3,06 мл/мин при t = 2,5; p < 0,05. В конце опыта МО равнялся начальному показателю, т. е. 1223,25 ± 2,04 (при t = 0,62; p > 0,05) и 120,72 ± 2,33 мл/мин (при t = 1,06; p > 0,05). В группе крыс с ИМ без лечения не происходило изменение МО на протяжении всего опыта, исходя из математической зависимости МО = УО*ЧСС/1000, мы видим, что при учащении сердечных сокращений, уменьшался ударный объем сердца.

Раздел 5
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ХРОНОТРОПНОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА

У интактных животных ЧСС в стандартных условиях составляла 485 ± 43 уд/мин. При моделировании поражения миокарда этот показатель снижался до 142,5 ± 78,9 уд/мин. А уже через два часа соответствовал 270 ± 100,25 уд/мин. (рис. 5.1).

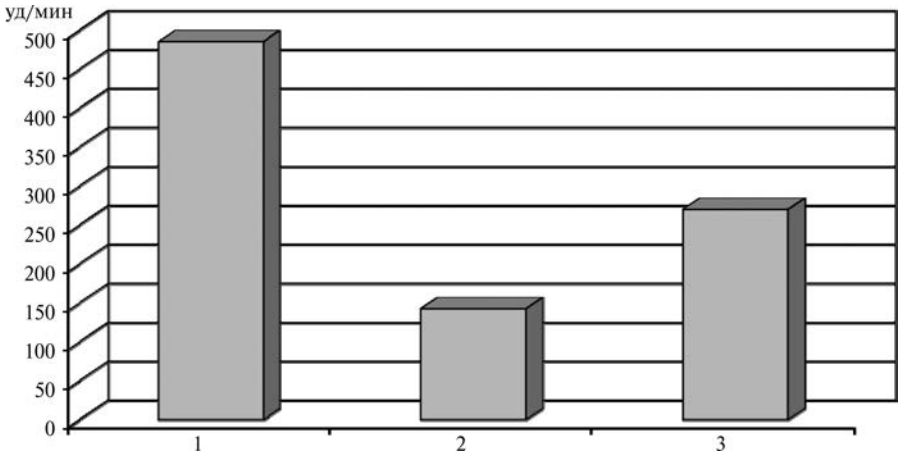


Рис. 5.1. Изменения частоты сердечных сокращений у животных при моделировании инфаркта миокарда: 1 — частота сердечных сокращений у животных до моделирования инфаркта миокарда; 2 — частота сердечных сокращений у животных при моделировании инфаркта миокарда; 3 — частота сердечных сокращений у животных через два часа после моделирования инфаркта миокарда

У интактных животных исходный уровень ЧСС составлял 485 ± 43 уд/мин. Через неделю, у группы животных после моделирования инфаркта миокарда аналогичный показатель деятельности сердечно — сосудистой системы был значительно выше — 541 ± 19 уд/мин. Тогда как исследования базового уровня ЧСС через две недели после моделирования инфаркта миокарда статистически достоверных ($p < 0,05$) различий с показателями интактных животных не выявили — 503 ± 23 уд/мин (рис. 5.2).

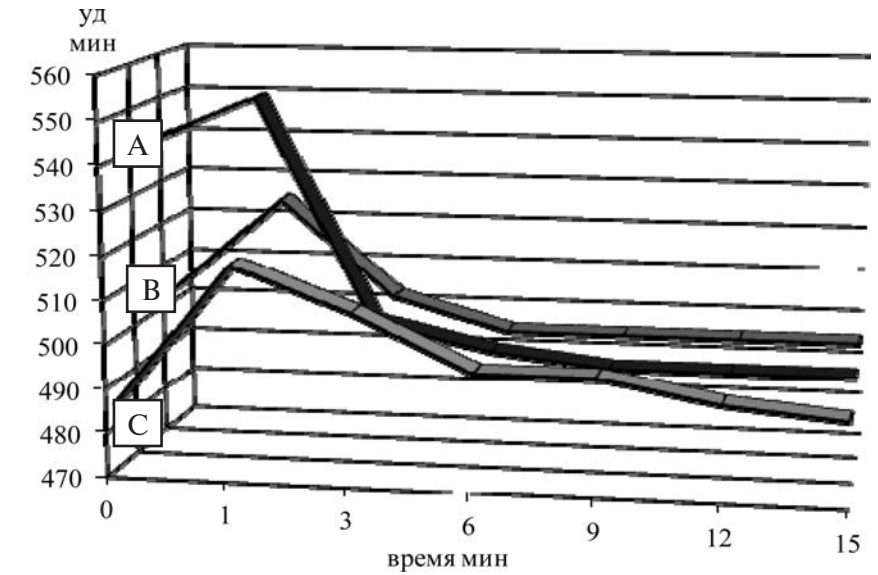


Рис. 5.2. Динамика изменений частоты сердечных сокращений у экспериментальных животных при моделировании стрессовой нагрузки: А — интактные животные; В — животные через семь дней после моделирования инфаркта миокарда; С — животные через четырнадцать дней после моделирования инфаркта миокарда

При моделировании стрессовой нагрузки у всех групп животных наблюдался положительный хронотропный эффект. При этом выраженность последнего существенно различалась у обследованных групп животных. Так, у интактных животных к первой минуте нагрузки изопропилнорадреналином абсолютный прирост составил порядка 32 уд/мин. На фоне высокого базового уровня ЧСС животных второй группы, стресс — обусловленный прирост составил 11 уд/мин. У животных третьей группы аналогичный показатель составил 22 уд/мин.

Уже к третьей минуте эксперимента наблюдалось снижение ЧСС у всех групп животных со стабилизацией на уровне 490–495 уд/мин.

В наших исследованиях, моделирование инфаркта миокарда было сопряжено с выраженным снижением его сократительной

функции. Тенденция к восстановлению, впрочем, наметилась уже в первые часы после указанной операции, что позволяет предположить наличие мощных компенсаторных механизмов, как в самом миокарде, так и в сердечно-сосудистой системе в целом. Это положение подтверждается, на наш взгляд, реакцией сердца на стрессовую нагрузку.

У животных обследованных через неделю после моделирования инфаркта миокарда, отмечался высокий исходный уровень ЧСС, значительно превышавший таковой интактных животных. Стрессовая нагрузка не выявила качественных различий в динамике изменений ЧСС, но количественные отличия в реакциях существуют. Можно предположить, что именно указанные количественные различия в реакциях миокарда на стресс и являются проявлением тех деструктивных процессов, которые способствуют развитию вторичных нарушений, сопровождающихся увеличением летальных случаев при интенсивной стрессовой нагрузке.

Нивелирование различий в реакциях на стресс между интактными животными и крысами через две недели после моделирования инфаркта миокарда показывает активацию компенсаторных механизмов сердечно-сосудистой системы, направленных на нормализацию реакции миокарда на стресс, что, в конечном счете, должно проявится в относительном восстановлении жизнестойкости организма.

Активно развиваемый в настоящее время способ купирования проявлений инфаркта миокарда с помощью клеточной трансплантации обьединяет целый ряд направлений. Из всего существующего на сегодняшний день разнообразия, для наших исследований, мы выбрали четыре наиболее перспективных:

— фетальные стволовые клетки;
— мезенхимальные стволовые клетки;
— кардиомиоцитоподобные МСК;
— гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

В начале наблюдений, до введения изопропилнорадреналина, базовые значения ЧСС существенно различались у всех групп животных (рис. 5.3). У интактных животных этот показатель составил 485±43 уд/мин. У крыс после моделирования инфаркта миокарда отмечались более высокие значения — 503±23 уд/мин ($p \geq 0,05$). У

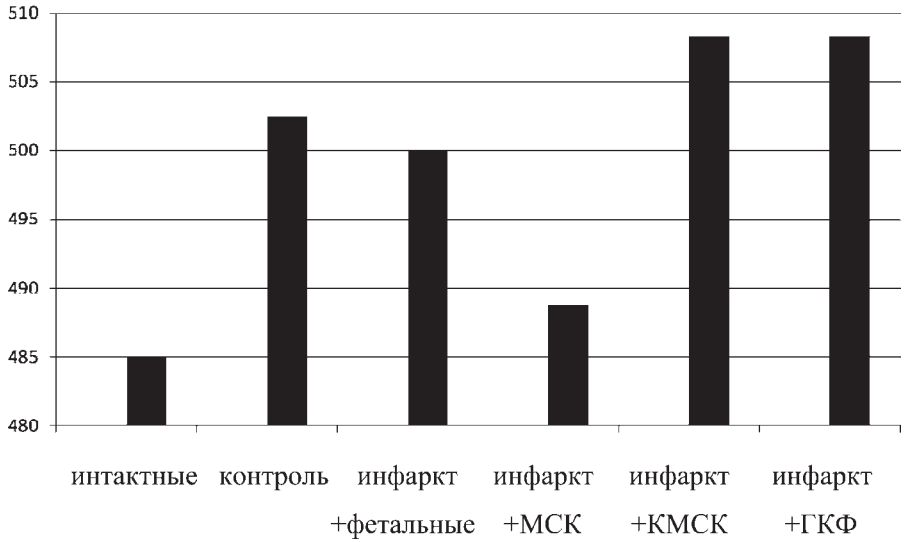


Рис. 5.3. Исходные значения ЧСС

животных после внутривенного введения фетальной культуры клеток ЧСС было на уровне 500±13 уд/мин ($p \geq 0,05$). Введение мезенхимальных стволовых клеток животным с моделью инфаркта миокарда приводило к снижению базовых значений ЧСС до 489±14 уд/мин ($p \geq 0,05$). Внутривенное введение кардиомиоцитоподобных МСК и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора способствовало дальнейшему увеличению описываемого показателя деятельности сердца до 508±6 уд/мин и 508±11 уд/мин соответственно ($p \geq 0,05$).

Стресс — имитирующая нагрузка изопропилнорадреналином проявлялась в положительном хронотропном эффекте у всех групп животных (рис. 5.4). Для интактных крыс максимальные значения ЧСС составили 517±35 уд/мин ($p \leq 0,05$). У крыс после моделирования инфаркта миокарда отмечались более высокие значения — 525±15 уд/мин ($p \leq 0,05$). У группы животных после введения фетальной культуры клеток ЧСС было на уровне 515±13 уд/мин ($p \leq 0,05$). У животных с моделью инфаркта миокарда после введения мезенхимальных стволовых клеток стрессовая нагрузка сопровождалась увеличением ЧСС до 528±9 уд/мин ($p \leq 0,05$). Сходные значения отмечались и у группы крыс после введения кардиомио-

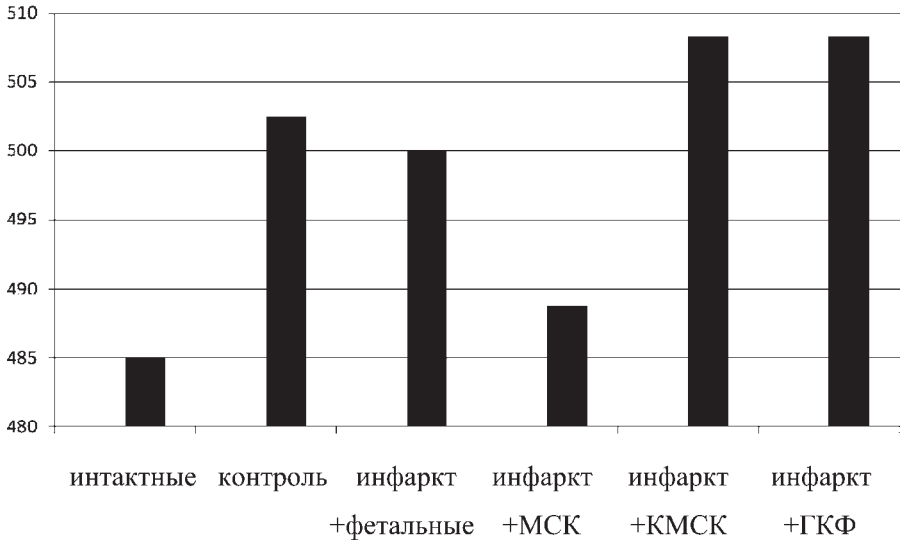


Рис. 5.4. Максимальные значения ЧСС

цитоподобных МСК — 528±11 уд/мин ($p \leq 0,05$). Несколько ниже были значения у крыс после введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора 527±9 уд/мин ($p \leq 0,05$).

Помимо максимальных значений ЧСС, хронотропный эффект удобно оценивать по величине абсолютного прироста (рис. 5.5). Так, для группы интактных животных он составил 32 уд/мин ($p \leq 0,05$). Развитие инфаркта миокарда сопровождается снижением величины стресс — индуцирующего увеличения ЧСС до 22 уд/мин ($p \leq 0,05$). Введение фетальной культуры клеток животным после инфаркта миокарда сопровождалось дальнейшим снижением величины абсолютного прироста ЧСС до 15 уд/мин ($p \geq 0,05$). Введение мезенхимальных стволовых клеток приводило к значительному увеличению реакции сердца на стресс — моделирующую нагрузку. У этой группы животных абсолютный прирост составил 39 уд/мин ($p \leq 0,05$). Анализируя величину абсолютного прироста ЧСС у крыс после введения кардиомиоцитоподобных МСК и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора можно отметить его промежуточный уровень в 20 уд/мин ($p \geq 0,05$) и 19 уд/мин ($p \geq 0,05$) соответственно.

К окончанию наблюдения (рис. 5.6) у всех групп животных отмечалось снижение ЧСС, при этом его выраженность была различ-

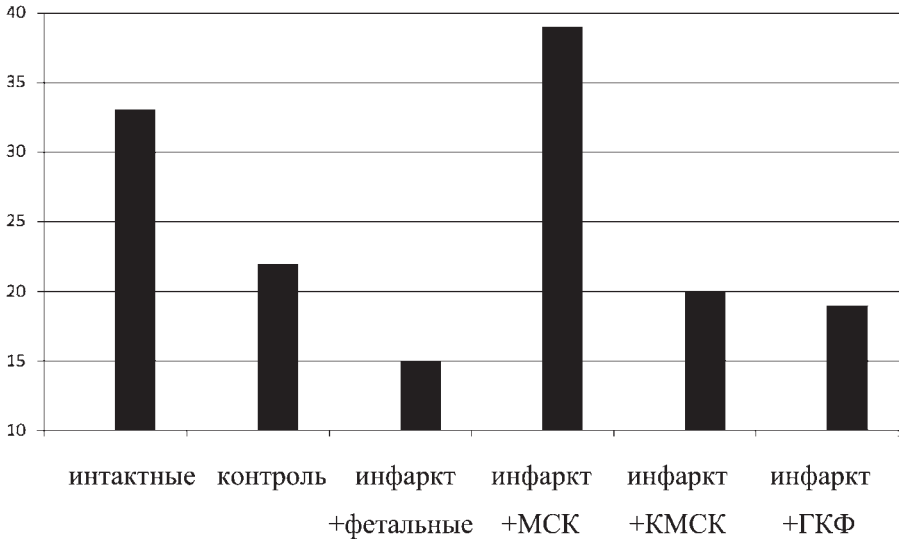


Рис. 5.5. Прирост значений ЧСС после нагрузки изопропилнорадреналином

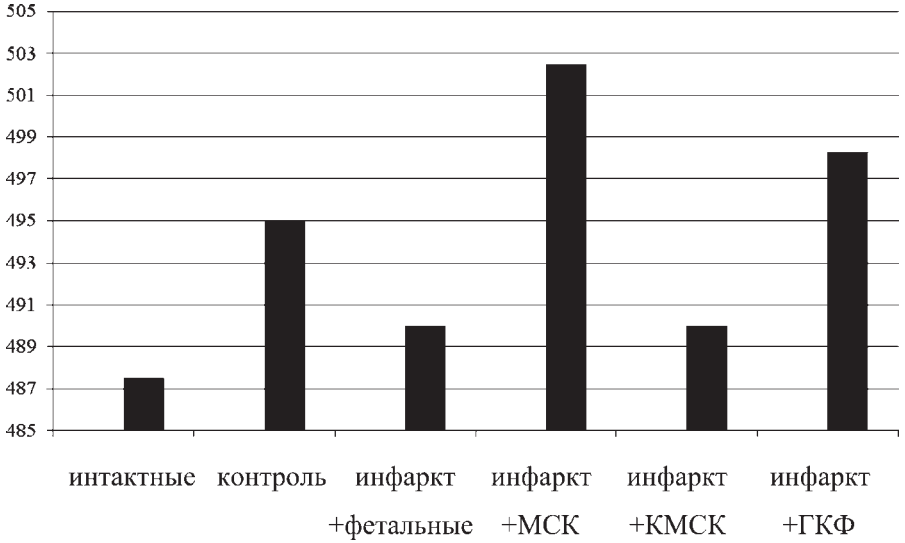


Рис. 5.6. Значения ЧСС к окончанию наблюдения

на. Так, у интактных крыс величина ЧСС составила 490 ± 23 уд/мин ($p \leq 0,05$). У крыс после моделирования инфаркта миокарда значе-

ния оставались более высокими — 495 ± 15 уд/мин ($p \geq 0,05$). У животных после внутривенного введения фетальной культуры клеток конечная ЧСС было на уровне 490 ± 17 уд/мин ($p \geq 0,05$). У животных после введение мезенхимальных стволовых клеток конечные значения ЧСС составили 503 ± 15 уд/мин ($p \geq 0,05$). У крыс после введения кардиомиоцитоподобных МСК и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора величина описываемого показателя деятельности сердца составила 490 ± 7 уд/мин и 498 ± 8 уд/мин соответственно ($p \geq 0,05$).

В целом, анализируя полученные данные, необходимо отметить, что развитие реакции на введение изопропилнорадреналина у интактных животных характеризуется двумя фазами — быстрым, в течении одной — трех минут, увеличением ЧСС и её медленной стабилизацией с последующим снижением до окончания наблюдения. Как правило, у здоровых животных, значения ЧСС, наблюдаемые к окончанию эксперимента несколько выше базовых. Иная тенденция прослеживается у животных с моделью инфаркта миокарда. У них конечные значения ЧСС ниже базовых, что по-нашему мнению связано с нестабильной деятельностью сердца.

Использование фетальной культуры клеток крыс для коррекции инфаркта миокарда в наших исследованиях не способствовало нормализации ответа сердца на стресс. Процессы, наблюдавшиеся у животных с моделью инфаркта, у этой группы более выражены — отмечено дальнейшее снижение реакции сердца на стресс и еще более раннее истощение, проявляющееся в снижении ЧСС значительно ниже исходных. Наши данные подтверждают работы авторов, показавших, что при трансплантации, фетальная культура клеток, вызывает аритмию, а также способна спонтанно малигнизироваться, инициируя рост нетипичной для данного органа ткани и последующее отторжение трансплантата.

В наших исследованиях, использование мезенхимальных стволовых клеток способствовало восстановлению реакции сердца на стресс, проявлявшееся в нормализации как хронотропного ответа на введение изопропилнорадреналина, так и времени стабилизации этого показателя.

Введение как кардиомиоцитоподобных МСК, так и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора не было сопряжено

в наших исследованиях с нормализацией хронотропной функции сердца, что подтверждает работу Dietlind Zohlnhofer (Немецкий Кардиоцентр, Мюнхен, Германия) представившего результаты исследования REVIVAL-2 на ежегодном симпозиуме, посвященном транскатетерной кардиоваскулярной терапии (Вашингтон, США). В целом, 114 пациентов с острым инфарктом миокарда (ИМ) в течение 5 дней рандомизированно получали либо гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), либо плацебо. Исходно в обеих группах был одинаковым средний размер зоны инфаркта левого желудочка, ЛЖ (19,1 %). Через 6 месяцев размер зоны инфаркта несколько уменьшился в группе Г-КСФ, по сравнению с группой плацебо — 12,9 % против 14,1 %, однако эти различия не достигали статистической значимости. Фракция выброса ЛЖ была одинаковой в обеих группах (увеличение в среднем на 2,8 %), как и частота рестеноза, смерти, ИМ, реваскуляризации пораженного сосуда.

При разработке модели адекватного способа введения культуры мезенхимальных клеток, возник вопрос о сроках наибольшей эффективности клеточной трансплантации. Исходя из наших исследований (см. рис. 5.2) было выбрано три условно значимых временных интервала:

— первые сутки, после развития экспериментального инфаркта миокарда;

— седьмые сутки, после развития экспериментального инфаркта миокарда;

— четырнадцатые сутки, после развития экспериментального инфаркта миокарда.

В качестве контрольной группы сравнения использовались данные по реакции на стресс — имитирующую нагрузку изопропилнорадреналином интактных животных.

ЧСС у всех групп животных до начала эксперимента существенно отличалась (рис. 5.7). У самок, получивших мезенхимальные клетки в первые сутки моделирования инфаркта миокарда, ЧСС практически не отличался от таковой интактных животных — 489 ± 14 уд/мин и 485 ± 43 уд/мин соответственно ($p \leq 0,05$). Самки, получившие мезенхимальные клетки через семь и четырнадцать дней после моделирования инфаркта миокарда, обладали более вы-

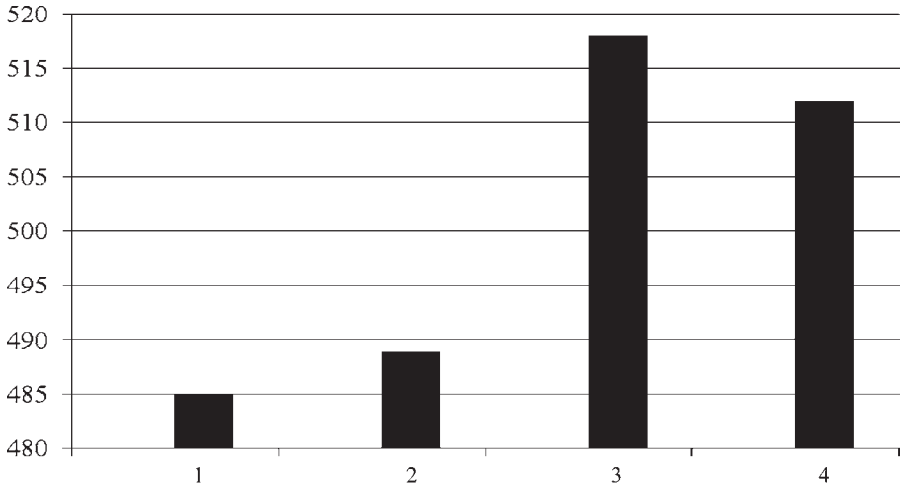


Рис. 5.7. Исходные значения ЧСС у группы животных с введенными мезенхимальными клетками:
1 — интактные животные; 2 — введение культуры МСК в первый день формирования инфаркта; 3 — введение культуры МСК в седьмой день формирования инфаркта; 4 — введение культуры МСК в четырнадцатый день формирования инфаркта

сокими базовыми значениями ЧСС 518 ± 19 уд/мин 512 ± 13 уд/мин соответственно ($p \le 0,05$).

Стресс — имитирующая нагрузка изопропилнорадреналином провоцировала развитие положительного хронотропного ответа миокарда у всех групп животных (рис. 5.8).

Для интактных самок максимальные значения ЧСС составили 517 ± 35 уд/мин ($p \le 0,05$). У животных с моделью инфаркта миокарда купированного в первые сутки введением мезенхимальных стволовых клеток развитие стрессовой нагрузки сопровождалось увеличением ЧСС до 528 ± 9 уд/мин ($p \le 0,05$). Животные, получившие мезенхимальные клетки на седьмой и четырнадцатый день развития экспериментального инфаркта миокарда, показали более высокие значения ЧСС — 546 ± 17 уд/мин и 536 ± 12 уд/мин соответственно ($p \le 0,05$).

Таким образом, при формировании положительного хронотропного ответа на введение изопропилнорадреналина величина абсолютного прироста имеет вид, изображенный на рис. 5.9.

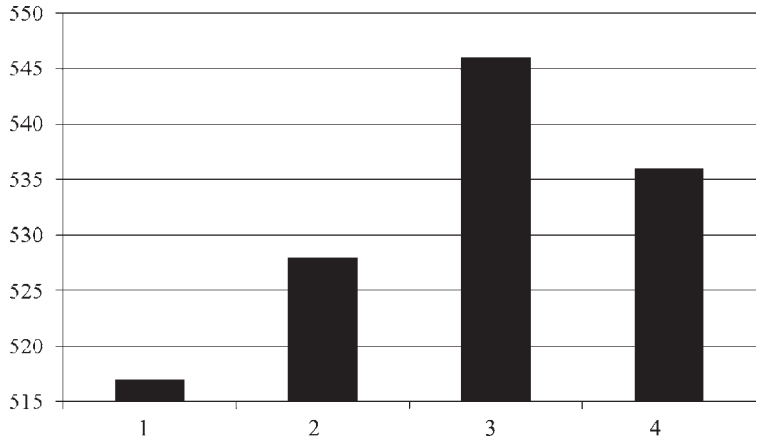


Рис. 5.8. Максимальные значения ЧСС у группы животных с введенными мезенхимальными клетками:
1 — интактные животные; 2 — введение культуры МСК в первый день формирования инфаркта; 3 — введение культуры МСК в седьмой день формирования инфаркта; 4 — введение культуры МСК в четырнадцатый день формирования инфаркта

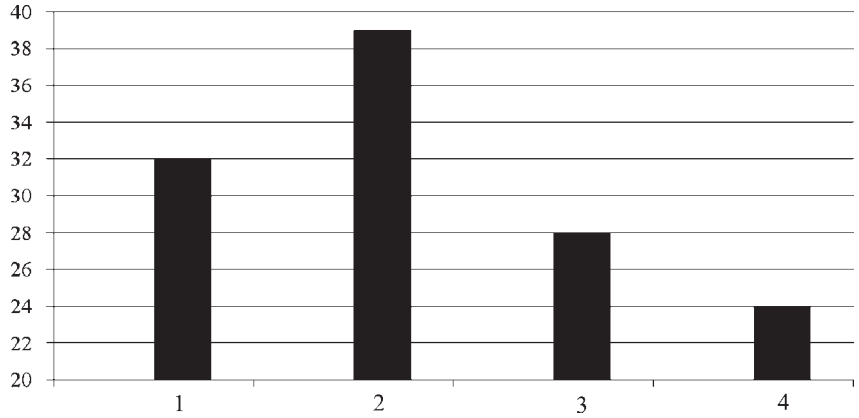


Рис. 5.9. Прирост ЧСС у группы животных с введенными мезенхимальными клетками:
1 — интактные животные; 2 — введение культуры МСК в первый день формирования инфаркта; 3 — введение культуры МСК в седьмой день формирования инфаркта; 4 — введение культуры МСК в четырнадцатый день формирования инфаркта

Для интактных животных — 32 уд/мин;

Для самок первого дня введения мезенхимальных клеток — 39 уд/мин;

Для самок седьмого дня введения — 28 уд/мин;

Для самок четырнадцатого дня — 24 уд/мин.

К окончанию наблюдений произошла стабилизация описываемого параметра функциональной активности ЧСС у всех групп животных (рис. 5.10.). Так, у интактных крыс величина ЧСС составила 490 ± 23 уд/мин ($p \leq 0,05$). У животных первого дня введение мезенхимальных стволовых клеток конечные значения ЧСС составили 503 ± 15 уд/мин ($p \geq 0,05$). Для самок седьмого и четырнадцатого дня введения характерен был более высокий уровень стабилизации ЧСС — 526 ± 12 уд/мин ($p \leq 0,05$) и 521 ± 21 уд/мин ($p \leq 0,05$) соответственно. Представляется интересным рассмотреть

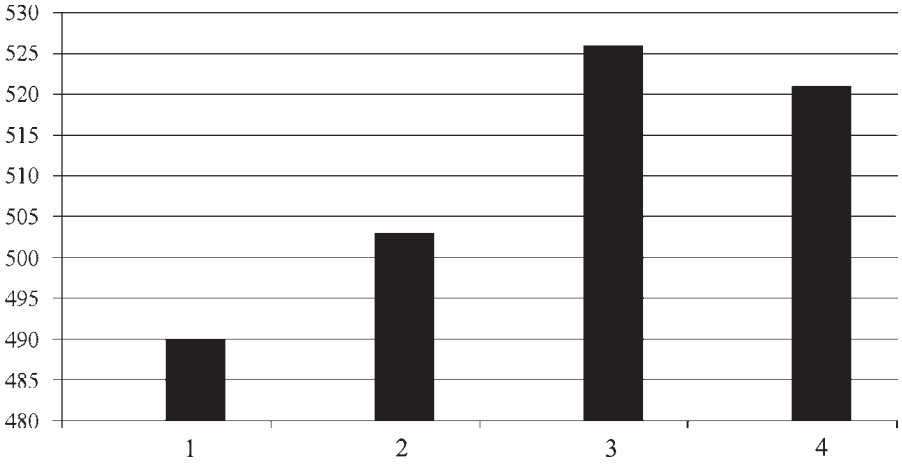


Рис. 5.10. Значения ЧСС у группы животных с введенными мезенхимальными клетками:
1 — интактные животные; 2 — введение культуры МСК в первый день формирования инфаркта; 3 — введение культуры МСК в седьмой день формирования инфаркта; 4 — введение культуры МСК в четырнадцатый день формирования инфаркта

динамику формирования стресс-имитирующей реакции миокарда при различных способах введения МСК. Внутривенное введение культур МСК было описано выше (рис. 5.3–5.10.). Анализируя по

той же схеме внутрижелудочковую и интрамиокардиальную трансплантацию МСК, прежде всего необходимо отметить высокий уровень базовых значений ЧСС — 520 ± 15 уд/мин ($p \leq 0,05$) и 585 ± 11 уд/мин ($p \leq 0,05$) соответственно. Нагрузка изопропилнорадреналином способствовала увеличению ЧСС у обеих групп животных в среднем на 15 уд/мин. Таким образом, максимальные значения ЧСС для этих групп животных составили 535 ± 21 уд/мин ($p \geq 0,05$) и 600 ± 16 уд/мин ($p \geq 0,05$). К окончанию эксперимента ЧСС у описываемых групп самок составляла 525 ± 9 уд/мин ($p \geq 0,05$) и 555 ± 23 уд/мин ($p \geq 0,05$).

Раздел 6
ОСОБЕННОСТИ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕРДЦА КРЫС ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ КЛЕТОЧНОЙ КАРДИОМИОПЛАСТИКИ

Исследование функциональных свойств миокарда, показало, что изменения со стороны ЭКГ выявляются у животных уже в первые сутки после моделирования ИМ в виде нарушений ритма, изменений в зубце QRS.

Для статистического исследования функции сердца мы использовали ЭКГ (рис. 6.1–6.2), а для динамического наблюдения на протяжении длительного времени — суточное мониторирование по Holter.

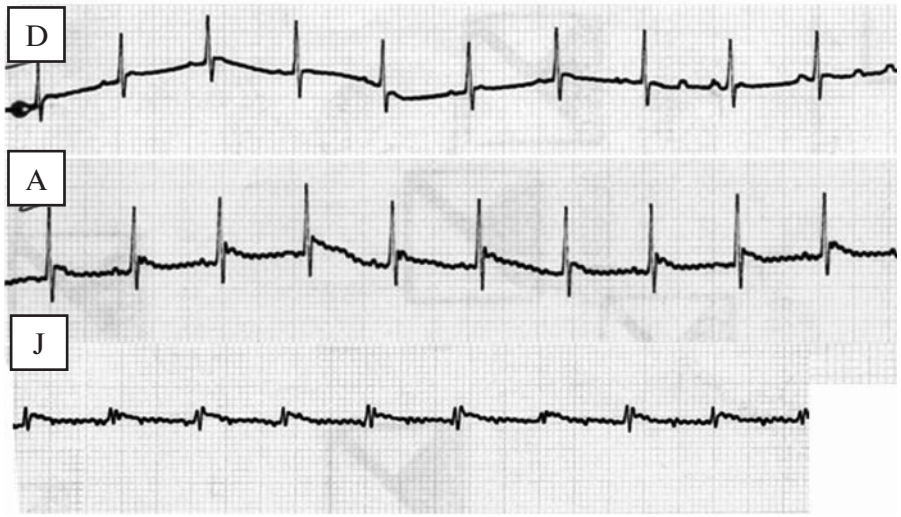


Рис. 6.1. ЭКГ сердца здоровой крысы в отведениях по Нэбу

Следует отметить, что через сутки после моделирования ИМ, у крыс наблюдалась брадикардия, формирование зубца q и сохранялась элевация сегмента ST, что свидетельствовало о наличии некроза при распространенном трансмуральном инфаркте миокарда. (рис. 6.2).

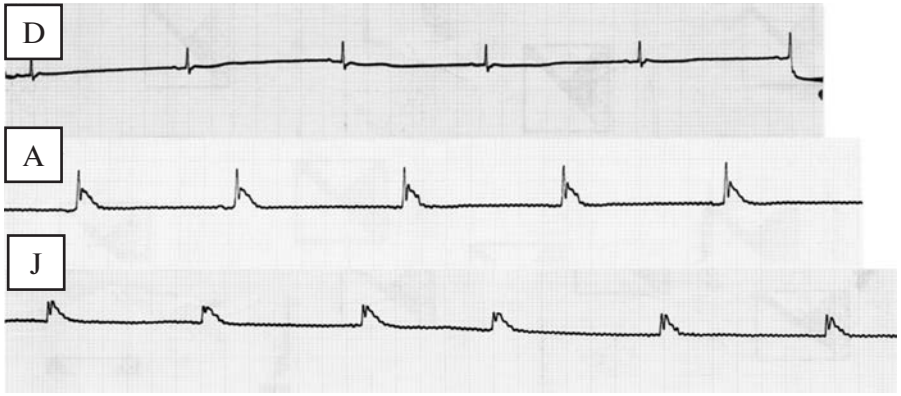


Рис. 6.2. ЭКГ крысы через 1 сутки после ИМ, в отведениях по Нэбу

При сравнении ЭКГ до моделирования ИМ (рис. 6.3–1) и через 30 минут после перевязки ЛКА (рис. 6.3 — 2) регистрировалась элевация сегмента ST-*кривая Парди,* что свидетельствовало о повреждении миокарда при острейшей стадии ОИМ.

В течение первых 2-х часов формировался патологический зубец Q (рис. 6.3 — 3), который свидетельствовал о наличии некроза миокарда при острой стадии ИМ. Через 10–14 дней формировался отрицательный зубец Т (рис. 6.3 — 4), а сохраняющаяся элевация сегмента ST свидетельствовала о формировании острой аневризмы. Через 1 месяц (рис. 6.3 — 5) после моделирования ОИМ на ЭКГ регистрировалось увеличение амплитуды отрицательного зубца Т и «расширение» зубца Q, отражающие стадию рубцевания.

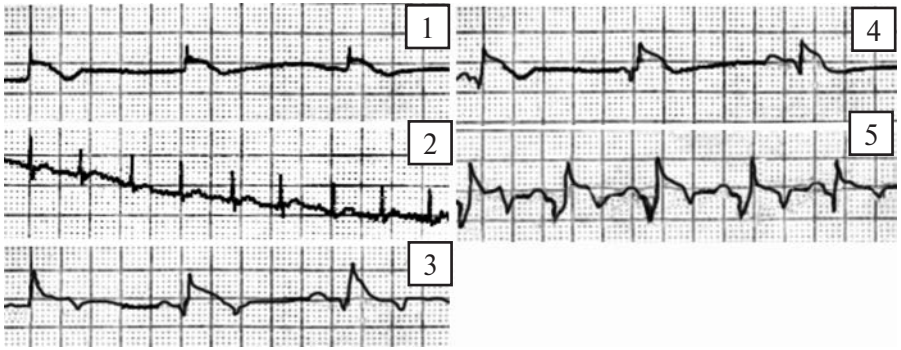


Рис. 6.3. 1— норма; 2–5 ЭКГ-динамика ОИМ в отведении А по Нэбу у крысы

Подобную картину мы наблюдали у 40 % животных, у остальных (60 %) снижение приподнятого ST прекращается на определенном уровне, не достигнув изоэлектрической линии. Такая «застывшая» электрокардиограмма (обычно со сформировавшимся отрицательным зубцом Т), являются электрокардиографическим признаком аневризмы левого желудочка.

В дальнейшем при анализе данных суточного мониторирования ЭКГ следует отметить, что регистрационные данные, которые оценивались автоматически программой следует с осторожностью воспринимать и доверять лишь ручному перерасчету, в связи с тем, что некоторые комплексы программа пропускает (рис. 6.4). ввиду высокой частоты сердечных сокращений у крыс более 260±60 в мин.

Через 7 суток после моделирования ИМ, в 1 группе, отмечалась монотопная желудочковая бигеминия (рис. 6.5).

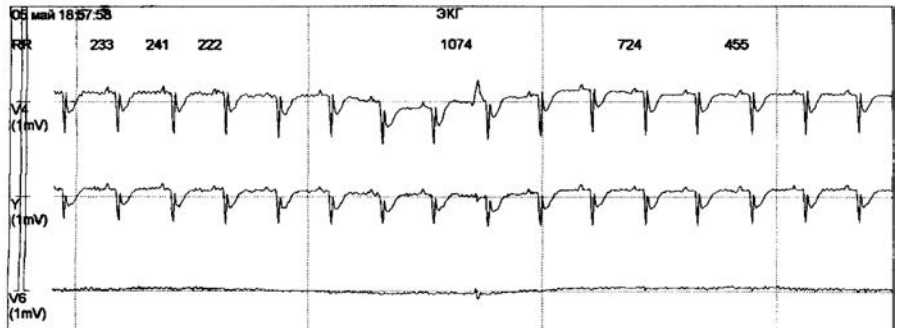


Рис. 6.4. Нормальная картина кардиограммы сердца у крысы в норме

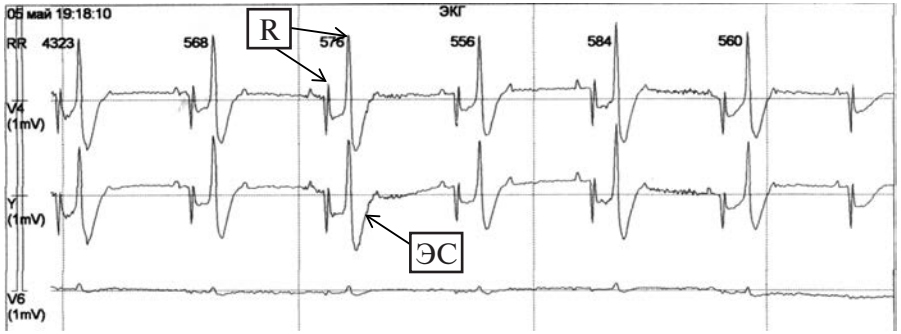


Рис. 6.5. Кардиограмма сердца у крысы через 7 суток после моделирования ИМ, в группе без лечения (1 группа)

К 14 суткам, присутствуют нарушения ритма в виде желудочковых экстрасистол (рис. 6.6 — ЖЭ) и абберантные наджелудочковые экстрасистолы (НЭ).

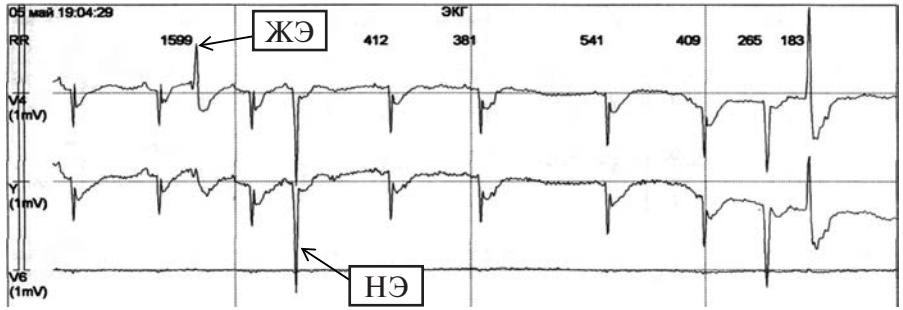


Рис. 6.6. Кардиограмма сердца у крысы через 14 суток после моделирования ИМ, в группе без лечения (1 группа)

К 30-м суткам после моделирования ИМ, наблюдались нарушения проводимости: наиболее частые АВ-блокады 2 степени типа Мобиц 1 (рис. 6.7).

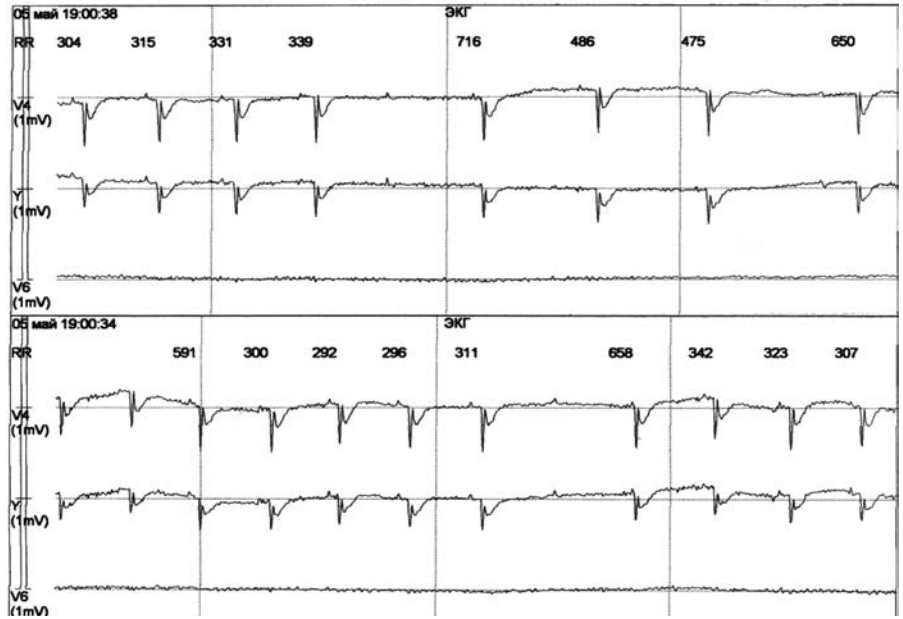


Рис. 6.7. Кардиограмма сердца у крысы через 30 суток после моделирования ИМ, в группе без лечения (1 группа)

Иногда отмечалось сочетание желудочковых и наджелудочковых эстрасистол с пароксизмами наджелудочковой тахикардии (рис. 6.8–6.9).

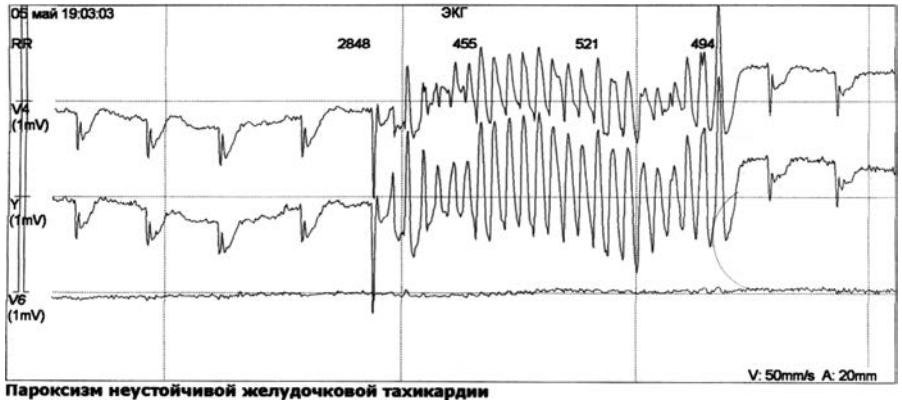


Рис. 6.8. Кардиограмма сердца у крысы через 30 суток после трансплантации ЭСК при ИМ (2 группа)

Рис. 6.9. Кардиограмма сердца у крысы через 30 суток после трансплантации ЭСК при ИМ (2 группа)

Следует отметить, что в 3 и 4 группе не было существенных различий между собой и по сравнению с нормой по данным мониторирования. Поэтому дальнейшее исследование мы проводили путем сравнения амплитуд ЭКГ.

В 5 группе с введением Г-КСФ, отмечается короткий пароксизм фибрилляций предсердий (рис. 6.10), с последующим самостоятельным восстановлением ритма сердца.

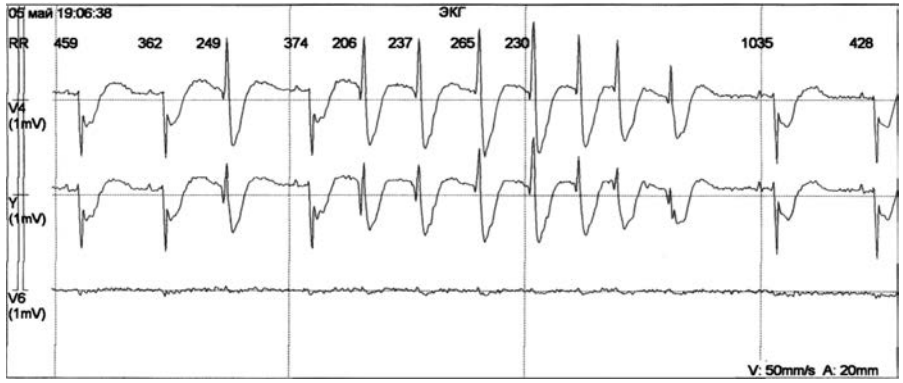


Рис. 6.10. Кардиограмма сердца у крысы через 30 суток после введения Г-КСФ при ИМ (5 группа)

В дальнейшем, мы для определения эффективности различных видов клеточной кардиомиопластики, мы использовали компьютерное наложение усредненных данных ЭКГ. В частности при изучении качественных изменения комплексов ЭКГ в 1 группе отмечалось углубление QS на 2 мм от нормы и расширение его до 4,2 мм, что говорит о формировании трансмурального ИМ с выраженной ишемией миокарда (рис. 6.11). Во 2 группе (рис. 6.12), ишемия была боле выражена (углубление до 2,5 мм) и за счет желудочковой тахикардии происходит расширение QS до 3,8 мм.

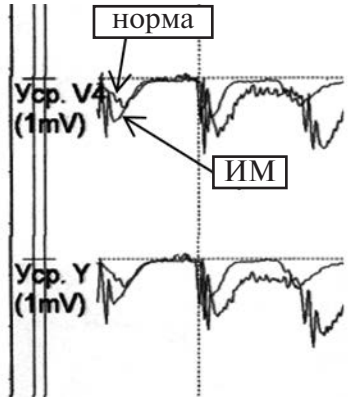


Рис. 6.11. Сравнение кардиограмм сердца у крысы нормы и через 30 суток после ИМ (1 группа)

При сравнении 3 (рис. 6.13) и 4 группы (рис. 6.14), мы видим, что в группе с трансплантацией коммитированных МСК, несколько более выражена ишемия по сравнению с 3 группой (углублений 1 и 1,2 мм соот-

ветственно), в остальном разницы нет, что говорит об отсутствии статических изменений в электрофизиологии сердца животных при обеих методах лечения.

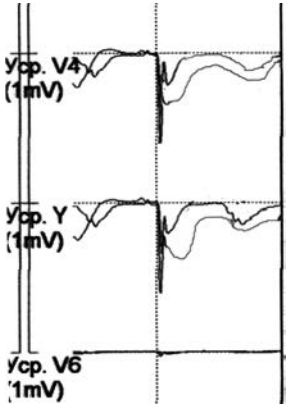


Рис. 6.12. Сравнение кардиограмм сердца у крысы нормы и через 30 суток после трансплантации ФСК (2 группа)

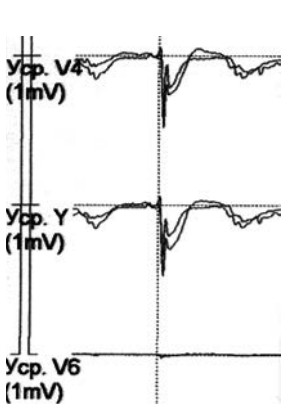


Рис. 6.13. Сравнение кардиограмм сердца у крысы нормы и через 30 суток после трансплантации МСК (3 группа)

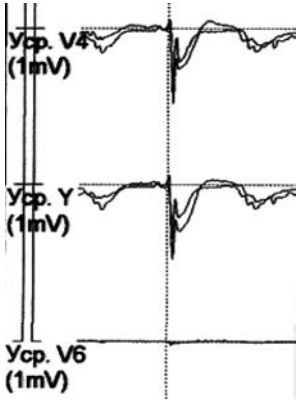


Рис. 6.14. Сравнение кардиограмм сердца у крысы нормы и через 30 суток после трансплантации кМСК (4 группа)

В группе 5 (рис. 6.15) отмечалось углубление QS на 2,5 мм от нормы и расширение его до 2,0 мм (в норме 1,7 мм).

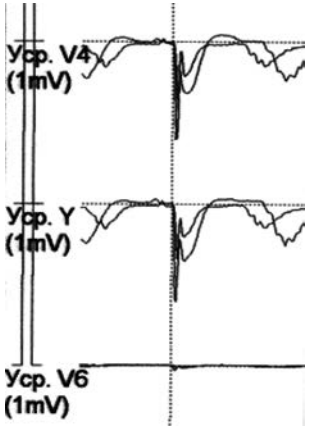


Рис. 6.15. Сравнение кардиограмм сердца у крысы нормы и через 30 суток после трансплантации Г-КСФ (5 группа)

Раздел 7
РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА ПО ИНВАЗИВНЫМ МЕТОДОМ

Через 1 месяц от начала опыта, мы провели сравнительный анализ сократительной функции сердца у крыс при ИМ без лечения и у крыс с трансплантацией МСК в 1 сутки после моделирования.

Исходя из данных таблицы 7.1, мы видим, что у крыс в постинфарктный период достоверно уменьшилась ЧСС на 31 уд/мин, а АД немного уменьшилось по сравнению с нормой. Сопоставление функции ЛЖ сердца показало, что в постинфарктный период в сравниваемых группах РД имеет тенденцию к снижению по сравнению с нормой (на 9 мм рт. ст.) и отсутствует между нормой и ИМ+трансплантацией МСК. Наибольшая разница между группами обнаружена в величине конечного диастолического давления (КДД), которое у крыс с ИМ оказалось увеличено почти в 2 раза, по сравнению с нормой и недостоверно наблюдается по сравнению с группой ИМ+ трансплантация МСК. Увеличение КДД свидетельствует о нарушении механизмов сокращения и расслабления миокарда, поэтому, как уже подчеркивалось нами выше, этот показатель в клинике является важнейшим критерием для оценки функции сердца так же как и конечный диастолический размер ЛЖ. Причем следует отметить, то индекс Катца у крыс с ИМ уменьшился почти на 8 % с высоким уровнем достоверности. При расчете ИФС с учетом массы только сократительного миокарда, т. е. без массы постинфарктного рубца, то ИФС у крыс с ИМ не изменяется. Эти результаты говорят о том, что у крыс в покое сохраняется на прежнем уровне, не смотря на некоторые дефекты сократительной функции сердца. Это означает, что частичная потеря сократительного миокарда на данной стадии хорошо компенсируется работой сохранившегося миокарда. В группе с трансплантационным лечением нет различий не по одному из изучаемых показателей, что говорит об эффективности лечения.

Таблица 7.1

Влияние 1 и 3-месячного постинфарктного ремоделирования сердца на АД и сократительную функцию сердца у крыс различных групп

Серия опыта	Показатели								
	Масса крысы (г)	ЧСС (уд/мин)	АД мм рт. ст.		Давление в ЛЖ мм рт. ст.			Индекс Катца	ИФС
			АДс	Адд	Дс	КДД	РД		
норма	302±16	371±12	90±4,8	62±2,6	103±6,3	4,3±0,2	98±6,4	47120±2839	61±4,7
Модель ИМ 1 мес.	300±11	340±18*	85±3,8	61±3,4	95±4,5*	9,9±0,84	92±4,3	36227±2175*	55±3,4
Модель ИМ 3 мес.	306±25	375±24	92±4,3	63±4,1	83±3,2	18,5±2,4	66±3,2	35487±1864	51±2,1
ИМ + трансплантация МСК 1 мес.	308±8	368±13	87±3,4	61±3,3	99±5,2	4,9±0,3	97±6,5	44418±2975	59±4,1
ИМ + трансплантация МСК 3 мес.	305±7	370±17	86±2,9	60,8±3,3	104±4,7	5,1±0,47	92±5,8	43258±2147	58±3,6

Примечания:
1. Адс — артериальное давление систолическое.
2. Адд — артериальное давление диастолическое.
3. Дс — систолическое давление в ЛЖ.
4. КДД — конечно-диастолическое давление.
5. РД — развиваемое давление.
6. *— достоверность различий между показателями нормы и ИМ ($p < 0,05$).

Через 3 месяца по данным УЗИ и вычисляемым показателям, мы видим что наблюдается выраженная гипертрофия левого желудочка, в 1,14 раза, в результате чего относительная масса сердца крысы увеличивается на 1,1 %. Следует отметить, что если гипертрофия ЛЖ связана с возросшей механической нагрузкой на сохранившийся миокард, то гипертрофия правого желудочка обусловлена легочной гипертензией, характерной для сердечной недостаточности. Гипертрофия правого желудочка в сравниваемых группах была значительной в 92 %, причем относительная масса правого желудочка выросла на 46 %, несмотря на то, что относительная масса сердца увеличилась почти в 2 раза при том, что масса сердца возросла на 49 %. Из ранее проведенных исследований установлено, что при ИМ, помимо других систем, происходит активация системы эндотелина-1 (Sauvageau S. et al., 2006). Причем источником эндотелина-1 является легочная сосудистая система, в которой обнаружено увеличение экспрессии фермента (Tonnessen T. et al., 1998; Sakai S. et al., 1996) и активация эндотелиин-превращающегося энзима (Lueder T. G. et al., 2004). Следует отметить, что в группе с ИМ в течении 3 месяцев погибло 25 % животных, в группе с трансплантацией МСК и контролем не одного животного.

Через 3 месяца после ИМ, в отличие от 1-месячного ИМ, наблюдается существенное угнетение сократительной функции сердца в сравниваемых группах. В первую очередь обращает на себя внимание значительное увеличение КДД в ЛЖ у крыс с ИМ. В постинфарктном периоде значительно снижается РД — на 20 %, при чем ЧСС остается неизменным. Индекс Катца у крыс уменьшился на 12 %, а ИФС на 15 %. Следует отметить, что развиваемое систолическое давление в ЛЖ у крыс с ИМ в срок 3 месяца гораздо меньше, чем в срок 1 месяц, меньше также и диастолическое давление, это связано с низким КДД и более высоким КДО. В группе с трансплантацией МСК, нет существенных различий в показателях по сравнению с нормой.

Таким образом, если в срок 1 месяц после моделирования ИМ обнаружены незначительные угнетения насосной функции сердца, на фоне выраженной депрессии сократительной функции сердца. Это связано с тем, что в начале ремоделирования сердца на фоне ИМ, компенсация СН происходит за счет повышенного давления

наполнения ЛЖ, что отражается в повышении КДД, КДО и КД размеров ЛЖ, а затем и ПЖ. Эти факторы в определенные сроки после ИМ могут способствовать сохранению МО на уровне, достаточном для сохранения жизнеспособности организма. Однако к сроку 3 месяца компенсаторные возможности сердца заканчиваются и происходит декомпенсация СН, что приводит к высокому уровню летальности среди животных с ИМ.

Раздел 8
РЕЗУЛЬТАТЫ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

8.1. Морфологические изменения в участке инфаркта миокарда у животных без лечения (в разные сроки эксперимента)

Экспериментальное моделирование острого инфаркта миокарда в сочетании с современными и классическими методами исследования незаменимо в решении проблемы для понимания патоморфофизиологических механизмов развития данного заболевания у людей и разработки новых способов его лечения. Лигирование передней левой межжелудочковой артерии у лабораторного животного приводило к образованию последовательных изменений, которые напоминают картину острого ИМ у человека. К концу 1 суток моделирования острого ИМ в зоне ишемии наблюдаются все признаки, характерные для стадии альтерации при наблюдаемой воспалительной реакции, сопровождаемой воспалительной реакцией, сопровождающиеся набуханием и отеком кардиомиоцитов, появляются первые признаки дистрофии и дегенеративные признаки. Кардиомиоциты начинают терять свою поперечную очерченность, в интерстициальной ткани и между мышечными волокнами появляются клеточные инфильтраты, содержащие нейтрофилы, моноциты и лимфоциты. С сосудах микроциркуляторного русла наблюдается стаз клеток крови, кровоизлияния и лейкоцитарная инфильтрация. Четких границ некроза в данный период не наблюдается.

К 3–4 суткам отмечается продолжение классической воспалительной реакции в виде инфильтрации зоны повреждения тканевыми макрофагами, лейкоцитами и лимфоцитами, также отмечается образование грануляционной ткани в виде барьера вокруг зоны повреждения, где отмечались явления миоцитолиза. На рисунке 8.1 показанный свежий коагуляционный некроз миокарда с выраженным перифокальним воспалением на 3 сутки эксперимента.

Одновременно с этим, наблюдалось повышенная активность стромального компонента, в виде пролиферации клеток стромы и

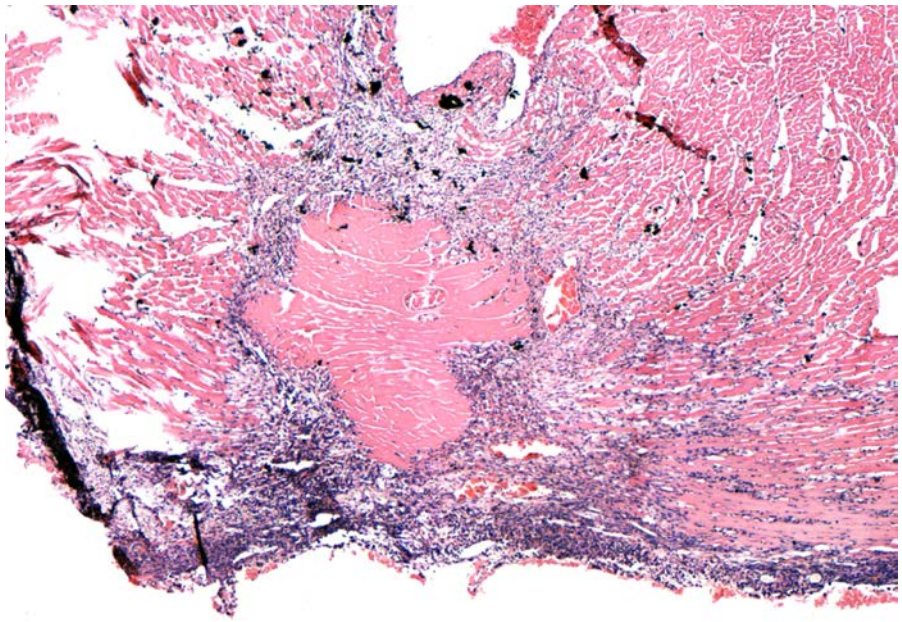


Рис. 8.1. Коагуляционный некроз миокарда у крыс без лечения на 3 сутки после перевязки передней левой межжелудочковой артерии. Окраска гематоксилином и эозином, х10

активации эндотелиоцитов. Появлялись явления формирования рубца в виде синтеза коллагена без образования коллагеновых волокон. Короткие толстые коллагеновые структуры, ориентированы правильно. ИМ прогрессировал в результате периферического миоцитолиза, что значительно расширяло зону поражения. Во внеинфарктной зоне наблюдался отек кардиомиоцитов и формирование сладжей эритроцитов в капиллярах.

К 7 суткам после моделирования ИМ, определяется организующийся инфаркт. В зоне повреждения наблюдались отдельные островки кардиомиоцитов подвергшиеся миоцитолизу. Процесс инфильтрации уменьшался, в зоне повреждения было гораздо меньше макрофагов, лейкоцитов, лимфоцитов, чем на 3–4 сутки. Мышечные клетки начинают подвергаться резорбции, очевидно, за счет фагоцитоза и выделения лизосомальных ферментов. Наблюдались начальные этапы формирования соединительной ткани в зоне повреждения. В толще формирующейся соединительной ткани выявляются множественные молодые тонкостенные сосуды и фибробласты. Следует подчеркнуть, что пролиферативная реакция со стороны соединительной ткани возникают именно в тот период, когда вместо гранулоцитов в миокарде начинают преобладать мононуклеаные клетки (моноциты, макрофаги и лимфоциты). В центральных участках некротической области происходило построение коллагеновых волокон. Вне зоны повреждения наблюдались функциональная перегрузка и интрацеллюлярный отек кардиомиоцитов. К 21 стукам процесс инфильтрации закончился и тканевые макрофаги, лейкоциты и лимфоциты определялись только в периваскулярном пространстве. В зоне повреждения происходило активное формирование и структуризация рубцовой соединительной ткани, коллагеновых волокон и небольшого количества отдельных эластических волокон. В соединительной ткани отмечали большое количество сосудов синусоидного типа с тонкой, легко растягивающейся стенкой. Патологические процессы захватывали не только зону некроза, но и кардиомиоциты в пограничной области, где отмечался интерцеллюлярный отек. Отек провоцировался ситуацией «no reflow», когда в зоне находящейся вне перевязки, нарушался кровоток, поскольку сосуды сдавливались кардиомиоцитами. В таком случае высока вероятность повторного инфаркта в интактной зоне. К 30–35 суткам в зоне некроза сформировалась рубцовая ткань. Соединительная ткань содержала сосуды синусоидного типа. В пограничной зоне наблюдались признаки прогрессирующего периферического повреждения миокарда: инфильтрация, активация стромального компонента, формирование грануляционной ткани. Во внеинфарктной зоне происходила функциональная перегрузка и отек кардиомиоцитов. В некоторых случаях наблюдались периваскулярно расположенные островки мышечных волокон. Таким образом у животных без лечения формировался большой рубец, который распространялся на все пластов миокарда и за своими свойствами напоминал картину трансмурального ИМ у человека (рис. 8.2).

Учитывая то, что экспериментальный ИМ у крыс сопровождался хирургическим вмешательством в виде прошивания и перевязки коронарного сосуда, то у некоторых животных наблюдался перикардит как следствие разреза перикарда и асептическое воспа-

Рис. 8.2. Участок миокарда, который рубцуется, на верхушке левого желудочка на 30 сутки эксперимента у крыс без лечения. Определяется большой рубец с формированием аневризмы. Окраска гематоксилином и эозином, х5

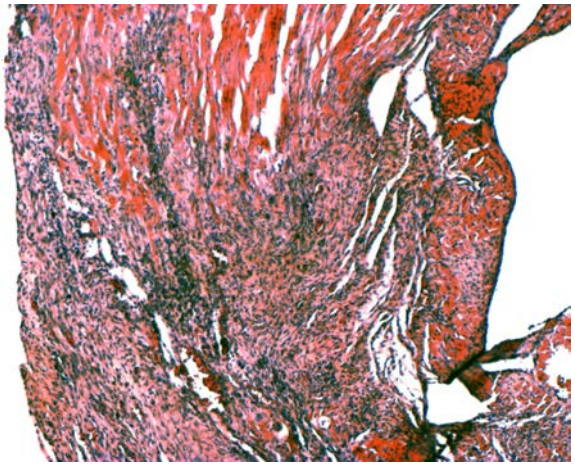


Рис. 8.3. Участок миокарда, который рубцуется, на 30 сутки эксперимента у крыс без лечения. Определяется большой рубец на месте трансмурального инфаркта с формированием аневризмы. Окраска гематоксилином и эозином, х30

ление как реакцию на стерильный шовный материал в месте перевязки (рис. 8.4). Соответственно если в зону прошивания попадал эпикардиальный слой миоцитов, то наблюдался коагуляционный некроз в зоне лигатуры.

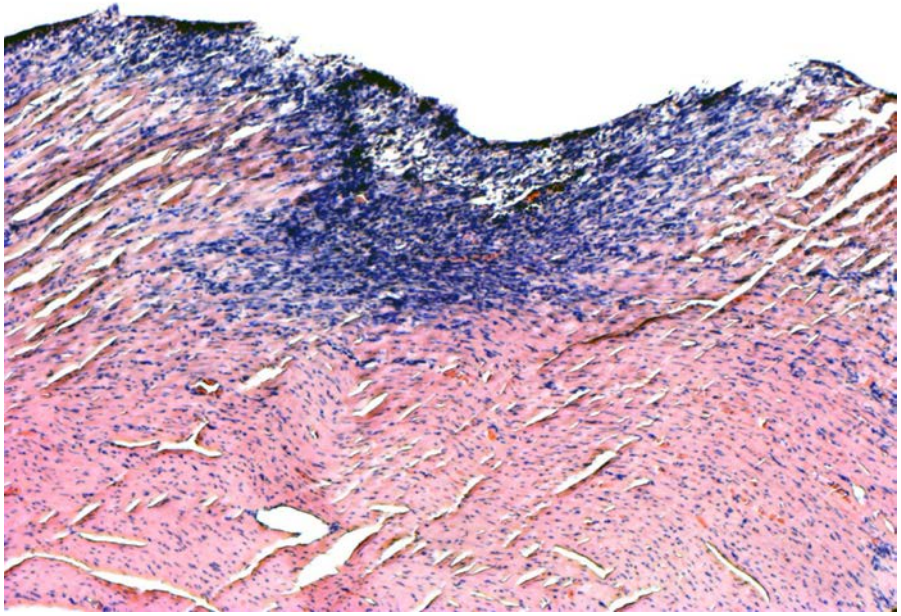


Рис. 8.4. Очаг коагуляционного некроза в месте наложения лигатуры. Отсутствие поперечной исчерченности мышечных волокон, гемолиз эритроцитов в капиллярах. Окраска гематоксилин и эозином. Х40

При иммуногистохимическом окрашивании на актин и тропонин Т наиболее ярко визуализировалась тотальная гибель мышечных волокон в зоне рубцевания. На 30 день стенка участки, которая рубцевалась, была полностью представленная соединительной тканью. При этом во все сроки находили пролиферирующие клетки соединительной ткани и сосудистой стенки, которая свидетельствует о том, что на данный срок еще длятся процессы неполной регенерации и ремоделирования (рис. 8.5–8.7). Также обращало на себя внимание множество сосудов синусоидного типа в ранние сроки после инфаркта, которые позднее приобретали стенку, но тем не менее их просвет оставался широким.

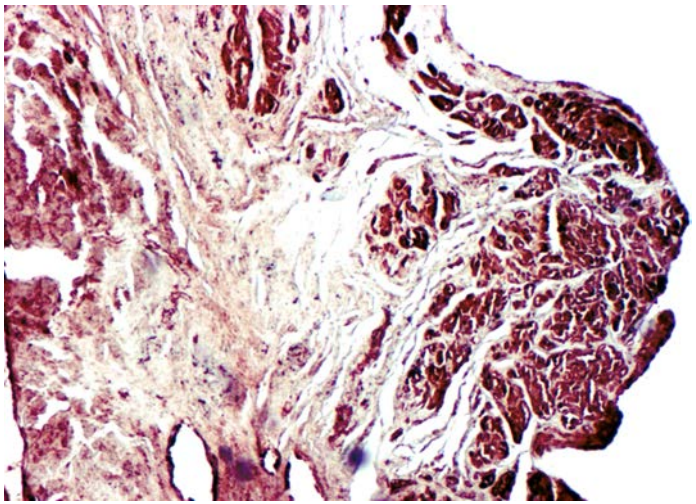


Рис. 8.5. Участок миокарда, который рубцуется, на 30 сутки эксперимента у крыс без лечения. Большой рубец с сохранением одиночных пучков мышечных волокон в субэпикардиальных отделах. ИГХ-Окраска с антителами к тропонину Т, х30

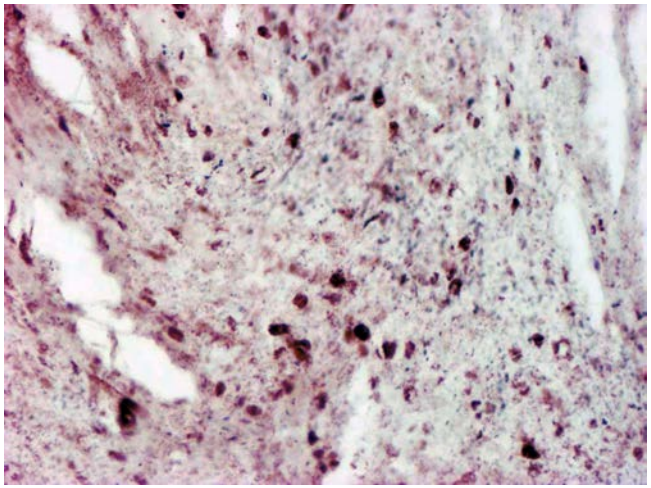


Рис. 8.6. Участок миокарда, который рубцуется, на 30 сутки эксперимента у крыс без лечения. Большой рубец с большим количеством клеток соединительной ткани, которая пролиферирует. ИГХ-Окраска с антителами к PCNA, х150

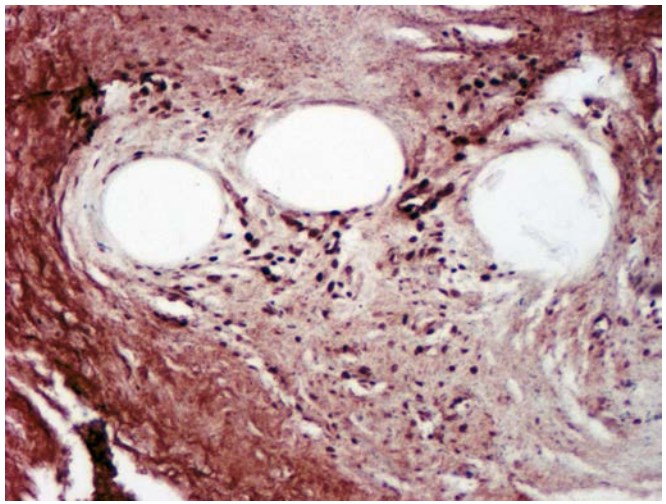


Рис. 8.7. Участок миокарда, который рубцуется, на 30 сутки эксперимента у крыс без лечения. Активная пролиферация клеток соединительной ткани вокруг сосудов. ИГХ-окраска с антителами к PCNA, х75

8.2. Морфологические изменения в участке инфаркта миокарда у животных с различными видами кардиомиопластики (в разные сроки эксперимента)

Следует отметить, что уже при качественном морфологическом исследовании после трансплантации как «аутологичных» МСК, так и «потенциированных аутологичных» МСК или кМСК, отмечалось существенное отличие морфологической картины в поврежденном участке. Прежде всего, в участке инфаркта наблюдали чередование участков мышц, которые сохранились, и полей рубцовой ткани. Данные изменения подтверждаются тем, что ни в одном случае после трансплантации МСК мы не наблюдали формирования аневризм (рис. 8.8). При иммуногистохимической окраске на актин и тропонин Т мы наиболее четко видели чередование участков мышц, которые сохранились, и полей рубцовой ткани (рис. 8.9–8.10). Кроме того, начиная со срока в 21 суток мы визуализировали только одиночные пролиферирующие клетки в рубце, который свидетельствует о завершенности процесса рубцевания на данный срок. Кро-

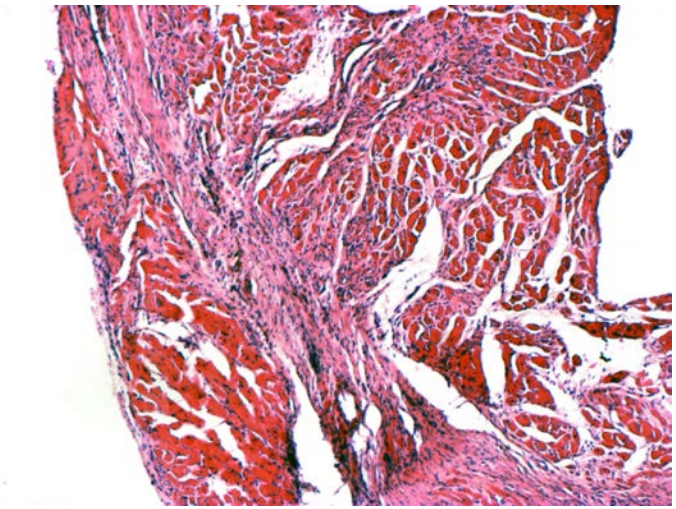


Рис. 8.8. Участок миокарда, который рубцуется, на 30 сутки эксперимента у крыс после трансплантации «потенциированных» МСК на 7 сутки после моделирования ИМ. Рубец на месте интрамурального инфаркта. Окраска гематоксилином и еозином, х10

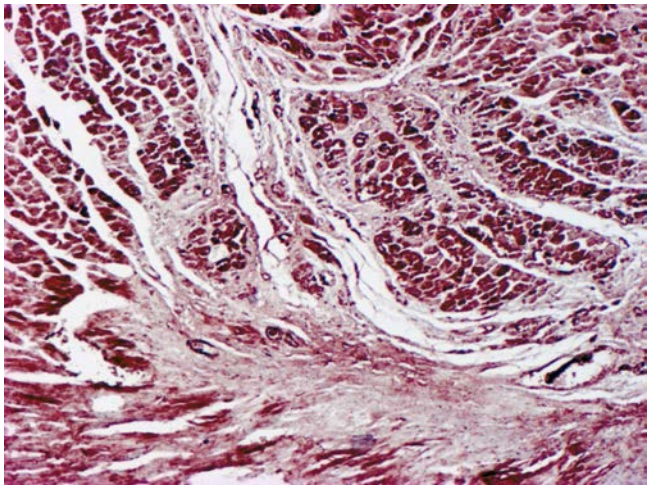


Рис. 8.9. Участок миокарда, который рубцуется, на 30 сутки эксперимента у крыс после трансплантации МСК. Рубец на месте интрамурального инфаркта. ИГХ-окраска с первичными антителами к тропонину Т, х30

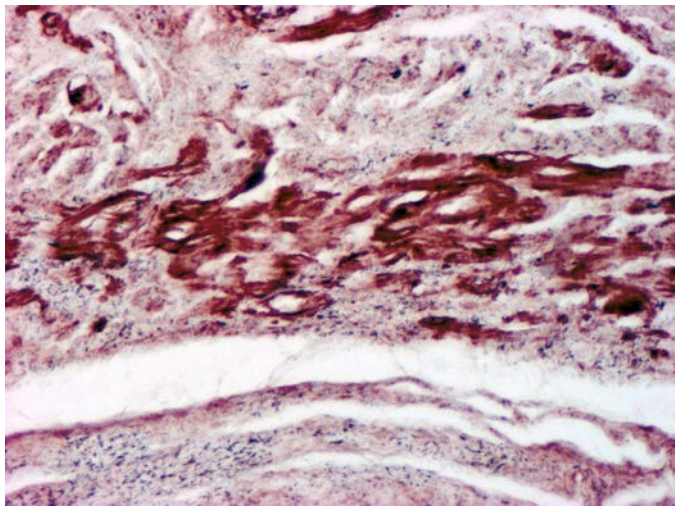
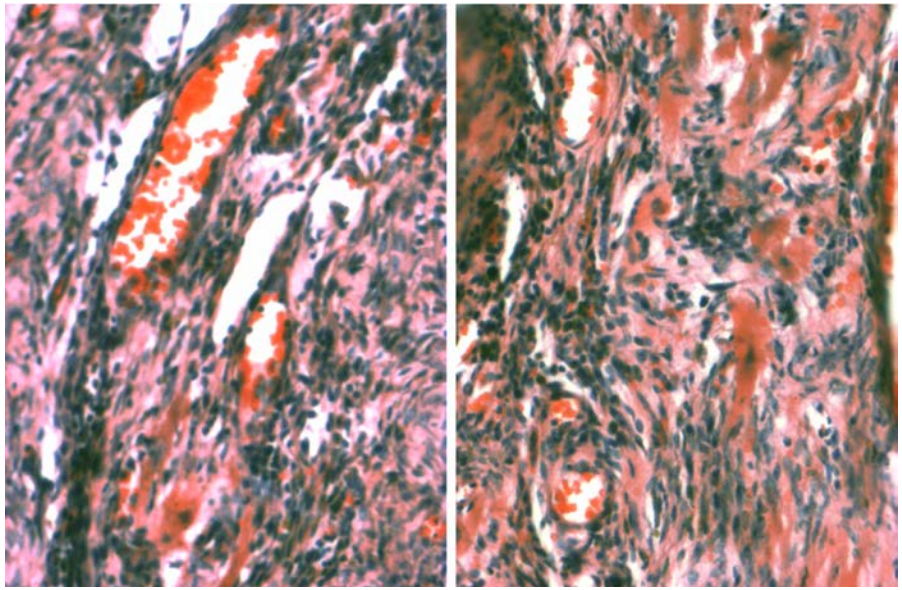


Рис. 8.10. Участок миокарда, который рубцуется, на 30 сутки эксперимента у крыс после трансплантации МСК. Чередование сохраненных пучков кардиомиоцитов и рубцовой ткани. ИГХ-окраска с первичными антителами к актину, х150

ме того, привлекал внимание разное состояние сосудов у животных что получали и не получали лечение (рис. 8.11). У животных после трансплантации, сосудов было больше на единицу площади, их просвет был меньше, они имели хорошо сформированную стенку.

При использовании гибридизации in situ мы выявили в рубце, который формируется, у крыс-самок клетки с наличием Y-хромосомы в ядре, то есть клетки-преемники пересаженных МСК. При окраске тканей самок, которым трансплантацию не выполняли, мы не наблюдали никакой окраски при использовании проб к Y-хромосомы (рис. 8.12–8.13), но контрольная окраска 12 хромосомы была положительным как у самок, так и у самцов (рис. 8.14–8.16). Клетки с Y-хромосомой мы выявляли среди эндотелиальных клеток, в стенке сосудов, которые формируются, и среди фибробластов рубца (рис. 8.17–8.22). В соседних с рубцом пучках миокарда мы не выявляли положительных клеток.

Таким образом, трансплантация МСК приводит к значительному улучшению васкуляризации в зоне инфаркта, которая, возможно, приводит к уменьшению ишемии в пограничных с инфар-



Без лечения *Трансплантация МСК*

Рис. 8.11. Сравнение сосудов у животных без трансплантации и после трансплантации. Окраска гематоксилином и эозином, х300

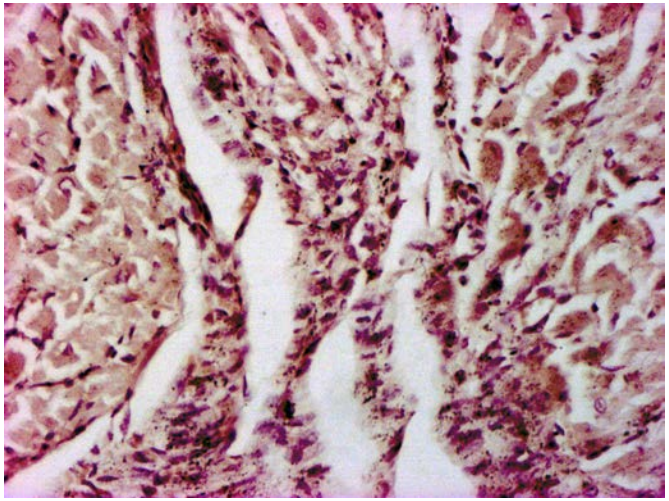


Рис. 8.12. Крысы без трансплантации. Клетки в рубце не содержат Y-хромосому. Гибридизация in situ с маркером к Y-хромосоме, х150

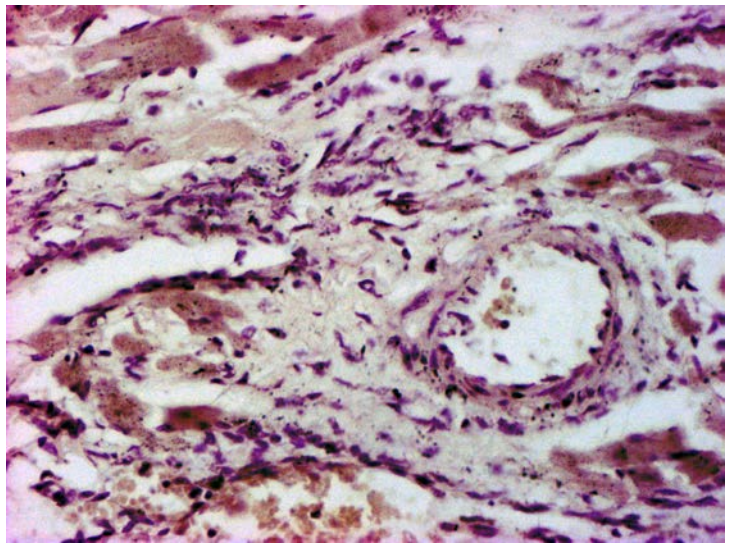


Рис. 8.13. Крыса без трансплантации. Клетки в рубце и стенках сосудов не содержат Y-Хромосому. Гибридизация in situ с маркером к Y-хромосомы, х150

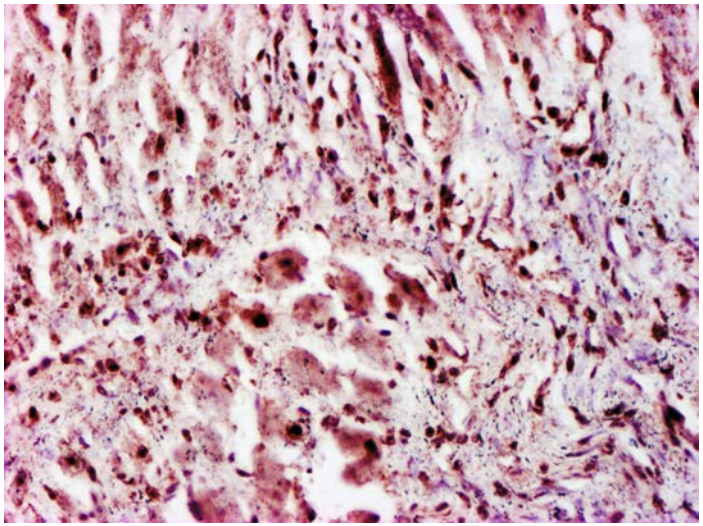


Рис. 8.14. Положительный контроль (12 хромосома) в миокарде крыс после трансплантации кМСК на 30 сутки. Гибридизация in situ с маркером к 12 хромосоме, х150

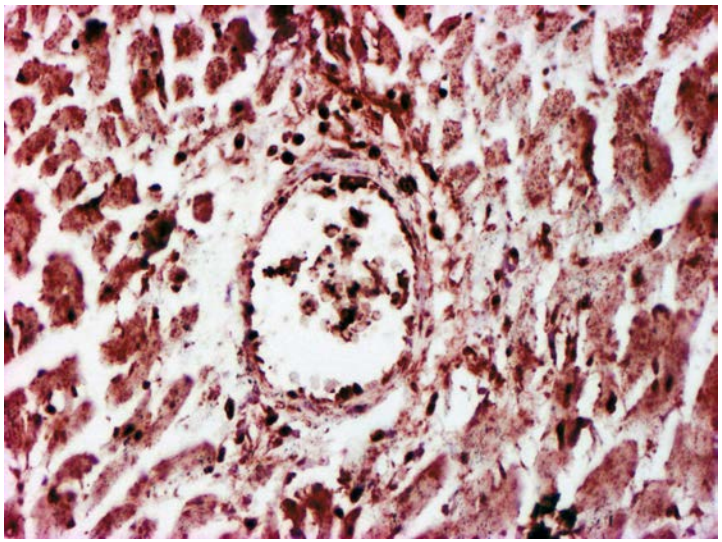


Рис. 8.15. Положительный контроль (12 хромосома) в миокарде крыс после трансплантации кМСК на 30 сутки. Гибридизация in situ с маркером к 12 хромосоме, х150

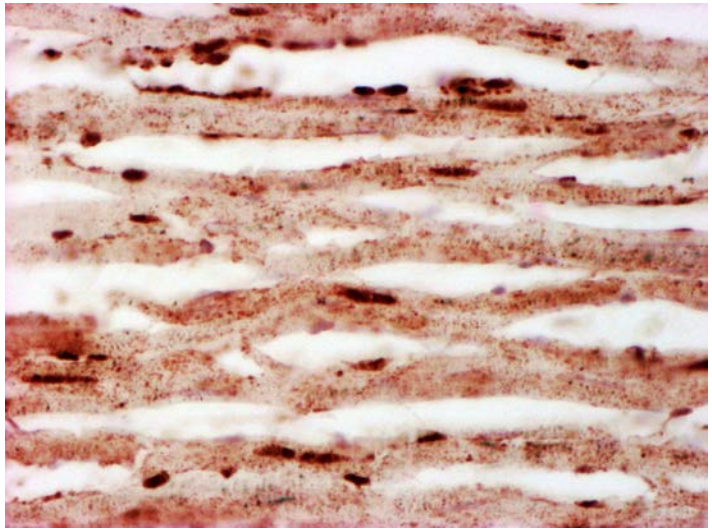


Рис. 8.16. Положительный контроль (12 хромосома) в миокарде крыс после трансплантации кМСК на 30 сутки. Гибридизация in situ с маркером к 12 хромосоме, х270

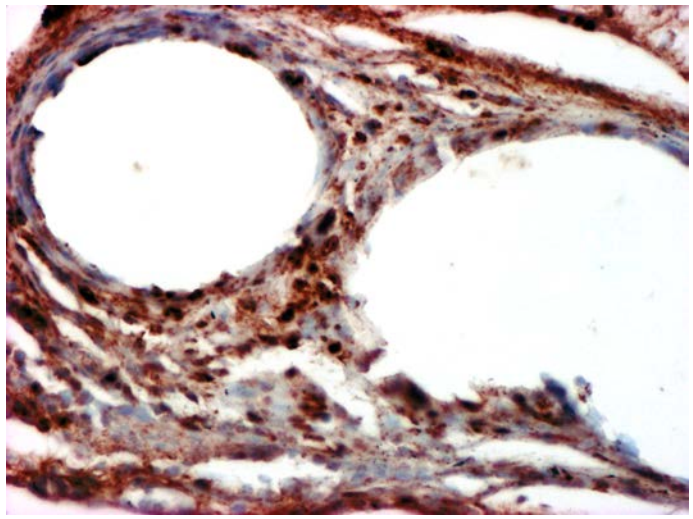


Рис. 8.17. Клетки, которые содержат Y-хромосому, в стенках сосудов и соединительной ткани вокруг них у крыс-самок на 30 день после трансплантации МСК. Гибридизация in situ с маркером к Y-хромосоме, х180

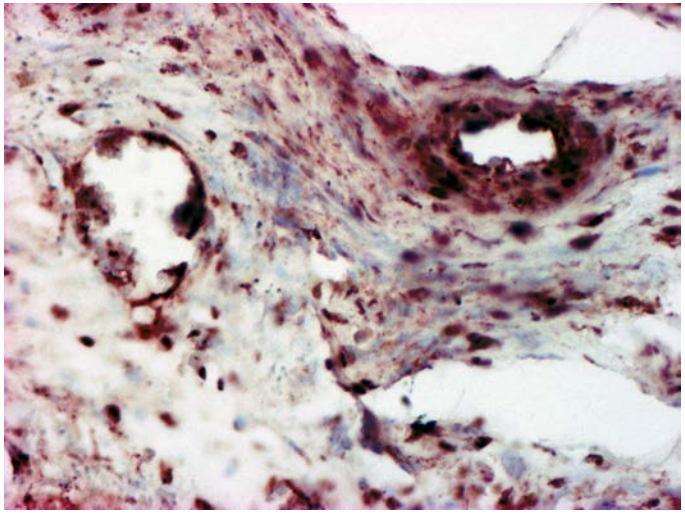


Рис. 8.18. Клетки, которые содержат Y-хромосому, в стенках сосудов и соединительной ткани вокруг них у крыс-самок на 30 день после трансплантации МСК. Гибридизация in situ с маркером к Y-хромосоме, х300

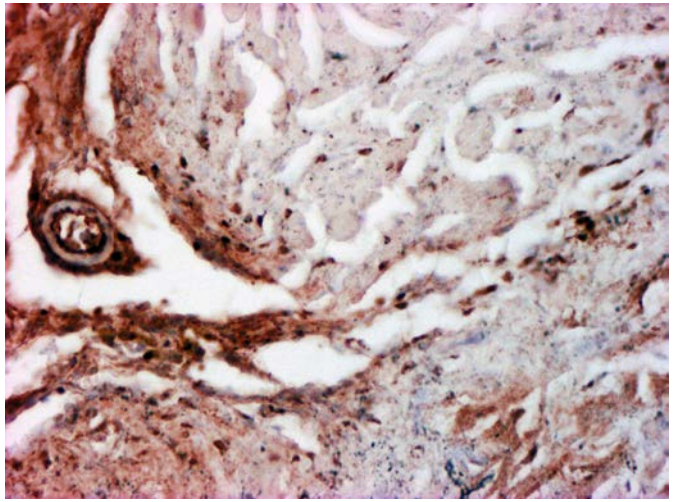


Рис. 8.19. Клетки, которые содержат Y-хромосому, в стенках сосудов и соединительной ткани между мышцами у крыс-самок на 30 сутки после трансплантации МСК. Гибридизация in situ с маркером к Y-хромосоме, х150

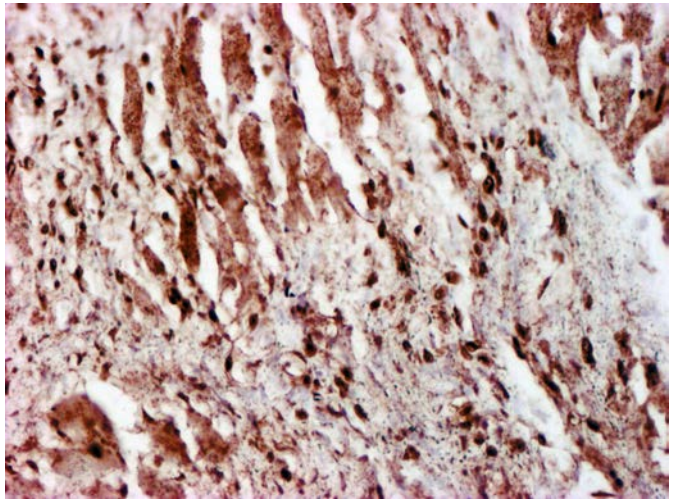


Рис. 8.20. Клетки, которые содержат Y-хромосому, в соединительной ткани у крыс-самок на 30 сутки после трансплантации кМСК (такое же поле зрения, которое на рисунке 5.13). Гибридизация in situ с маркером к Y-хромосоме, х150

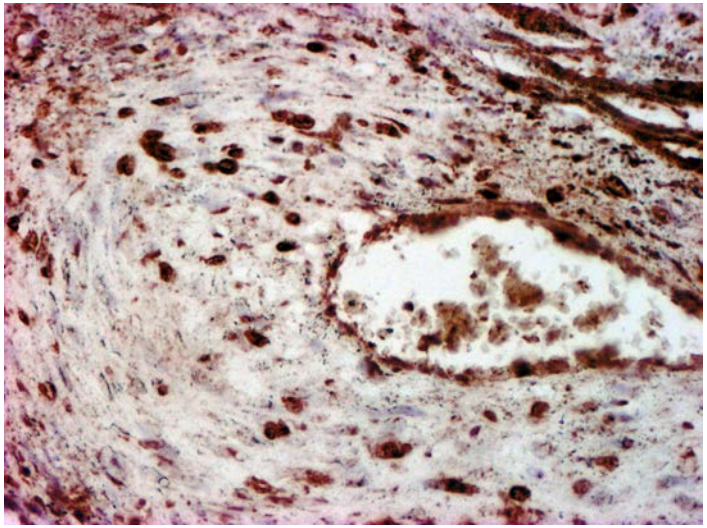


Рис. 8.21. Клетки, которые содержат Y-хромосому, в соединительной ткани и стенке сосудов у крыс-самок на 30 сутки после трансплантации кМСК. Гибридизация in situ с маркером к Y-хромосоме, х150

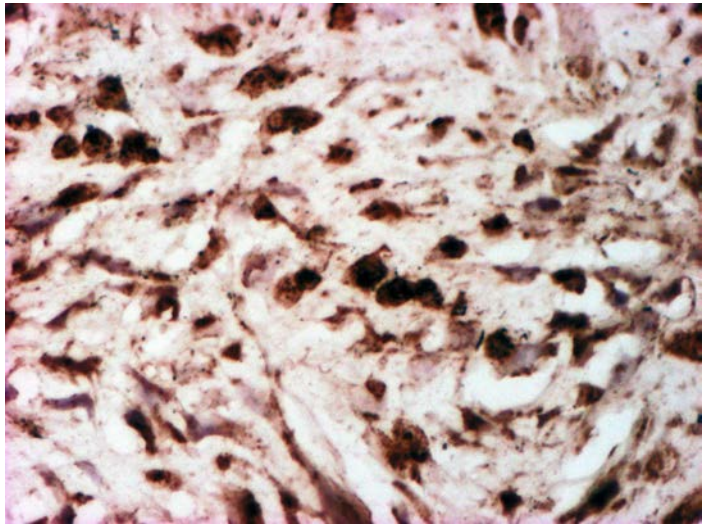


Рис. 8.22. Клетки, которые содержат Y-хромосому, в соединительной ткани у крыс-самок на 30 сутки после трансплантации кМСК. Гибридизация in situ с маркером к Y-хромосоме, х300

ктом зонах, снижение ишемического повреждения кардиомиоцитов в этих зонах, которые в результате содействует уменьшению площади рубца и предупреждению формирования аневризмы сердца. Доказано, что трансплантированные клетки активно принимают участие в формировании сосудов и соединительной ткани в зоне рубцевания. Процесс рубцевания завершается на 21 сутки после моделирования ИМ. При обычном морфологическом исследовании мы не определили значащих отличий между группами животных после трансплантации МСК и потенциированных МСК. При исследовании миокарда животных после внутривенного введения культуры ФСК и гранулоцитарного фактора роста мы визуализировали изменения, аналогичные таким у животных без трансплантации. Поэтому для объективизации различия между группами животных мы провели морфометрические исследование, результаты которого приведены ниже.

8.3. Морфометрические исследования инфаркта миокарда у животных после различных видов клеточной кардиомиопластики

Для количественного анализа состояния рубца проводили морфометрическое исследование. Поскольку при рубцевании инфаркта миокарда происходит уменьшения его размера, то в первую очередь определяли степень контракции очага ИМ. Для этого определяли внешний и внутренний диаметры нормальной ткани миокарда, пограничной с участком инфаркта. Таким образом, теоретически возможную площадь миокарда в тотальном срезе вычисляли за формулой $S = \pi \cdot (R^2_{\text{внешний}} - r^2_{\text{внутренний}})$. Поскольку участок инфаркта захватывал определенный сектор этого кольца, то теоретическую первоначальную площадь участка инфаркта определяли путем деления площади всего кольца на удельный объем инфацированного участка по отношению ко всей площади кольца. После этого вычисляли удельный объем рубца путем деления его площади в срезе на теоретическую первоначальную площадь. Также морфометрически вычисляли удельный объем соединительной ткани и сосудов в рубце.

Вычисляли площадь участка инфаркта (путем деления площади всего кольца на удельный объем инфацированного участка по

отношению ко всей площади кольца), удельный объем рубца путем деления его площади в срезе на теоретическую первоначальную площадь, удельный объем соединительной ткани и сосудов в рубце (рис. 8.23–8.25).

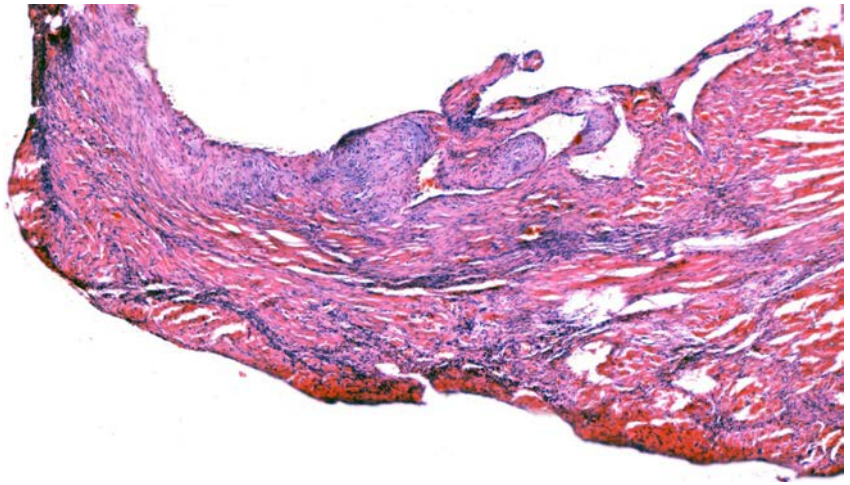


Рис. 8.23. Инфаркт миокарда. 30 сутки после введения потенциированных стволовых клеток

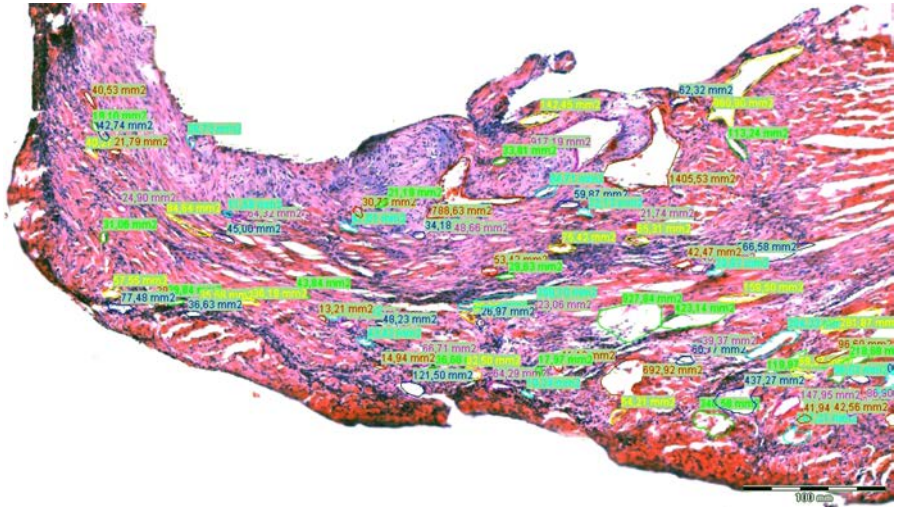


Рис. 8.24. Инфаркт миокарда, с формированием рубца. Морфометрия сосудов

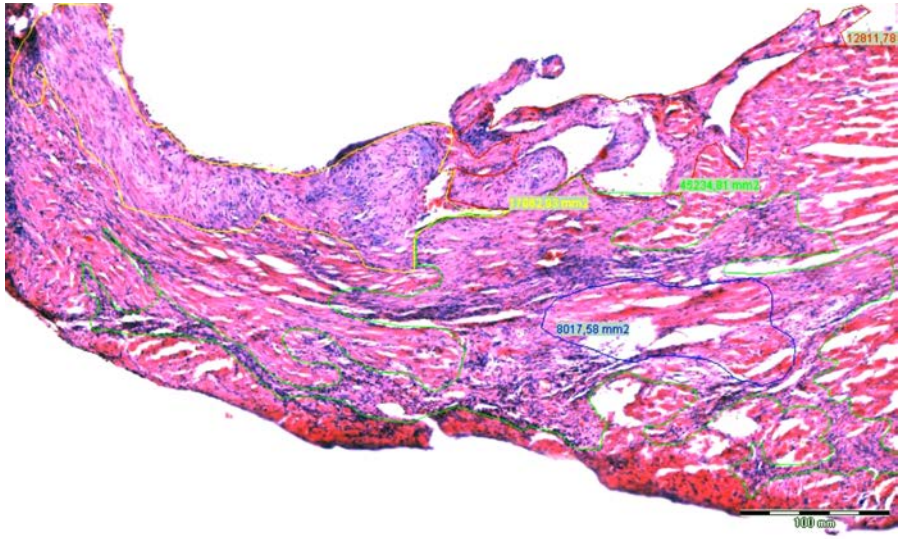


Рис. 8.25. Инфаркт миокарда.
Морфометрия соединительной ткани

Как видно из табл. 8.1, в 3 группе с трансплантацией МСК, практически по всем изученными показателями было достигнуто существенным образом лучшие результаты в сравнении с нелеченными животными (группа 1), причем уровень достоверности различий был как правило меньше 0,01.

Таблица 8.1

Морфометрический анализ результатов трансплантации МСК

Средние по группам	ИМ	Трансплантация МСК
Удельный объем участка инфаркта от исходной ткани, %	65,83	24,02 p < 0,001
SD	8,21	1,04
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды,%	33,78	17,73 p < 0,01
SD	1,72	5,69
Удельный объем сосудов,%	6,32	9,42 p < 0,05

Продолжение таблицы 8.1

Средние по группам	ИМ	Трансплантация МСК
SD	0,16	3,33
Среднее кол-во сосудов на 100000 мкм^2	10,21	68,20 p < 0,001
SD	1,26	4,64
% сохранившихся мышечных волокон (от исходного)	15,90	45,04 p < 0,01
SD	0,28	9,81

Особенно впечатляющие результаты получены при исследовании среднее количества сосудов на 100 тыс. мкм^2 (10,21 ± 1,26 без лечения в сравнении с 68,2 ± 4,64 у крыс с моделью острого ИМ после введения МСК). У животных без лечения сосуды представляли собой широкие сосуды с большим просветом, тогда как у нелеченных это были сосуды небольшого диаметра. Поэтому мы также вычислили удельное количество сосудов на 100 000 мкм^2 ткани рубца. Таким образом количество сосудов на 100 тыс. мкм^2 в группе с трансплантацией МСК стало в 6 раз больше. Следует учитывать, что удельный объем участка ИМ в 1 группе составил 65,89 ± 8,21 %, а в 3 группе — 24,02 ± 1,04 %, т. е. площадь инфаркта миокарда уменьшилась почти в 3 раза. Благоприятная динамика со стороны сосудов сопровождалась существенным улучшением показателей: уменьшением объема соединительной ткани в зоне ИМ с 33,78 % до 17,73 % (в 1,9 раза), увеличение процента сохраненных мышечных волокон (КМЦ) с 15,9 до 45,04 % (в 2,8 раз).

Итак, трансплантация МКС при экспериментальном ИМ у крыс приводит к уменьшению зоны ИМ в 3 раза, при этом соединительнотканный компонент зоны инфаркта уменьшился в 1,9 раза, за счет увеличения количества сосудов в 6 раз и сохранения мышечных волокон в 2,6 раза больше чем в 1 группе.

Как видно из табл. 8.2, в 4 группе, также за всеми изученными показателями было достигнуто существенным образом лучшие результаты в сравнении с 1 группой животными с высоким уровнем достоверности различий.

Таблица 8.2

Морфометрический анализ результатов трансплантации кМСК

Средние по группам	ИМ	Трансплантация кМСК
Удельный объем участка инфаркта от исходной ткани, %	65,83	26,84 p < 0,01
SD	8,21	8,07
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды, %	33,78	15,39 p < 0,01
SD	1,72	7,48
Удельный объем сосудов, %	6,32	8,71 p < 0,05
SD	0,16	3,67
Среднее кол-во сосудов на 100000 мкм^2	10,21	49,35 p < 0,001
SD	1,26	7,75
% сохранившихся мышечных волокон (от исходного)	15,90	48,17 p < 0,01
SD	0,28	8,90

Также существенные результаты получены при исследовании удельного количества сосудов на 100 тыс. мкм^2 (10,21 ± 1,26 без лечения в сравнении с 49,4 ± 7,75 у крыс с моделью ИМ после введения потенцированных МСК). Благоприятная динамика со стороны сосудов сопровождалась существенным улучшением других показателей: уменьшением объема соединительной ткани в зоне ИМ, увеличение процента сохраненных мышечных волокон (КМЦ).

При анализе морфометричних данных видно, что удельный объем инфацированного участка у крыс без лечения составил 24,02 % от первоначального объема, то есть возникло уменьшение площади миокарда в 4 раза. В группах животных, которым выполняли трансплантацию кМСК, наблюдали более чем двукратное уменьшение площади рубца. При этом в животных 1 группы 34 % площади образования рубца, было занято соединительной тканью, а в 4 группе животных — 15,4 %. Удельный объем сосудов в участке рубцевания в 4 группе животных был ниже, чем у животных без лечения, однако самые сосуды были разного строения. Так, у животных без лечения

сосуды представляли собой широкие сосуды с большим просветом, тогда как у животных 4 группы эти сосуды были небольшого диаметра. Поэтому мы также вычислили удельное количество сосудов на 100 000 мкм^2 ткани рубца. По полученным данным видно, что удельное количество сосудов на единицу объема приблизительно в 6 раз больше после трансплантации кМСК.

Следует отметить, что трансплантация кМСК продемонстрировала такой же морфологический эффект (кроме среднего количества сосудов на 10 000 мкм^2), чем необработанных МСК.

Как видно из табл. 8.3, статистически достоверного улучшения не было достигнуто ни по одному из изученных нами показателей, которое подтверждает отсутствие существенного прогресса от введение ЭСК.

Таблица 8.3

Морфометрический анализ результатов трансплантации ЭСК

Средние по группам	ИМ	Трансплантация ЭСК
Удельный объем участка инфаркта от исходной ткани, %	65,83	57,58
SD	8,21	2,87
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды, %	33,78	28,37
SD	1,72	2,33
Удельный объем сосудов, %	6,32	8,14
SD	0,16	1,99
Среднее кол-во сосудов на 100000 мкм^2	10,21	15,62
SD	1,26	5,24
% сохранившихся мышечных волокон (от исходного)	15,90	16,81
SD	0,28	0,60

У животных после введения гранулоцитарного фактора роста установлено статистически достоверное повышение удельного объема сосудов и удельного количества сосудов на 100 тыс. мкм^2. Эти данные целиком предвиденные, потому что гранулоцитарний фактор роста усиливает пролиферацию эндотелиальных клеток и выход стволовых гемопоетичних клеток в кровь, которая стимули-

рует ангиогенез в участках повреждения миокарда (табл. 8.4). Но эти изменения в сосудистом русле не привели к достоверному сохранению кардиомиоцитов, хотя тенденция к увеличению удельного объема участки инфаркта от исходной ткани и процента сохраненных мышечных волокон и уменьшения удельного объема соединительной ткани являются наглядными, однако расхождения между животными были очень большими, что и привело к большому значению стандартного отклонения и значения p больше 0,05. По всей вероятности это связано ненаправленным ангиогенезом, чем при введении МСК. Возможно, этот эффект можно повысить за счет большей дозы гранулоцитарного фактора роста, или за счет многоразового введения. То есть, положительное влияние введения гранулоцитарного фактора роста на морфогенез постинфарктных изменений в миокарде можно считать доказанным, но влияние дозы и схемы введения препарата на выразительность изменений нуждается в дополнительном исследовании.

Таблица 8.4

Морфометрический анализ результатов введения Г-КСФ

Средние по группам	ИМ	Введение Г-КСФ
Удельный объем участка инфаркта от исходной ткани, %	65,83	52,25
SD	8,21	4,25
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды,%	33,78	23,11
SD	1,72	3,79
Удельный объем сосудов, %	6,32	9,75 $p < 0,05$
SD	0,16	0,54
Среднее кол-во сосудов на 100000 мкм^2	10,21	25,62 $p < 0,05$
SD	1,26	3,25
% сохранившихся мышечных волокон (от исходного)	15,90	22,17
SD	0,28	1,33

Итак, мы 1 части исследования мы исследовали 4 наиболее популярных вариантов клеточной кардиомиопластики, а именно

трансплантация фетальных СК, мезенхимальных СК, коммитированных МСК, а также введение грануляцитарного колониестимулирующего фактора (рис. 8.26). Исходя из диаграммы, мы видим, что наихудшие результаты мы получили при трансплантации ЭСК и введения Г-КСФ. Неожиданный результат от ЭСК, был видимо из-за отсутствия целенаправленного действия клеток, т. е. отсутствием или слабовыраженного хоуминг-эффекта.

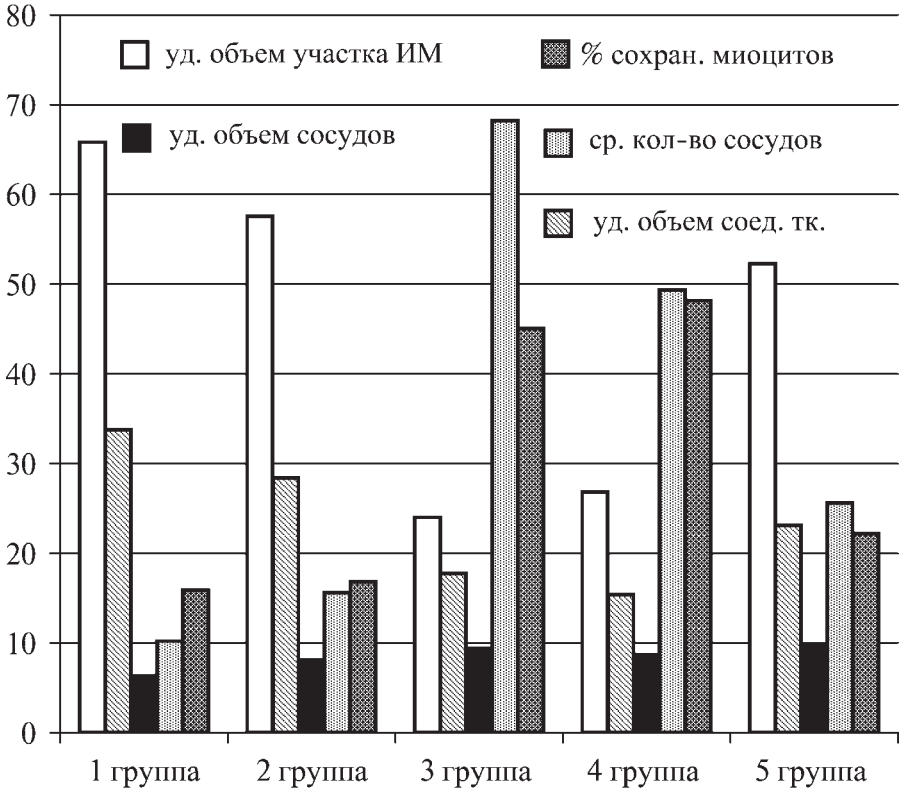


Рис. 8.26. Сводная таблица морфометрических показателей в 1 части исследования

Несмотря на то, что по сравнению с МСК, они менее дифференцированные, тем не менее мы не получили от применения их положительного результата. По сравнению с моделью ИМ, площадь инфаркта несколько уменьшилась, так же незначительно было меньше удельного объема соединительной ткани, хотя было

выше количество сосудов, что не отразилось на проценте сохранившихся мышечных волокон. Применение Г-КСФ, привело к уменьшению зоны инфаркта и удельного объема соединительнотканного компонента формирующегося рубца, значительно увеличилось среднее количество сосудов, что привело к незначительному увеличению процента сохранившихся мышечных волокон. Значительный положительный эффект трансплантации клеток был от МСК и кМСК, в обоих случаях отмечалось значительное уменьшение объема инфарцированного участка миокарда, удельного объема соединительнотканного компонента, значительно выросло среднее количество сосудов и % сохраненных миоцитов, по перечисленным параметрам нет достоверного различия между двумя видами. Однако среднее количество сосудов на 100 000 мкм^2, продемонстрировало значительное преимущество трансплантации МСК 68,2 против 49,35 ($p < 0,01$). Это возможно связано с преддиференцировкой МСК в кардиомиоцитарном направлении, что менее эффективно стимулирует неоангиогенез, по сравнению с некоммитированными МСК.

Исходя, из вышеизложенного, становится очевидным, что применение мезенхимальных стволовых клеток при остром инфаркте миокарда является перспективным направлением современной медицины. МСК костного мозга выступают в роли индукторов процессов регенерации при ремоделировании поврежденного миокарда, обеспечивая репаративный морфогенез и повышение адаптационных резервов сохранившегося миокарда. Роль МСК заключается не только в стимуляции ангиогенеза, т. к. в группе с введением Г-КСФ, последний присутствовал, однако значительных морфологических изменений по сравнению с группой ИМ без лечения не было. Таким образом, повышение эффективности репаративного морфогенеза миокарда способствует продукция МСК неспецифических и тканеспецифических регуляторных пептидов, действие которых направлено на оптимизацию функционирования сохранившегося жизнеспособного миокарда и на уменьшение объемов вторичного поражения миокарда. Прекультивированные стромальные фракции МСК костного мозга для индуцирования репаративной регенерации миокарда требует материальных и временных затрат, а также учитывая незначительное отличие пострансплантационного эффекта по сравнению с трансплантацией МСК, целесообразность коммитации сомнительна.

8.4. Морфометрические исследования инфаркта миокарда у животных после различных сроков введения трансплантата МСК

Во 2 части исследования перед нами стояла цель исследовать по времени введения от начала ИМ клеточных культуры, которая оказалась наиболее эффективная в 1 части экспериментального исследования, такой оказалась культура МСК. Срок изучения миокарда составлял 1 месяц после моделирования ИМ. В зависимости от временим введения, было сформировано 3 группы: 1 группа — трансплантат вводили в первые сутки ИМ; 2 группа через 7 суток и 3 группа — через 14 суток, более в отдаленные сроки трансплантат не вводили, т. к. к 21 дню формировался соединительнотканный рубец и эффективность его была бы явно незначительной, если вообще бы присутствовала.

Исходя из данных таблицы 8.5, мы видим, что чем более в дальний срок от начала ИМ, мы вводим трансплантат, тем больше площадь некроза миокарда. Так, при введении МСК на 7 сутки от начала ИМ удельный объем участка инфаркта составил 32,78 ± 2,16, что достоверно больше чем при введении в течении 1 суток ($t = 3,65$; $p < 0,001$), введение трансплантата через 14 суток сопровождалось увеличение удельного объема инфаркта до 50,6 ± 7,84, что достоверно больше 7 суток ($t = 3,36$; $p < 0,001$) и статистически не отличается от 1 группы. Интересен тот факт, что удельный объем соединительной ткани включая сосуды не отличался от времени введения трансплантата, так же как и удельный объем сосудов. Однако удельное количество сосудов на 100 000 мкм^2, на 7 сутки, значительно снижалось по сравнению с первыми сутками введения с 68,20 ± 4,64 до 56,82 ± 3,52 ($t = 1,96$; $p < 0,05$) и 14 сутками до 33,11 ± 2,97 ($t = 5,1$; $p < 0,001$). Несмотря на это даже на 14 сутки количество сосудов было гораздо больше, чем в 1 группе животных ($t = 7,48$; $p < 0,001$). Такая же тенденция наблюдалась и в показатели процента сохранившихся мышечных волокон. По сравнению с 1 сутками введения, через 7 суток их процент снижался с 45,04 ± 9,81 до 40,21 ± 3,81 ($t = 0,46$; $p > 0,05$), а к 14 суткам 26,51 ± 2,55 ($t = 4,13$; $p < 0,001$). Через 14 суток по

сравнению с 1 группой процент гораздо выше 26,51 ± 2,55 против 15,9 ± 0,28 ($t = 4,13$; $p < 0,001$).

Таблица 8.5

Сравнительный анализ трансплантации МСК в разные сроки после моделирования ИМ (через 1, 7, 14 дней после создания модели)

Средние по группам/ срокам введения	Без лечения	МСК (1-й день)	МСК (7-й день)	МСК (14 сутки)
Удельный объем участки инфаркта от исходной ткани, %	65,83	24,02 $p < 0,001$	32,78 $p < 0,001$	50,60 $p < 0,001$
SD	8,21	1,04	2,16	7,84
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды, %	33,78	17,73 $p < 0,01$	20,44	28,67
SD	1,72	5,69	6,71	5,71
Удельный объем сосудов, %	6,32	9,42 $p < 0,05$	7,97	7,23
SD	0,16	3,33	1,95	1,26
Удельное количество сосудов на 100000 мкм^2	10,21	68,20 $p < 0,001$	56,82 $p < 0,05$	33,11 $p < 0,001$
SD	1,26	4,64	3,52	2,97
% сохраненных мышечных волокон (от исходного)	15,9	45,04	40,21	26,51 $p < 0,01$
SD	0,28	9,81	3,81	2,55

Таким образом, основываясь на вышесказанном, мы видим, что чем раньше от начала ИМ мы вводим клеточный трансплантат, тем лучше морфометрические показатели. Так при введении трансплантат в более поздние сроки на 7 и 14 сутки ИМ, сопровождается значительным увеличением удельного объема инфарцированного участка миокарда, несмотря на то, что удельный объем соединительной ткани вместе с сосудами и удельный объем сосудов остается неизменным, значительно уменьшается количество сосудов на единицу измерения площади и % сохранившихся мышечных волокон. Причем если % сохранившихся мышечных волокон не отличается в сроки 1 и 7 сутки введения, то по сравнению с 14 значительно уменьшается.

Итак, мы видим, что независимо от сроков введения МКС при остром ИМ наблюдается положительная тенденция в виде сохранения нормально функционирующего миокарда, но эффект значительно ослабевает, чем дальше от начала заболевания мы вводим трансплантат. Поэтому наиболее перспективным является трансплантация МСК в 1 сутки от начала заболевания.

8.5. Морфометрические исследования инфаркта миокарда у животных после различных способов введения МСК

В 3 части исследования, мы изучили, какой из 3 путей введения трансплантата, является наиболее эффективным: внутривенный, интракоронарный или интрамиокардиальный?

При исследовании трех путей введения (табл. 8.6), мы предположили, что чем выше мы создадим концентрацию МСК в пораженном органе, тем лучше будет эффект. Тем не менее при трансплантации МСК интракоронарно отметилось значительное расширение объема инфаркта, по сравнению с внутривенным введением с 24,02 ± 1,04 до 52,18 ± 7,32 % при $t = 3,8$; $p < 0,001$, при интрамиокардиальном введении также отмечается значительное увеличение удельного объема инфаркта до 41,26 ± 2,87 % при $t = 5,65$; $p < 0,001$. В остальных показателях достоверной разницы не наблюдалось.

Таблица 8.6

Сравнительный анализ трансплантации МСК при разном пути введения

Средние по группам/срокам введения	Без лечения	МСК в/в	МСК в/ж	МСК и/м
Удельный объем участки инфаркта от исходной ткани	65,83	24,02	52,18 $p < 0,001$	41,26
SD	8,21	1,04	7,32	2,87
Удельный объем соединительной ткани, включая сосуды	33,78	17,73	19,38	21,72
SD	1,72	5,69	5,88	6,13
Удельный объем сосудов	6,32	9,42 $p < 0,05$	7,30	7,87

Продолжение таблицы 8.6

Средние по группам/срокам введения	Без лечения	МСК в/в	МСК в/ж	МСК и/м
SD	0,16	3,33	2,55	2,43
Удельное количество сосудов на 100000 мкм^2	10,21	68,20 $p < 0,001$	59,67 $p < 0,05$	60,12 $p < 0,05$
SD	1,26	4,64	3,64	4,14
% сохраненных мышечных волокон (от исходного)	15,90	45,04	41,73	42,88
SD	0,28	9,81	6,36	5,89

По нашим предположением, такой эффект связан с тем, что при интракоронарном введении МСК, которые обладают высокими адгезивными свойствами, происходит частичное тромбирование сосудов МЦР, что приводит к расширению зоны ишемии. Интрамиокардиальное введение сопровождается механическим повреждением миокарда инъекционной иглой, что усугубляет течение острого инфаркта миокарда.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рост заболеваемости ишемической болезнью сердца во всем мире свидетельствует о том, что эта патология становится опасной для всего человечества и может быть названной эпидемией. Распространенность инфаркта миокарда в среднем составляет 500 на 100 000 мужчин и 100 на 100 000 женщин. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения, глобальный урон человечества в связи с сердечно-сосудистой патологией, который в 2002 г. составлял 7,2 млн. человек, в 2020 г. может достичь 11,1 млн. и в 2030 г. — 24,2 млн. [1]. Инфаркт миокарда является одной из самых распространенных причин смертности и инвалидизации населения. Общая смертность при острых сердечных приступах в первый месяц достигает 50 %, и половина этих смертей приходится на первые 2 часа.

Пациенты, перенесшие острый коронарный синдром (ОКС), в том числе инфаркт миокарда (ИМ), имеют высокий риск развития повторных инфарктов, нарушений ритма, сердечной недостаточности, внезапной смерти. Известно, что внезапная кардиальная смерть (ВКС) в 75 % случаев является следствием ИБС, причем при аутопсии в большинстве этих случаев обнаруживается выраженный атеросклеротический процесс в коронарных артериях с многососудистым поражением [2]. Проведенные ранее исследования показали, что в 75–80 % случаев механизмом ВКС является фибрилляция желудочков (ФЖ), в 15–20 % — брадисистолические нарушения ритма, включая атриовентрикулярные блокады и асистолию [3, 4]. Несмотря на то, что жизнеугрожающие нарушения ритма развиваются чаще в первые 24–48 часов, риск смерти остается высоким в течение первого года после перенесенного ИМ [5].

По мнению проф. Сыркина А. Л. (1986 г.), инфаркт миокарда — заболевание, которое может закончиться полным выздоровлением без какой-либо медицинской помощи, и наоборот, привести к смерти больного, несмотря на все усилия врачей. Однако между этими крайностями находится многочисленная группа больных, судьба которых зависит от своевременного вмешательства врача, его знаний, опыта и возможностей.

Несмотря на то, что термин «инфаркт миокарда» впервые применил R. Marie в 1896 году, типичная картина ИМ стала благодаря работам петербургского врача В. М. Кернига (1892,1904гг.), а в 1909 году на первом съезде терапевтов В. П, Образцов и Н. Д. Стражеско первые в мире представили описание наиболее распространенных форм заболевания, до сих пор ряд вопросов касающихся диагностики и лечения, а также профилактики данной патологии остаются открытыми.

В современной патофизиологической теории возникновения риска развития и прогрессирования атеросклеротического повреждения коронарных артерий, которые приводят к возникновению ИБС с ее осложнениями, относят: молекулярно-генетические маркеры возникновения и прогрессирования атеросклероза [9, 10]; эндотелиальная дисфункция, которая проявляется воспалением, повышением тромбогенности, увеличением локальной экспрессии матриксных металлопротеиназ, что повышает уязвимость атеросклеротической бляшки, приводя к ее повреждению или разрыву, провоцируя образование внутрикоронарного тромба и, как следствие ишемии, приводит к клинической манифестации ОКС [11, 12]; иммуновоспалительные изменения прослеживаются с самых ранних стадий развития атеросклеротического поражения стенки сосуда до момента дестабилизации и повреждения атеросклеротической бляшки [14, 15]; неоваскулогенез, который с одной стороны способствует компенсации ишемии в органе, а с другой способствует прогрессированию атеросклеротических бляшек и является ключевым фактором, приводящим к дестабилизации и разрыву атеросклеротической бляшки [16].

Патофизиологические изменения при ИМ сопровождаются, в зависимости от площади поражения, более или менее значительным снижением сократительной функции миокарда в зоне некроза и повреждения. Это явление проявляется в виде гипокинезии, акинезии и дискинезии — парадоксальным выбуханием участка миокарда в момент систолы. В менее пораженных областях наблюдается диссинхрония — замедление процесса сокращения по сравнению с неповрежденным миокардом. В то же время функция последнего компенсаторно возрастает за счет механизма Старлинга и повышения катехоламинов в крови. Компенсаторная гиперкинезия обычно постепенно снижается в течении первых двух недель заболевания.

Если величина пораженного участка миокарда значительная, то насосная функция левого желудочка уменьшается, сердечный выброс, ударный объем, артериальное давление и другие показатели сократительной способности миокарда падают. В связи с чем степень увеличения конечно-диастолического давления в левом желудочке — один из наиболее существенных неблагоприятных прогностических признаков.

Основываясь на данных C. Rackley et al. (1971 г.), фракция выброса снижается, если нарушения сократимости захватывают более 10 % массы миокарда левого желудочка; при вовлечении в этот процесс свыше 15 % миокарда повышаются конечно-диастолическое давление и объем левого желудочка, а при поражении более 25 % миокарда появляются клинические признаки левожелудочковой недостаточности кровообращения. Если нарушениями сократительной функции охвачено свыше 40 % массы миокарда левого желудочка, развивается кардиогенный шок.

При формировании острой аневризмы сердца происходит дальнейшее ухудшение гемодинамики, за счет перемещения части крови во время систолы в «выбухающий» пораженный отдел левого желудочка, т. е. аневризму, приводит к парадоксальной пульсации. Если же зона некроза столь велика и не происходит уплотнение соединительной ткани в этой области, то формируется хроническая аневризма левого желудочка, дискинезия сохраняется и в дальнейшем.

В уменьшении зон акинезии и дискинезии определенную роль играет восстановление функции мышечной ткани, уцелевшей в области инфаркта миокарда. Если патологическая пульсация продолжает охватывать 20–25 % миокарда левого желудочка и более, у больного развивается хроническая недостаточность кровообращения.

Компенсаторная гиперфункция является важным фактором поддержания системного кровообращения на должном уровне. С другой стороны, в условиях распространенного коронарного атеросклероза повышенные требования к ишемизированному миокарду могут привести к дальнейшему увеличению зоны некроза и повреж-

дения сердечной мышцы, к образованию порочного круга. Возрастание потребности в кислороде сохранившихся отделов миокарда левого желудочка происходит и вследствие увеличения конечно-диастолического объема желудочка при развивающейся сердечной недостаточности. Дополнительным фактором может явиться и увеличение постнагрузки — системного артериального давления, что также приводит к увеличению работы левого желудочка.

С другой стороны, падение систолического выброса и артериального давления ухудшает перфузию миокарда с соответствующим расширением зон некроза, повреждения и ишемии и образованием еще одного порочного круга. Имеют значение также нарушения сердечного ритма и проводимости, ухудшающие гемодинамику, а также эктракардиальные факторы: хроническая легочная недостаточность, анемия и др.

Помимо прочего, для поддержания постоянного уровня артериального давления дилатированный левый желудочек должен выполнять большую работу, чем недилатированный. Неблагоприятные с точки зрения гемодинамики изменения левого желудочка, обусловленные растяжением сердца в области инфаркта миокарда, вследствие его истощения и снижения мышечного тонуса, начинаются уже в первые часы после возникновения инфаркта миокарда и продолжаются длительное время после завершения формирования постинфарктного рубца. Это процесс получил название ремоделирования сердца. Ремоделированию сердца может способствовать и дальнейшая гибель миокарда в перинфарктной зоне, а также выключение в этих участках из активного сокращения (так называемый гибернирующий миокард). Одновременно может гипертрофироваться интактный миокард.

Соответствие развития инфаркта миокарда и данными ЭКГ, морфологии:

1. Острейшая — развитие необратимой ишемии миокарда и начало формирования участка некроза. Продолжительность стадии от 30 мин. до 2 часов. На ЭКГ наблюдается элевация сегмента ST, соответствующая зоне поражения, и депрессия сегмента ST в контрлатеральных отведениях.

2. Острая — окончательное формирование некротического участка, развитие процесса миомаляция. У части больных — расширение зоны некроза. Продолжительность стадии до 7–10 суток. На ЭКГ регистрируются появление патологических зубцов Q, QS, регресс зубца R, постепенное уменьшение элевации и дискордантной депрессии сегмента ST, формирование двухфазного зубца Т.

3. Подострая — замещение участков некроза богатой сосудами соединительной тканью с большим содержанием коллагена. Процесс продолжается 4–6 недель. На ЭКГ сегмент ST возвращается к изоэлектрической линии, в зоне инфаркта миокарда зубцы Т становятся отрицательными.

4. Хроническая (постинфарктная, рубцовая) консолидация и уплотнение рубцового поля продолжаются до полугода. На ЭКГ динамика может отсутствовать.

В последние десятилетия отмечается значительное увеличение числа новых лабораторных технологий, использующихся для выявления факторов риска ИБС, диагностики ее острых форм, а также определения прогноза заболевания с учетом развития таких неблагоприятных исходов, как повторные ИМ, нарушения ритма сердца, сердечная недостаточность, ВКС [5]. Существующие международные и российские рекомендации и руководства, разработанные рабочими группами экспертов европейского общества кардиологов (ЕОК), всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК), по диагностике и лечению различных сердечно-сосудистых заболеваний включают стандартные подходы к проведению лабораторных исследований с указанием класса и уровня доказательности [6, 7, 8].

Стандартные методы лечения, в том числе медикаментозные (бета-адреноблокаторы, ингибиторы АПФ, статины, антагонисты кальциевых каналов, нитраты), эндоваскулярные и хирургические методы реваскуляризации, имеют известные ограничения. К сожалению, лекарственная терапия во многих случаях оказывается недостаточно эффективной. Не уменьшается доля пациентов с резидуальной симптоматикой, возобновлением и прогрессированием клинических проявлений болезни в разные сроки после проведения эндоваскулярных и хирургических вмешательств. Значительной части больных ИБС процедуры реваскуляризации — чрезкожные внутрикоронарные вмешательства или операции аортокоронарного шунтирования (АКШ) в различной модификации — не позволяют выполнить анатомия коронарного русла, многочисленные предше-

ствующие попытки реваскуляризации или наличие сопутствующих патологических состояний. Злободневной проблемой становится лечение рефрактерной стенокардии и СН.

В этой ситуации крайнюю важность приобретают разработка и внедрение в широкую практику современных немедикаментозных методов лечения, которые существенно отличаются по клинической эффективности, степени безопасности, лечебной и экономической целесообразности и доступности. Известные лечебные технологии: симпатэктомия, эпидуральная спинномозговая электростимуляция, прерывистая урокиназотерапия, трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация — не получили широкого распространения, вопрос о возможностях генной и клеточной терапии остается открытым.

Таким образом, концепция регенеративной медицины, базируется на использовании собственных стволовых клеток для восстановления поврежденных клеток, тканей, сосудов и органов в целом, в последние годы привлекает внимание большого количества патофизиологов, кардиологов и кардиохирургов. Последнее время появились работы посвященные вопросу об использовании генетически модифицированных клеток, т. е. своеобразный альянс генной и клеточной терапии.

В 2006 году в ряде европейских стран были проведены клинические исследования влияния интракоронарного введения аутогенных мононуклеарных клеток костного мозга больным с ишемической болезнью сердца [16–18]. Результаты этих исследований продемонстрировало отсутствие увеличения фракции выброса сердца у всех испытуемых на 5 %, в связи с чем ряд авторов высказались за мораторий на дальнейшее клинические испытания [16–19] до тех пор пока не будут даны ответы на следующие вопросы: Какой тип клеток вызывает регенеративный эффект в миокарде? Каков оптимальный способ введения клеток? Каковы механизмы действия трансплантированных клеток? [20].

Нами в исследовании проводилось исследование в нескольких направлениях: во-первых мы исследовали эффективность применения нескольких видов клеточного материала (эмбриональные, мезенхимальные, комитированые мезенхимальные стволовые клетки), а также Г-КСФ; во-вторых нами изучены временные факторы введения клеточного трансплантата в различные сроки после моделирования острого инфаркта миокарда у крыс; в-третьих использовали различные способы введения клеточного трансплантата (системный, т. е. внутривенный, интрамиокардиальный, интракоронарный); в-четвертых мы провели клиническую апробацию использования аутологичных мезенхимальных стволовых клеток у больных с рефрактерной стенокардией и ишемической кардиомиопатией при различных методах введения и сравнили эффективность данной методики с результатами пустых инъекций, для плацебо-контроля.

Исследование различных моделей ишемии миокарда имеют важное значение для изучения патобиологических и патофизиологических процессов при инфаркте миокарда и для разработки, а также оптимизации будущего лечения.

Существуют различные методы моделирования ИМ у крыс: применение цитотоксической сывороток, использование различных фармакологических препаратов (адреналин, изопротеренол и др.), физическое повреждение (электрокоагуляция, криодеструкция и др.), ген-модифицированные животные (с высоким риском развития ИМ), а также лигирование коронарной артерии. Предварительно мы провели сравнение двух методов моделирования инфаркта миокарда у крыс: электродеструкция током высокой частоты и лигирование передней межжелудочковой артерии.

Для нашей работы была необходима модель с четкой локализацией и по возможности равной площадью поражения миокарда. Модель электродеструкции миокарда не подошла по ряду причин: непосредственное воздействие тока приводило к нарушению ритма сердца, зачастую приводящего к летальному исходу; при одинаковых параметрах воздействия тока получали абсолютные разные по глубине и площади участки повреждения; в очаг коагуляции попадали капилляры пограничной зоны. Данные проблемы ряд исследователей получили и при криоповреждении миокарда. Методика технически сложна, т. к. надо быстро и точно нанести криоудар, что практически невозможно. Используя этот метод исследователь не может гарантировать, что криошрам, приводит к ишемии, а также огромные повреждения миокарда, которое приводит к патофизиологическим побочным эффектам, которые не связаны с инфарктом

миокарда. Поэтому необходимым условиям эксперимента отвечала модель ИМ путем лигирование коронарной артерии.

Метод лигирования заключается в перевязке левой передней нисходящей артерии (LAD). ЛАД лигируют с помощью одного стежка, образуя ишемию, которую можно увидеть практически сразу. При закрытии LAD, не поступает кровоток в зависимой области, в то время как окружающие ткани миокарда почти не влияет. Это хирургическая процедура, имитирует патобиологические и патофизиологические аспекты происходящие в инфаркт-связанном миокарде у человека.

Экспериментальное исследование выполняли на инбредной линии Вистар-Кайото. Это было связано с тем, что мы выполняли аллогенную трансплантацию клеток, а инбредные животные характеризуются высокой степенью гомозиготности по большинству генов, что в определенной степени нивелировало отторжение клеточного трансплантата и приближало до условий аутотрансплантации, как наиболее перспективного метода в клинической практике. Помимо прочего моделирование ИМ мы выполняли на самках, а использовали культуру МСК самцов, чтобы в дальнейшем по Y-хромосоме верифицировать трансплантируемые клетки в организме реципиента.

Исследовательская работа состоит из 2-х частей: в первой части мы провели исследование эффективности различных способов и методов клеточной кардиомиопластики на модели острого ИМ у крыс; во второй части мы проводили клиническую эффективность аутотрансплантации МСК у пациентов с стенокардией 2–4 ФК.

Согласно поставленным цели и задачам исследования, наш эксперимент состоял из 3-х частей. В 1-й части исследования мы проводили сравнительный анализ различных видов клеточной кардиомиопластики, в частности внутривенное введение эмбриональных клеток, мезенхимальных стволовых, комитированых мезенхимальных стволовых и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, как представителя цитокиновой терапии. Следует подчеркнуть, что в опыт мы брали животных, которые перенесли сам процесс моделирования ИМ, т. к. смертность при данной методике составила 15 %, что на 20 % меньше чем подобная методика Selye H. Наша методика моделирования ИМ заключалась в

наложении трахеостомы, через которую проводили адекватную вентиляцию легких, далее выполняли торакотомию, не боясь возникновения двустороннего пнемоторакса, т. к. это не опасно при выполнении искусственной вентиляции легких. Затем выполняли перикардотомию, прошивали и лигировали переднюю межжелудочковую артерию, ушивали грудную клетку, шприцом эвакуировали остатки воздуха в плевральных полостях, после чего вынимали интубационный катетер из трахеи и дефект в ней ушивали узловыми швами. При правильно выполненной методике, у животных адекватно сразу восстанавливается самостоятельное дыхание. Далее по морфофункциональной оценки выбирали самый эффективный способ (в нашем исследовании это трансплантация МСК) и приступали ко 2-й части исследования. Во 2-й части исследования мы изучали наиболее эффективный способ доставки трансплантата: внутривенный, интракоронарный или интрамиокардиальный. Все варианты доставки были выполнены в течении 1 суток после моделирования ИМ. Следует отметить, что интраокронарный способ введения у крыс технически выполнить в наших условиях не представлялось возможным, поэтому под рентгенконтролем мы вводили катетер через бедренную артерию и проводили его в левый желудочек и вводили трансплантат. Таким образом получали максимальную концентрацию клеток трансплантата в области коронарных сосудов. Далее в 3-й части исследования, мы изучали, в какие именно сроки после возникновения ИМ наиболее правильно выполнять трансплантацию: 1, 7 или 14 сутки.

В дальнейшем по данным биохимических исследований мы изучали динамику маркеров повреждения миокарда, лактатного обмена, ПОЛ, вазодилататоров и вазоконстрикторов, эндотелиального фактора роста сосудов. С помощью инструментальных методов исследования изучали сократительную функцию сердца как с помощью инвазивных методик так и с помощью УЗИ. Проводили ЭКГ мониторирование крыс в покое и при проведении стресснагрузок. При выводе животных из эксперимента проводили макрометрическую и микроскопическую оценку сердец.

Один из главных ресурсов клеток для лечения сердечно-сосудистых заболеваний — эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), которые могут быть направленно дифференцированы в клетки-

предшественники кардиомиоцитов и в зрелые кардиомиоциты. Однако пока еще не выяснено, какой именно тип клеток или стадия их дифференцировки лучше всего подходят для использования в терапевтических целях. Решение этого вопроса осложняется отсутствием методов, позволяющих оценить множество параметров, влияющих на эффективность клеточной трансплантации.

Поэтому первой экспериментальному исследованию подлежала культура эмбриональных стволовых клеток, которые мы получали из 5 эмбрионов крыс. Второй, по применению, мы использовали культуру мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга трубчатых костей самцов крыс. Третья культура была представлена комитированными МСК, комитацию мы вызывали применением 5-азацитидином. Таким образом, схема клеточной терапии выглядела следующим образом: забор клеток у самцов, выделение клеток, культивирование их, экспансия (увеличение биомассы и/или направленная дифференцировка) и трансплантация в организм реципиента. Четвертая группа была представлена Г-КСФ, который является биологическим стимулятором выработки собственных стволовых клеток костным мозгом животного. Группой контроля служили животные с моделью ИМ, не получающие какое-либо лечение.

Перед тем, как мы вводили трансплантат МСК, мы должны были выяснить, что за клетки мы получили в результате культивирования. Первым этапом было определение жизнеспособности полученной клеточной суспензии, что достигалось путем применения 0,5 % раствора трипанового синего и через 5 минут суспензию тщательно пипетиризировали и заполняли камеру Горяева и подсчитывали количество окрашенных и неокрашенных клеток. При повреждении цитоплазмы, т. е. мертвой клетке краситель проникал внутрь. Затем мы должны были доказать, что клетки способны делиться и не находятся в состоянии гибернации. Для этого мы использовали окраску РСН, специфического красителя для делящейся клетки. Следующий вопрос, стоящий перед нами был в идентификации МСК. По данным Jiang Y. et al. «Nature» (2002) для идентификации крысиных МСК достаточно, чтобы выполнялись требования: негативно — CD 45, CD 34, c-kit (CD117) и позитивно — CD 90, SSEA-1, Thy-1. При подтверждении того, что у нас

культура именно МСК мы приступали к масштабированию культуры, т. е. увеличение числа клеток. Затем в количестве 1млн. клеток на одно животное выполняли трансплантацию той или иной методикой. Когда мы производили комитирование клеточной культуры МСК 5-азацитидином, мы должны были убедиться, что получаем культуру дифференцировки в кардиомиоцитарном направлении, поэтому при долгом культивировании мы получили спонтанно сокращающиеся клетки, что подтверждало правильность выполнения методики.

В различные сроки эксперимента мы проводили динамическое УЗИ сердец крыс при котором обнаруживали: наличие систолического утолщения пораженного сегмента миокарда при ИМ в систолу либо снижено, либо вообще отсутствует. В сроки от 1 месяца отмечается истончение пораженного сегмента миокарда. Истонченный сегмент обладает повышенной эхогенностью по сравнению с прилегающими сегментами вследствие большего количества соединительной ткани. Визуализируется нарушение подвижности стенки: гипокинезия, акинезия или дискинезия, т. е. движение пораженного сегмента в систолу внутрь частично снижено, отсутствует или парадоксально направлено наружу. Сегменты стенки противоположной пораженной при остром инфаркте миокарда, как правило, компенсаторно гиперкинетичны. У ряда животных с ИМ визуализировали аневризмы левого желудочка, в виде выпячивания «молчащей» стенки. Также происходит значительное угнетение функции левого желудочка в виде уменьшения сердечного выброса, ударного и минутного объема. Причем имеется положительная корреляционная связь между ударным объемом и фракцией укорочения левого желудочка. По данным УЗИ определяли дилатация полостей сердца, заключающаяся в увеличении конечного диастолического и у увеличении конечного систолического внутреннего диаметра левого желудочка, что свидетельствовало о патофизиологических сдвигах, протекающих при постинфарктном ремоделировании сердца. По данным УЗИ наиболее близкий к нормальным показателям была группа животных с внутривенным введением культуры МСК.

При проведении макроморфометричсекого исследования мы получили следующие данные — через месяц после применения различных способов кардиомиопластики, масса сердца в группе жи-

вотных с трансплантируемыми МСК не отличалась от нормы и не существовало различия в группах животных с внутривенным введением ЭСК и подкожным Г-КСФ. При изучении массы левого желудочка, наблюдалось сохранение данного показателя в группе с трансплантируемыми МСК. Наиболее близкий показатель к норме является в группе с трансплантируемыми коммитируемыми МСК, а в группах с трансплантацией ЭСК, введения Г-КСФ и у животных с ИМ без какого-либо лечения разницы в массе левого желудочка нет. Интересен факт, что при изучении интегрального показателя отношения массы левого желудочка к массе тела животного, мы видим подобную картину, в группе с трансплантацией МСК и нормой, наиболее близким показателем к норме является группа с трансплантацией кМСК, причем в группах ИМ без лечения, трансплантации ЭСК, подкожного введения Г-КСФ разницы не было ($p > 0,05$). Интересен тот факт, что при изучении интегрального показателя отношения массы сердца к массе тела животного разницы между группами не было, это можно объяснить тем, что уменьшение массы левого желудочка происходит за счет замены нормального миокарда рубцовой тканью и его растяжению, что приводит к снижению насосной функции сердца. Далее процесс ремоделирования приводит к митральной регургитации крови и увеличению объема левого предсердия, а это в свою очередь к увеличению давления в малом круге кровообращения. Данный патофизиологический процесс сопровождается гипертрофией правых отделов сердца, за счет чего HW/BW остается неизменным.

Таким образом, данные макроморфометрии подтвердили результаты УЗИ, что при инфарктном ремоделировании происходит дилатация полостей сердца, причем сначала левых отделов, а затем правых, что приводило к декомпенсации сердечной недостаточности и смерти животных.

Если гипертрофия ЛЖ связана с возросшей механической нагрузкой на сохранившийся миокард, то гипертрофия правого желудочка обусловлена легочной гипертензией, характерной для сердечной недостаточности. Установлено, что при инфаркте миокарда, помимо других систем, происходит активация системы эндотелина-1 (Sauvageau S. et al., 2006). Причем, источником эндотелина-1 (ЭТ-1) является легочная сосудистая система, в которой обнаружено увеличение экспрессии фермента (Tonnessen T. et al., 1998; Sakai S. et al., 1996) и активация ЭТ-превращающего энзима (Lueder T. G. et al., 2004).

С первых часов моделирования ИМ мы проводили ЭКГ мониторирование, которое демонстрировало, все признаки ИМ в патофизиологическом развитии: через 30 минут после перевязки левой коронарной артерии регистрировали элевацию сегмента ST — кривая Парди, что свидетельствовало о повреждении миокарда при острейшей стадии ОИМ. В течение первых 2-х часов формировался патологический зубец Q, который свидетельствовал о наличии некроза миокарда при острой стадии ИМ. Через 10–14 дней формировался отрицательный зубец Т, а сохраняющаяся элевация сегмента ST свидетельствовала о формировании острой аневризмы. Через 1 месяц после моделирования ОИМ на ЭКГ регистрировали увеличение амплитуды отрицательного зубца Т и «расширение» зубца Q, отражающие стадию рубцевания. Следует отметить, что через сутки после моделирования ИМ у крыс наблюдали брадикардию, формирование зубца q и сохранение элевации сегмента ST, что свидетельствовало о наличии некроза при распространенном трансмуральном инфаркте миокарда. В дальнейшем при ЭКГ мониторировании отмечали различные нарушения ритма в виде: желудочковых монотопных экстрасистолий, желудочковых и наджелудочковых экстрасистолий с последующим развитием АВ-блокад типа Мобиц 1.

Интересен факт об аритмогенности культуры ЭСК. В литературе встречаются абсолютно противоположные мнения, хотя большинство придерживается точки аритмогенности культуры. В наших исследованиях у крыс с трансплантацией ЭСК у ряда животных мы получили пароксизм неустойчивой желудочковой тахикардии, сочетание желудочковых и наджелудочковых экстрасистол, пароксизм наджелудочковой экстрасистолы, что не наблюдали в группах с трансплантацией других культур. В группе с введением Г-КСФ почти у всех животных отмечали пароксизм фибрилляций предсердий. При изучении хронотропной функции сердца в покое и при применении стресс-нагрузки изопропилнорадреналином, мы продемонстрировали, что наиболее быстрое восстановление реакции сердца на стресс проявлявшееся в нормализации как хронотропного ответа на введение изопропилнорадреналина, так и времени стабилизации была в группе с трансплантацией МСК.

При морфологическом исследовании мы установили 4 наиболее популярных вариантов клеточной кардиомиопластики, а именно трансплантацию фетальных СК, мезенхимальных СК, коммитированных МСК, а также введение грануляцитарного колониестимулирующего фактора. Исходя из диаграммы, мы видим, что наихудшие результаты мы получили при трансплантации ФСК и введении Г-КСФ. Неожиданный результат от ФСК, был видимо из-за отсутствия целенаправленного действия клеток, т. е. отсутствием или слабовыраженного хоуминг-эффекта. Несмотря на то, что по сравнению с МСК, они менее дифференцированные, тем не менее мы не получили от применения их положительного результата. По сравнению с моделью ИМ, площадь инфаркта несколько уменьшилась, так же незначительно было меньше удельного объема соединительной ткани, хотя было выше количество сосудов, что не отразилось на проценте сохранившихся мышечных волокон. Применение Г-КСФ привело к уменьшению зоны инфаркта и удельного объема соединительнотканного компонента формирующегося рубца. Значительно увеличилось среднее количество сосудов, что привело к незначительному увеличению процента сохранившихся мышечных волокон. Значительный положительный эффект трансплантации клеток был от МСК и кМСК, в обоих случаях отмечалось значительное уменьшение объема инфарцированного участка миокарда, удельного объема соединительнотканного компонента, значительно выросло среднее количество сосудов и % сохраненных миоцитов, по перечисленным параметрам нет достоверного различия между двумя видами. Однако среднее количество сосудов на 100 000 мкм^2, продемонстрировало значительное преимущество трансплантации МСК 68,2 против 49,35 ($p < 0,01$). Это возможно связано с преддиференцировкой МСК в кардиомиоцитарном направлении, что менее эффективно стимулирует неоангиогенез, по сравнению с некоммитированными МСК.

Исходя, из вышеизложенного, становится очевидным, что применение мезенхимальных стволовых клеток при остром инфаркте миокарда является перспективным направлением современной медицины. МСК костного мозга выступают в роли индукторов процессов регенерации при ремоделировании поврежденного миокарда, обеспечивая репаративный морфогенез и повышение

адаптационных резервов сохранившегося миокарда. Роль МСК заключается не только в стимуляции ангиогенеза, т. к. в группе с введением Г-КСФ, последний присутствовал, однако значительных морфологических изменений по сравнению с группой ИМ без лечения не было. Таким образом, повышение эффективности репаративного морфогенеза миокарда способствует продукция МСК неспецифических и тканеспецифических регуляторных пептидов, действие которых направлено на оптимизацию функционирования сохранившегося жизнеспособного миокарда и на уменьшение объемов вторичного поражения миокарда. Прекультивированные стромальные фракции МСК костного мозга для индуцирования репаративной регенерации миокарда требует материальных и временных затрат, а также учитывая незначительное отличие постранспланатационного эффекта по сравнению с трансплантацией МСК, целесообразность комитации сомнительна.

Итак, по всем вышеперечисленным параметрам, наибольшее преимущество имела методика внутривенного введения МСК. В дальнейшем мы изучили наиболее приемлемые сроки и путь введения трансплантата.

Независимо от сроков введения МКС при остром ИМ наблюдается положительная тенденция в виде сохранения нормально функционирующего миокарда, но эффект значительно ослабевает, чем дальше от начала заболевания мы вводим трансплантат. Поэтому наиболее перспективным является трансплантация МСК в 1 сутки от начала заболевания.

Далее мы изучили ряд биохимических показателей у животных 2-х групп: с моделью ИМ и животные, которым выполнена в 1 сутки внутривенная трансплантация МСК.

При образовании обширного инфаркта миокарда, происходит разрушение мембран кардиомиоцитов и активация ПОЛ, что отражается в повышении ТБК-активных продуктов. Мы исследовали первичные и вторичные продукты ПОЛ в цитоплазме и митохондрии кардиомиоцитов и продемонстрировали высокую интенсификацию кардиомиоцитарного ПОЛ в группе с ИМ и минимально выраженную в группе с трансплантацией МСК. Таким образом, трансплантация МСК значительно снижает концентрацию ТБК-активных продуктов. При изучении антиоксидантной системы, мы видим, что при

ИМ значительно повышается гаптоглобин, хотя в группе с трансплантацией МСК менее выраженное, возможно с уменьшением альтерации миокарда, вызванной ишемией. Тем не менее значительное повышение церулоплазмина в группе ИМ+трансплантация МСК свидетельствует о стимуляции трансплантированными МСК факторов естественной антиоксидантной системы.

С метаболическими нарушениями связано развитие острой сердечной недостаточности при ишемии и инфаркте миокарда. При частичном или полном прекращении доступа кислорода в клетке уменьшается или полностью прекращается окисление и активируется анаэробный гликолиз и гликогенолиз с образованием лактата. Однако эти процессы не обеспечивают производства энергии в количестве, необходимом для сокращения (Фетисова И. О.). Закисление внутриклеточной среды в результате накопления лактата является одним из факторов, усугубляющих развитие ишемического повреждения. В последующем происходит постепенное уменьшение содержания АТФ, временное увеличение количества АДФ и АМФ и затем расщепление адениловых нуклеотидов до инозина и гипоксантина. Одновременно повреждение начинает приобретать необратимый характер, что связано с деструктивными изменениями в сарколеммной мембране, увеличение проницаемости которой приводит к нарушению баланса в клетках и их перегрузке кальцием. Нарушение сарколеммной мембраны сопровождается выбросом в кровоток компонентов цитоплазмы, в том числе цитоплазматических ферментов, на чём основана энзимодиагностика инфаркта миокарда. Полное исчезновение пула адениловых нуклеотидов в миофибриллах приводит к развитию контрактуры и к разрушению миофибрилл (Капелько С. Е., 1999; Большая медицинская энциклопедия, 1978). Поэтому нами было изучено изменение концентрации АСТ, МВ-КК и ЛДГ и мы получили следующие данные. При обширном ИМ происходит повышение МВ-КК и АСТ, но по чувствительности относительно размеров МВ-КК является более прогностическим, чем АСТ, которая просто подтверждает наличие ИМ. Кардиомиопластика МСК вызывает положительный метаболический эффект в виде повышения активности ЛДГ и АДА при ИМ, что косвенно свидетельствует о повышении уровня энергообразующих фосфатов в клетке.

Далее мы изучили концентрацию вазодилятатора — оксида азота и вазоконстриктора — эндотелин-1, а также уровень эндотелиального фактора роста сосудов. Установили, что в сроки от 1 часа до 7 суток идет значительное увеличение концентрации оксида азота в сыворотки крови животных с ИМ по сравнению с нормой. Причем повышенное содержание оксида азота наблюдали до 6 месяцев. Такая же тенденция наблюдается и при изучении содержания VEGF. Интересен факт, что его концентрация в сыворотке крови значительно повысилась у животных с трансплантацией МСК по сравнению с 1 до 7 суток и оставалась выше до конца опыта. Противоположная картина наблюдалась при изучении содержания антагониста предыдущих биологически активных веществ — эндотелина-1. Концентрация последнего возрастала до 6 часов после моделирования ИМ с последующей трансплантацией МСК и затем постепенно снижалась и нормализовалась к 1 месяцу. При ИМ без лечения наблюдается его значительное повышенное содержание до конца 1 суток после ИМ и значительно выше до конца опыта. Таким образом, мы видим, что трансплантация МСК приводит к повышенной выработки эндотелиального фактора роста сосудов, что в свою очередь приводит к значительной стимуляции ангиогенеза, подтвержденная морфометрическими исследованиями в виде увеличения количества молодых сосудов на единицу площади миокарда, уменьшения площади инфаркта и сохранения мышечных волокон. Параллельно с этим происходит длительная и интенсивная выработка оксида азота, угнетении образования эндотелина 1, что в свою очередь вызывает вазодилатацию и приводит к улучшению кровоснабжения миокарда.

К тому же помимо вазоконтрукции, существуют экспериментальные работы, посвященные изучению связи эндотелиальной дисфункции с развитием желудочковых аритмий. Прежде всего, рассматривается гипотеза о аритмогенном эффекте эндотелина-1 (ЭТ-1), имеющего выраженные вазоконстрикторные свойства. Возможно, аритмогенное действие ЭТ-1 основано на удлинении или увеличении дисперсии монофазной части потенциала действия, удлинении интервала QT, развитии ранних постдеполяризаций, ацидоза и усилении клеточного повреждения [13].

Трансплантация МКС при экспериментальном ИМ у крыс приводит к уменьшению зоны ИМ в 3 раза. При этом соединительнотканный компонент зоны инфаркта уменьшился в 1,9 раза за счет увеличения количества сосудов в 6 раз и сохранения мышечных волокон в 2,6 раза больше, чем у животных с ИМ без лечения.

Исходя из вышеперечисленного, мы видим, что несмотря на большой арсенал клеточных культур и цитокинов, вопрос об безопасности и эффективности применения всех видов клеточной кардиомиопластики остается открытым. В наших исследованиях мы продемонстрировали основные патофизиологические механизмы развития инфаркта миокарда у крыс, изменения как в сократительной и хронотропной фнукции, так и нарушения в системе ПОЛ, ангиогенеза. Трансплантация культуры ЭСК при ИМ у крыс привела к ряду негативных реакций в виде жизнеугрожающих аритмий, отсутствия четких критериев эффективности в виде улучшения сократительной и хронотропной функции сердца, а также образование костно-хрящевых структур в сердце реципиента после пересадки. Наши данные совпадают с результатами мировой литературы, что позволяет рекомендовать воздержаться от применения данного вида клеточной кардиомиопластики в клинике. Применение Г-КСФ, на которого многие исследователи возложили надежду, не принесло в нашем эксперименте ожидаемых результатов. Несмотря на то, что применение Г-КСФ в клинике элементарно (простая инъекций), и должно было привести к улучшению морфофункционального состояния сердца после инфаркта за счет стимуляции собственного пула стволовых клеток организма, не вызвало положительных сдвигов в изучаемых показателях на фоне ИМ. Комитированые МСК клетки и МСК оказались самыми эффективными в нашем эксперименте, но к сожалению первые во многом проигрывают простым МСК и необходимо еще учитывать более дорогостоящее их изготовление.

ВЫВОДЫ

В монографии приведено теоретическое обобщение результатов и достигнуто новое решение актуальной научной проблемы — на основании инструментального, лабораторного и морфологического исследования доказано, что использование внутривенной

трансплантации мезенхимальных стволовых клеток изогенных доноров за счет стимуляции неоваскулогенеза, паракринного эффекта, снижения ПОЛ, уменьшения площади рубца, повышения фракции выброса и формирования устойчивости к стресс-нагрузке в эксперименте улучшает сократительную способность сердца при остром инфаркте миокарда, открывает определенные патофизиологические механизмы развития ремоделирования сердца в посттрансплантационном периоде, обоснована целесообразность применения клеточной кардиомиопластики в клинической практике, что способствует повышению эффективности лечебных мероприятий.

1. Разработана экспериментальная модель инфаркта миокарда у крыс сопровождающаяся изменениями на элекрокардиограмме, снижением сократительной способности миокарда, неадекватностью хронотропной функции, повышением МВ-КК, ПОЛ, эндотелина-1 и приводящая к 15 % летальности экспериментальных животных.

2. При сравнительном анализе эффективности применения трансплантации эмбриональных, мезенхимальных и комитированых мезенхимальных стволовых клеток, а также подкожного введения Г-КСФ, на основании инструментальных, лабораторных и морфологических данных, доказано преимущество применения при клеточной кардиомиопластике мезенхимальных стволовых клеток.

3. Доказано, что наилучшие морфофункциональные показатели сердца достигаются при максимально раннем введении клеточного трансплантата по сравнению с более поздними сроками (3-и, 7-е сутки) постинфарктного ремоделирования сердца.

4. Наилучший способ доставки клеточного трансплантата в эксперименте является внутривенный метод введения по сравнению с интракоронарным и интрамиокардиальным.

5. Доказан эффект хоуминга трансплантируемых мезенхимальных стволовых клеток изогенного донора при внутривенном введении в зону ишемии миокарда, показано их участие в формировании сосудов и рубцовой ткани, однако трансформацию МСК в кардиомиоциты не обнаружили.

6. По данным морфометрического анализа, предварительная инкубация МСК в кардиомиоцитарном направлении не приводит

к улучшению васкуляризации зоны рубца и лучшего обеспечения миокарда по сравнению с применением МСК.

7. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток приводит к увеличению среднего количества сосудов на 100 000 мкм^2 с 10,21 до 68,2; эффект ангиогенеза подтвержден повышением концентрации VEGF к концу первых суток с 66,98 ± 12,47 до 220,45 ± 22,13 пг/мл.

8. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс приводит к снижению процента рубцующегося участка занятого соединительной тканью с 34 до 18 %, сохранение мышечных волокон — 45,04 % против 15,9 % без лечения.

9. Эффект клеточной кардиомиопластики мезенхимальными стволовыми клетками обусловлен сохранением фракции выброса и укорочения левого желудочка, адаптации сердца к стресс-иммитирующим нагрузкам, стабилизацией ПОЛ и энергообеспечения кардиомиоцитов, нормализацией показателей эндотелина-1 и повышением продукции оксида азота, что приводит к стабилизации морфофункциональных качеств миокарда.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абсеитова С. Р. Опыт лечения кардиологической ударно-волновой терапией больных ишемической болезнью сердца / С. Р. Абсеитова // Медицина Казахстана. — 2005. — № 7. — С. 23–32.
2. Абсеитова С. Р. Возможности эсктракорпоральной кардиологической ударно-волновой терапии в лечении пациентов с возвратной стенокардией после реваскуляризации миокарда / С. Р. Абсеитова, А. Б. Балабаева // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — Т. 7, № 6, приложение № 1. — С. 14–15.
3. Анализ влияния фактора времени на сократимость миокарда при экстренной реваскуляризации миокарда методом ЧТКА / А. Н. Федорченко, Р. С. Тупикина, К. О. Лясковский [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — Т. 7, № 6, приложение № 1. — С. 380–381.
4. Ангиоматоз и эктопическая оссификация в миокарде собак после интрамиокардиальной имплантации клеток мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга при моделировании ишемической болезни сердца / П. М. Ларионов, Д. С. Сергеевичев, А. М. Чернявский [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2009. — Т. 147, № 5. — С. 576–582.
5. Аутологичные культивированные костно-мозговые стволовые клетки в хирургическом лечении хронической сердечной недостаточности / Т. М. Рахмат-Заде, Е. А. Скридлевская, А. Г. Конопляников [и др.] // Бюлл. НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. — 2007. — Т. 8, № 6. — С. 297.
6. Ахмедов Ш. Д. Клинико-экспериментальное клеточные технологии в гибридных операциях лечения хронической сердечной недостаточности / Ш. Д. Ахмедов, В. Е. Бабокин, М. Л. Дьякова [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова : тезисы докладов. — М., 2008. — С. 226–227.

7. Безопасность и эффективность применения усиленной наружной контрпульсации при остром рецидивирующем инфаркте миокарда / В. В. Рябов, Э. О. Оюнаров, В. А. Марков, Р. С. Карпов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — Т. 7, № 6, приложение № 1. — С. 321.
8. Беленков Ю. Н. Клеточная терапия в лечении хронической сердечной недостаточности: виды применяемых стволовых клеток, результаты последних клинических исследований / Ю. Н. Беленков, Е. В. Привалов, И. С. Чекнева // Kardiol serdečno-sosud hir. — 2008. — № 5. — С. 4–18.
9. Беленков Ю. Н. Хроническая сердечная недостаточность / Ю. Н. Беленков, В. Ю. Мареев, Ф. Т. Агеев. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 145 с.
10. Беришвили И. И. Результаты изолированной трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации у больных, предварительно планирующихся на аорто-коронарное шунтирование / И. И. Беришвили, Ю. В. Игнатьевна, П. В. Гусев // Сердечно-сосудистые заболевания. — 2009. — Т. 10, № 6. — С. 66.
11. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / Е. Б. Владимирская, О. А. Майоров, С. А. Румянцев, А. Г. Румянцев. — Москва : Медпрактика, 2005. — 392 с.
12. Бокерия Л. А. Результаты трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации (ТМЛР) в сочетании с трансплантацией аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у повторных больных / Л. А. Бокерия, И. И. Беришвили, М. Н. Вахромеева [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова. — тезисы докладов. — М., 2008. — С. 39–40.
13. Бокерия Л. А. Современные состояния проблемы клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Литературный обзор в 3 частях / Л. А. Бокерия, З. Б. Махалдиани, А. В. Сергеев // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. — 2006. — С. 5–7.
14. Бокерия Л. А. Эффективно ли сочетание ТМЛР с ангиогенным фактором (α-ECGF) в лечении больных ИБС с поражением дистального русла? / Л. А. Бокерия, И. И. Беришвили, von Specht Brend [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова : тезисы докладов. — М., 2008. — С. 49.
15. Брылякова С. Е. Непосредственные и отдаленные результаты чрескожных коронарных вмешательств у больных ишемической болезнью сердца / С. Е. Брылякова, И. В. Рогачев, З. Д. Романова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — Т. 7, № 6, приложение № 1. — С. 58.
16. Бутенко Г. М. Регенеративная медицина и стволовые клетки — проблемы и решения / Г. М. Бутенко, В. М. Кирик // Журнал НАМН Украины. — 2011. — Т. 17, № 1. — С. 62–66.
17. Влияние IL—3 на регенеративно-индукционную активность гемопоэтических стволовых клеток костного мозга при экспериментальном инфаркте миокарда / Беляев Н. Н., Рысулы М. Р., Исабекова А. С. [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерияю. — 2009. — Т. IV, № 4. — С. 12–19.
18. Вовчук И. Л. Активность тканевих катепсин-L-подобных протеиназ у женщин с онкопатологией тела матки / И. Л. Вовчук, С. С. Чернадчук // Укр. біохім. журнал. — 2004. — Т. 76, № 2. — С. 124–129.
19. Вострикова О. Ф. Сравнительный анализ экспрессии каспаз в пренекротической зоне миокарда после трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга с различным типом предифференцировки / О. Ф. Вострикова, И. В. Потапов, И. А. Кириллов [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова : тезисы докладов. — М., 2008. — С. 238–239.
20. Генные и клеточные технологии при лечении сердечно-сосудистых заболеваний (опыт Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева РАМН) / Л. А. Бокерия, Г. П. Георгием, Е. З. Глухова [и др.] // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. — 2004. — Т. 5, № 7. — С. 70–92.
21. Герцик Ю. Г. Влияние внедрения инновационных технологий в сфере медицины и медицинской техники на эффективность реализации социально-значимых медико-технологических проектов / Ю. Г. Герцик // Инновации. — 2011. — № 6. — С. 74–81.

22. Голухова Е. З. Клеточная терапия в кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии: обзор рандомизированных исследований. Реалии и перспективы / Е. З. Голухова, Е. З. Какучая // Креативная кардиология. — 2007. — № 1–2. — С. 55–74.
23. Гривенков И. А. Эмбриональные стволовые клетки / И. А. Гривенков, А. А. Шкуматов // Институт молекулярной генетики РАН. Проблемы репродукции. — М., 2002. — Вып. 3. — С. 16–25.
24. Григорян А. С. Роль миграционной оси SDF-1 CXCR4 в хоуминге клеток-предшественников и метастазировании злокачественных опухолей / А. С. Григорян // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2006. — Т 4. — С. 32–38.
25. Гринь В. К. Сократительная функция сердца после различных вариантов введения клеточного трансплантата при инфаркте миокарда в эксперименте / В. К. Гринь, В. Ю. Михайличенко, В. А. Коноплянко // Университетская клиника. — 2010. — Т. 6, № 1–2. — С. 20–23.
26. Грищенко В. И. Проблема стволовых клеток: фундаментальные и прикладные аспекты / В. И. Грищенко // Журн. АМН України. — 2004. — Т. 10, № 2. — С. 189–192.
27. Гуреев С. В. Клиническая оценка отдаленных результатов трансплантации аутологичных стволовых клеток костного мозга у кардиохирургических больных с сердечной недостаточностью / С. В. Гуреев, Н. А. Онищенко, А. А. Темнов [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова : тезисы докладов. — М., 2008. — С. 242–243.
28. Гуреев С. В. Мононуклеарные клетки костного мозга, активированные последовательно in vivo и ex vivo, улучшают функцию миокарда при хронической ишемической сердечной недостаточности / С. В. Гуреев, А. А. Темнов, Н. А. Онищенко [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова : тезисы докладов. — М., 2008. — С. 243–244.
29. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении in vitro и in vivo / П. В. Кругляков, И. Б. Соколова, Н. Н. Зинькова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2006. — № 4. — С. 194–197.

30. Дьячко А. В. Повышение эффективности хирургического лечения хронической сердечной недостаточности : автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. мед. наук : спец. 14.00.44 — «кардиохирургия» / А. В. Дьячко. — Москва, 2008. — 24 с.
31. Еремеевна М. В. Возможности применения стволовых клеток и клеток-предшественников для стимуляции реваскуляризации и регенерации органов / М. В. Еремеевна // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2010. — Т. XII, № 1. — С. 86–93.
32. Залесский В. Н. Апоптоз кардиомиоцитов, сердечная недостаточность и постинфарктное ремоделирование (проблемы и перспективы) / В. Н. Залесский, С. Н. Поливода // Запорожский мед. журнал. — 2003. — № 5. — С. 55–58.
33. Значение и динамика содержания CD117+, CD133+, CD34+38-, CD90+34- стволовых клеток костного мозга в периферической крови при остром инфаркте миокарда / М. А. Шматолкина, В. В. Рябов, Т. Е. Суслова [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — Т. 7. — № 6, приложение № 1. — С. 418–419.
34. Какучая Т. Т. Результаты применения клеточных технологий в лечении пациентов с хронической сердечной недостаточностью : автореф. дис. на соиск. степени д. мед. н. : 14.00.06 — кардиология / Т. Т. Какучая. — Москва, 2009. — 48 с.
35. Калигин М. С. Клетки-мишени фактора стволовых клеток во внутренних органах человека в ходе онтогенеза : автореф. дис. на поиск. степени к. мед. н. : 03.00.25 — гистология, цитология, клеточная биология / М. С. Калигин. — Казань, 2009. — 22 с.
36. Кардиологическая ударно-волновая терапия в лечении пациентов с ишемической болезнью сердца / А. С. Никоненко, А. В. Молодан, С. Н. Завгородний [и др.] // Вестник неотложной и восстановительной медицины. — 2009. — Т. 10, № 3. — С. 282–284.
37. Кнышов Г. В. Больное сердце — это диагноз, а не приговор / Г. В. Кнышов // Режим доступа к журналу : http://zn. ua/HEALTH/gennadiy_knyshov_bolnoe_serdtse__eto_diagnoz,_a_ne_prigovor_esli_ego_professionalno_lechat-77717. html.

38. Козлов В. А. Мобилизация цитокинами аутологичных стволових клеток в терапии инфаркта миокарда / В. А. Козлов, А. Б. Смолянинов // Дни иммунологии в Санкт-Петербурге : VII Всероссийский форум с международным участием им. акад. В. И. Иоффе, 24 июня 2003 г. : тезисы докл. — СПб, 2003. — С. 24.
39. Коронарная ангиопластика у больных с острым инфарктом миокарда / А. Н. Федорченко, Р. С. Тупикин, А. Ю. Бухтояров [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — Т. 7, № 6, приложение № 1. — С. 386–388.
40. Костномозговые клетки-предшественники и возникновение рестеноза после имплантации стентов с лекарственным покрытием / З. А. Габбасова, С. Г. Козлов, О. С. Сабурова, А. А. Лякишев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — Т. 7, № 6, приложение № 1. — С. 76.
41. Куртова А. В. Постинфарктная клеточная регенерационная терапия сердечной мышцы / А. В. Куртова, Е. Е. Зуева, А. С. Немко // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2006. — № 2. — С. 35–43.
42. Мареев В. Ю. Перспективы в лечении хронической сердечной недостаточности / В. Ю. Мареев, Ю. Н. Беленков // Сердечная недостаточность. — 2003. — № 3. — С. 109–114.
43. Маслов Л. Н. Клеточная трансплантация в лечении инфаркта миокарда: проблемы и перспективы / Л. Н. Маслов, В. В. Рябов, С. И. Сазонова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2003. — № 4. — С. 78–86.
44. Маслов Л. Н. Регенерация миокарда / Л. Н. Маслов, В. В. Рябов, С. И. Сазонова // Успехи физиологических наук. — 2004. — № 3. — С. 50–60.
45. Матюков А. А. Влияние интрамиокардиальной аутотрансплантации клеток костного мозга на перфузию ишемизированного миокарда в эксперименте / А. А. Матюков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2006. — № 3. — С. 42–48.
46. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга: свойства, функции, возможность использования в регенеративной и восстановительной терапии / И. В. Пыко, С. В. Корень, З. Б. Кварчева, А. С. Федулова // Режим доступа к журналу : http://www.bsmu.by/index.php?option=com_content&task=view&id=44&Itemid=52.
47. Методика торакоскопической ТМЛР в сочетании с имплантацией «плацебо» стволовых клеток в миокард ЛЖ на работающем сердце / З. Б. Махалдиани, А. В. Сергеев, А. А. Катков [и др.] // Бюллетень НЦ ССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. — 2007. — Т. 8, № 6. — С. 313.
48. Михайличенко В. Ю. Явление хоуминга мезенхимальных стволовых клеток после трансплантации при инфаркте миокарда в эксперименте / В. Ю. Михайличенко // Патологія. — 2008. — Т. 5, № 3. — С. 93.
49. Мойбенко А. А. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / А. А. Мойбенко, В. Е. Досенко, О. М. Пархоменко. — К. : Наукова думка, 2008. — 518 с.
50. Морфофункциональная и молекулярно-генетическая оценка экспериментальных результатов вариантов непрямой реваскуляризации с использованием различных клеток костномозгового происхождения / А. М. Карасиков, П. М. Ларионов, А. М. Чернявский [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. — 2007. — № 4. — С. 75–81.
51. Национальные клинические рекомендации Всероссийского научного общества кардиологов. — Москва, 2008. — 512 с.
52. Никольская А. О. Интраоперационное применение аутологичных клеток костного мозга снижает частоту и тяжесть инфекционных ослонений у больных при аортальном шунтировании в послеоперационном периоде / А. О. Никольская, О. А. Савостьянова, Т. С. Спирина [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова : тезисы докладов. — М., 2008. — С. 261.
53. Никоненко А. С. Ударно-волновая терапия в лечении ишемической болезни сердца / А. С. Никоненко, А. В. Молодан, С. Н. Завгородний // Сучасні медичні технологіію. — 2009. — № 1. — С. 31–35.
54. Новые подходы к лечению ишемической болезни сердца: терапевтический ангиогенез в сочетании с хирургической ре-

васкуляризацией миокарда / Л. А. Бокерия, Е. З. Голухова, М. В. Еремеева [и др.] // Терапевтический архив. — 2004. — Т. 76, № 6. — С. 25–30.
55. Отдаленные результаты применения интракоронарной инфузии аутологичных мононуклеаров костного мозга / В. М. Седов, А. С. Немков, Б. В. Афанасьев [и др.] // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». — 2007. — Т. 8, № 6. — С. 297.
56. Оценка паракринных эффектов аутологичных костномозговых клеток предшественников эндотелиоцитов у пациентов с застойной сердечной недостаточностью в плацебо-контролируемом исследовании / Л. А. Бокерия, Е. З. Глухова, Т. Т. Пахучая [и др.] // Сердечно-сосудистые заболевания. — 2009. — Т. 10, № 6. — С. 312.
57. Первые результаты терапевтического ангиогенеза у пациентов с ишемической болезнью сердца с использованием гена VEGF165 человека / Л. А. Бокерия, Е. З. Голухова, М. В. Еремеева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2005. — № 3. — С. 123–131.
58. Первый клинический опыт применения аллогенных скелетных миобластов для лечения пациентов с ишемической кардиомиопатией / Л. А. Бокерия, П. К. Ло, И. И. Беришвили [и др.] // Бюлл. НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. — 2004. — Т. 5, № 4. — С. 142–151.
59. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда / В. И. Шумаков, Э. Н. Казаков, Н. А. Онищенко [и др.] // Рос. кардиол. журн. — 2003. — Т. 5. — С. 42–50.
60. Первый опыт комбинированного лечения хронической ишемии нижних конечностей с использованием стимуляторов неоангиогенеза / Л. А. Бокерия, А. А. Спиридонов, М. В. Еремеева [и др.] // Сердечно-сосудистые заболевания: ангиология и сосудистая хирургия. — 2006. — Т. 7, № 4. — С. 73–80.
61. Петренко А. Ю. Трансплантация стволовых клеток — перспективное направление терапии XXI века. Стволовые кроветворные клетки из разных источников / А. Ю. Петренко, В. И. Грищенко // Междунар. мед. журн. — 2003. — Т. 9, № 1. — С. 123–129.
62. Петренко А. Ю. Трансплантация стволовых клеток — терапия XXI века. 1. Характеристики и свойства стволовых клеток / А. Ю. Петренко, В. И. Грищенко. // Пробл. криобиол. — 2001. — № 2. — С. 3–12.
63. Потапов И. В. Имеет ли смысл кардиомиопластика нефракционированными клетками костного мозга в постинфарктном периоде? / И. В. Потапов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2005. — № 2. — С. 31–32.
64. Потапов И. В. Клеточная кардиомиопластика / И. В. Потапов, М. Е. Крашенинников, Н. А. Онишенко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2001. — № 2. — С. 53–62.
65. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в кардиологии и травматологии / В. К. Гринь, А. А. Штутин, В. Ю. Михайличенко, А. Г. Попандопуло, С. И. Эстрин, Е. М. Денисова, В. М. Оксимец, Т. В. Кравченко, В. Г. Климовицкий // Журнал НАМН Украины. — 2011. — Т. 17, № 1. — С. 67–75.
66. Результаты клинических исследований с использованием клеточных технологий в лечении пациентов с застойной сердечной недостаточностью / Л. А. Бокерия, Е. З. Глухова, Н. А. Чигоридзе [и др.] // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». — 2007. — Т. 8, № 6. — С. 296.
67. Результаты повторных операций ТМЛР у больных ИБС с возвратом стенокардии после ранее выполненной прямой реваскуляризации миокарда / Л. А. Бокерия, И. И. Беришвили, М. Н. Вахромеева [и др.] // Сердечно-сосудистые заболевания. — 2009. — Т. 10, № 6. — С. 66.
68. Репин В. С. Медицинская клеточная биология / В. С. Репин, Г. Т. Сухих — М. : БЭБиМ, 1998. — 199 с.
69. Рубина К. А. Аневризма сердца — новый источник мультипотентных клеток-предшественников / К. А. Рубина, З. И. Цоколаева, Т. М. Рахмат-Заде [и др.] // XX съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова, 4–8 июня 2007 г. : тезисы докл. — Москва, 2007. — С. 80.

70. Румянцев П. П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации / П. П. Румянцев. — Л. : Наука, 1982. — 288 с.
71. Саркисов Д. С. Регенерация и ее клиническое значение / Д. С. Саркисов. — М. : Медицина, 1979. — 284 с.
72. Сергеев А. В. Ближайшие результаты торакоскопической сочетанной непрямой реваскуляризации миокарда (экспериментальное исследование) : автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. мед. наук, спец. 14.01.26 — «сердечно-сосудистая хирургия» / А. В. Сергеев. — Москва, 2010. — 24 с.
73. Сергеевичев Д. С. Морфологический и молекулярный анализ ангиогенеза при моделировании ишемии и реваскуляризации миокарда : автореф. дис. на поиск. степени к. б. н. : 03.00.25 — гистология, цитология, клеточная биология / Д. С. Сергеевичев. — Новосибирск, 2009. — 14 с.
74. Соколов Ю. М. Новые показания для реваскуляризации миокарда в современной кардиологии / М. Ю. Соколов // Серце і судини. — 2012. — № 2. — С. 24–27.
75. Сравнительная оценка качества жизни больных инфарктом миокарда после тромболизиса и оперативного лечения / Н. А. Балабаева, Ю. М. Мостовой, Ю. В. Бабийчук [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — Т. 7, № 6, приложение № 1. — С. 39.
76. Торакоскопическая сочетанная непрямая реваскуляризация миокарда / Л. А. Бокерия, З. Б. Махалдиани, О. Л. Бокерия, А. В. Сергеев // Бюллетень НЦ ССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. — 2010. — Т. 11, № 3. — С. 190.
77. Торакоскопический способ введения «плацебо» стволовых клеток в миокард ЛЖ на работающем сердце в эксперименте / Л. А. Бокерия, З. Б. Махалдиани, О. Л. Бокерия [и др.] // Бюллетень НЦ ССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. — 2008. — Т. 9, № 3. — С. 52.
78. Трансплантация аллогенных мультипотентных стромальных клеток при хирургическом лечении хронической сердечной недостаточности / А. В. Дьяков, Т. Х. Фатхудинов, А. В. Коротеев, Д. В. Гольдштейн // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова : тезисы докладов. — М., 2008. — С. 245–246.
79. Трансплантация стволовых клеток — перспективное направление терапии XXI века / А. Ю. Петренко, В. И. Грищенко, О. В. Оченашко, Ю. А. Петренко // Международный медицинский журнал. — 2003. — № 3. — С. 121–126.
80. Ударно-волновая терапия — новое направление в лечении ишемической болезни сердца / А. Б. Хажзегова, Е. А. Школьник, М. В. Копелева [и др.] // Кардиология. — 2007. — № 11. — С. 90–94.
81. Фетисов К. В. Клиническое исследование стимуляции коллатерального кровообращения стволовыми клетками костного мозга / К. В. Фетисов, С. М. Лазарев // Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества : международн. научн.-практ. конф. : тезисы докл. — Москва, 2007. — С. 11–14.
82. Фетисов К. В. Малоинвазивные доступы к сердцу для проведения непрямой реваскуляризации миокарда мононуклеарами костного мозга : автореферат дисс. на соиск. ученой степени к. мед. н. : спец. 14.00.27 «хирургия», 14.00.06 «кардиология» / К. В. Фетисов. — Санкт-Петербург, 2008. — 22 с.
83. Фетисов К. В. Стимуляция ангиогенеза мононуклеарами костного мозга / С. М. Лазарев, К. В. Фетисов // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева Сердечно-сосудистые заболевания. — 2006. — Т. 7, № 5. — С. 267.
84. Фундаментальные и прикладные аспекты клеточных технологий в кардиологии и кардиохирургии / С. В. Попов, В. В. Рябов, М. А. Суслова и др. // Бюллетень СО РАМН. — 2008. — Т. 132, № 4. — С. 5–15.
85. Чернявский А. М. Первые результаты эндокардиальной имплантации аутологичных стволовых клеток у больных с ишемической болезнью сердца / А. М. Чернявский, Е. А. Покушалов, Е. Н. Кливер [и др.] // Всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов : тезисы докл. — Москва, 2007. — С. 245.
86. Чернявский А. М. Трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация в сочетании с имплантацией стволовых клеток в хирургии ишемической болезни сердца / А. М. Чернявский,

П. М. Ларионов, В. Ю. Бондар [и др.] // IV Всероссийский съезд трансплантологов им. акад. В. И. Шумакова : тезисы докл. — М., 2008. — С. 43.
87. Чудиновских Ю. А. Анализ возможности пролиферации клеток в зрелом миокарде / Ю. А. Чудиновских, М. В. Еремеевна, Р. А. Серов [и др.] // Сердечно-сосудистые заболевания. — 2009. — Т. 10, № 6. — С. 312.
88. Шахов В. П. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии / В. П. Шахов, С. В. Попов. — Томск : STT, 2004. — 170 с.
89. Шварцбурд П. М. Стволовые клетки и предраковые воспалительное микроокружение в развитии эпителиальных новообразований при старении / П. М. Шварцбурд // Успехи геронтологии. — 2008. — Т. 21, № 3. — С. 356–366.
90. Шевченко Ю. Л. Робот-ассистированная реваскуляризация миокарда у пациента с ИБС / Ю. Л. Шевченко, Г. Г. Борщев, П. А. Федотов // Вестник национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. — 2011. — Т. 6, № 2. — С. 138–140.
91. Шумаков В. И. Биологические резервы костного мозга и коррекция органных дисфункций / В. И. Шумаков, Н. А. Онищенко — М., 2009. — 308 с.
92. Шумаков В. И. Трансплантология — руководство / В. И. Шумаков. — Москва, 1995. — 392 с.
93. A 12-Month follow-up study to protocol 24779 (a double-blind, prospective, randomized, placebo-controlled study to determine the tolerability, efficacy, safety, and dose range of intramyocardial injections of G-CSF mobilized auto CD34+ cells for reduction of angina episodes in patients with refractory chronic myocardial ischemia — ACT34-CMI). Sponsored by Baxter healthcare corporation. United States : food and drug administration. Clinical trials. gov. Indentifier : NCT00545610.
94. A novel protective affect of erythropoietin in the infarcted heart / C. J. Parsa, A. Matsumoto, J. Kim [et al.] // J. Clin. Invest. — 2003. — Vol. 112. — P. 999–1007.
95. A phase I, open-label, non-randomized, dose escalation, multi center study of assess the safety and cardiovascular effects of autologous skeletal myoblast implantation by a transendocardial catheter delivery system in congestive heart failure patients post myocardial infarctions with previous placement of ICD. Sponsored by: Bioheart, Inc. United States: Food and Drug administration. Clinical trial. Gov. Identifier : NCT0054678.
96. A pilot study to assess the feasibility of transplanting fetal cardiac tissue into pericardium of infarcted rat heart / M. Yao, S. L. Hale, J. S. Dow [et al.] // Cardiac Vasc. Regen, — 2000. — № 1. — P. 221–227.
97. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly express functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow / R. F. Wynn, C. A. Hart, C. Corradi-Perini [et al.] // Blood. — 2004. — Vol. 104, № 9. — P. 2643–2645.
98. Abbott J. D. Stem cells and cardiovascular disease / J. D. Abbott, F. J. Giordano // J. Nucl. Cardiol. — 2003. — Vol. 10. — P. 403–412.
99. Actual problems of cellular cardiomyoplasty / A. Baygenzhin, S. Tuganbekova, G. Fedotovskyh [et al.] // Medical and gealth sciences journal. — 2010. — P. 12–17.
100. Administration of granulocyte colony-stimulating factor enhances andothelization and microvessel formation in small caliber synthetic vascular grafts / V. Bhattacharya, P. A. MvSweeney, Q. Shi [et al.] // J. Vasc. Surg. — 2000. — Vol. 32. — P. 116–123.
101. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro / J. Sanchez-Ramos, S. Song, F. Cardozo-Pelaez [et al.] // Exp. Neurol. — 2000. — Vol. 164, № 2. — P. 247–256.
102. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis / D. Woodbury, K. Reynolds, I. B. Black [et al.] // J. Neurosci. res. — 2002. — Vol. 69, № 6. — P. 908–917.
103. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration / A. P. Beltrami, L. Barlucchi, D. Torella [et al.] // Cell. — 2003. — Vol. 114. — P. 763–776.
104. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons / D. Woodbury, E. J. Schwarz, D. J. Prockop, I. B. Black // J. Neurosci Res. — 2000. — Vol. 61, № 4. — P. 364–370.
105. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleared and multinucleared myocytes

in the human heart / G. Olivetti, E. Cigola, R. Mastri [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1996. — Vol. 28. — P. 1463–1477.
106. Alloreactivity of umbilical cord blood mononuclear cells : specific hyporesponse to non-inheried maternal antigens / A. Tsafrir, C. Brautbar, A. Nagler [et al.] // Hum. Immunolog. — 2000. — Vol. 61. — P. 548–554.
107. Alvardo A. S. A cellular view of regeneration / A. S. Alvardo // Nature. — 2009. — № 460. — P. 39–40.
108. An experimental platform for studying growth and invasiveness of tumor cells within teratomas derived from human embryonic stem cells / M. Tzukerman, T. Rosenberg, Y. Ravel [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 13507–13512.
109. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells / Y. Moritoh, E. Yamato, Y. Yasui [et al.] // Diabetes. — 2003. — Vol. 52, № 5. — P. 1163–1168.
110. Anversa P. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart / P. Anversa, J. Kajstura // Circ. Res. — 1998. — Vol. 83. — P. 1–14.
111. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes / M. Snir, I. Kehat, A. Gepstein [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2003. — Vol. 285. — P. 2355–2363.
112. Autologous bone marrow transplantation for myocardial regeneration / C. Stamm, B. Westphal, H. D. Kleine [et al.] // Lancet. — 2003. — Vol. 361. — P. 45–46.
113. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction : double-blind, randomised controlled trial / S. Janssens, C. Dubois, J. Bogaert [et al.] // Lancet. — 2006. — Vol. 367, № 9505. — P. 113–121.
114. Autologous cell transplantation for the treatment of damaged myocardium / M. S. Penn, G. S. Francis, S. G. Ellis [et al.] // Prog. Cardiovasc. Dis. — 2002. — Vol. 45. — P. 21–32.
115. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium / Y. L. Tang, Q. Zhao, Y. C. Zhang [et al.] // Regul. Pept. — 2004. — Vol. 117. — P. 3–10.
116. Autologous porcine heart function after a myocardial infarction / R. K. Li, R. D. Weisel, D. A. Mickle [et al.] // J. Cardiovascular Surg. — 2000. — Vol. 119, № 1. — P. 62–68.

117. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction / P. Menashe, A. A. Hagege, J. T. Vilquin [et al.] // J. am. Coll. cardiol. — 2003. — Vol.41, № 7. — P. 1078–1083.
118. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function / S. Tomita, R. K. Li, R. D. Weisel [et al.] // Circulation. — 1999. — Vol. 100, suppl. II. — P. 247–256.
119. Baserga R. The biology of cell reproduction / R. Baserga. — Cambridge, Mass / London : Harvard University Press., 1985. — 452 p.
120. Behfar A. Cardioprotective repair through stem cell-based cardiopoiesis / A. Behfar, A. Terzic // J. Appl. Physiol. — 2007. — № 103 (4). — P. 1438–1440. http://www.mayoclinicproceedings.com/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=jap&resid=103/4/1438.
121. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infracted myocardium? / J. Leor, S. Aboulafia-Etzion, A. Dar [et al.] // Circulation. — 2000. — Vol. 102, № 19. — P. 56–61.
122. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell leneages after infarction independently of cell fusion / J. Kajstura, M. Rota, B. Whang [et al.] // Circ. Res. — 2005. — Vol. 96. — P. 127–137.
123. Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion / M. Brittan, K. M. Braun, L. E. Reynolds [et al.] // J. Pathol. — 2005. — Vol. 205. — P. 1–13.
124. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium / D. Orlic, J. Kajastura, S. Chimenti et al. // Nature. — 2001. — Vol. 410. — P. 701–705.
125. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress / A. T. Palermo, M. A. Labarge, R. Doyonnas [et al.] // Dev. Biol. — 2005. — Vol. 279. — P. 336–344.
126. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mistmatched bone marrow transplantation patients / A. Deb, S. Wang, K. A. Skelding [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 107. — P. 1247–1249.
127. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency throufh cell fusion, but not transdifferentiation / J. M. Nygren, S. Jovinge, M. Breitbach [et al.] // Nat. Med. — 2004. — Vol. 10. — P. 494–501.

128. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocites (CMG Cells) express functional adrenergic and musccarinic receptors / D. Hakuno, K. Fukuda, S. Makino [et al.] // Circulation. — 2002. — Vol. 105, № 3. — P. 380–386.
129. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell–derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs / Tetsuhiko Go, Philipp Jungebluth, Silvia Baiguero [et al.] // Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. — 2010. — Vol. 139. — N 2. — P. 437–443.
130. Can stem cells mend a broken heart? / Davani S., Deschaseaux F., D. Chlamers [et al.] // Cardiovasc. Res. — 2005. — Vol. 65. — P. 305–316.
131. Cardiac progenitor cells from adult myocardium : homing, differentiation, and fusion after infarction / H. Oh, S. B. Bradfute, T. D. Gallardo [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 12313–12318.
132. Cardiac specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice / S. Welch, D. Plank, S. Witt [et al.] // Cir. Res. — 2002. — Vol. 90. — P. 641–648.
133. Cardiac stem and progenitor cell biology for regenerative medicine / D. Torella, G. M. Ellison, B. Nadal-Ginard [et al.] // Trends. Cardiovasc. Med. — 2005. — Vol. 15. — P. 229–236.
134. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infracted myocardium, and improve cardiac function / B. Dawn [et al.] // Proc. Natl. Acad. Scienc. USA. — 2005. — Vol. 102. — P. 3766–3771.
135. Cardiomyocyte transplantation improves heart function / R. K. Li, Z. Q. Jia, R. D. Weisel [et al.] // Ann. Thorac. Surg. — 1996. — Vol. 62. — P. 654–660.
136. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro / S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi [et al.] // J. Clin. Invest. — 1999. — Vol. 103. — P. 697–705.
137. Cardiomyocytes grafting for cardiac repair : graft cell death and anti-death strategies / M. Zhang, D. Methot, V. Poppa [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2001. — Vol. 33. — P. 907–921.

138. Catheter Based Simultaneous Mapping of Cardiac Activation and Motion : A Review / Hanno U Klemm, Olaf Franzen, Rodolfo Ventura, Stephan Willems // Indian Pacing Electrophysiol J. — 2007. — Vol. 3, № 7. — P. 148–159.
139. Catheter-based delivery of cells to the heart / W. Sherman, T. P. Martens, J. F. Viles-Gonzalez, T. Siminiak // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. — 2006. — Vol. 3 (suppl 1). — S. 57–64. http ://www.mayoclinicproceedings.com/external-ref?access_num=10.1038/ncpcardio0446&link_type=DOI.
140. CAUSMIC (first US randomized controlled trial utilizing 3-demensional guided, catheter-based delivery of autologous skelet myoblast for ischemic cardiomyopathy : feasibility, safety and improvement in cardiac performance) // Clin. Cardiol. — 2007. — Vol. 30. — P. 414–419.
141. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction / M. Jain, H. DerSimonian, D. A. Brenner [et al.] // Circulation. — 2001. — Vol. 103. — P. 1920–1927.
142. Cell therapy to repair broken hearts / R. K. Li, T. M. Yau, T. Sakai [et al.] // Can. J. Cardiol. — 1998. — № 14. — P. 735–744.
143. Cell transplantation for myocardial repair : an experimental approach / D. Marelli, C. Desrosiers, M. el-Alfy [et al.] // Cell Transplant. — 1992. — № 1. — P. 383–390.
144. Cell transplantation presrves cardiac function after infarction by infarct stabilization : augmentation by stem cell factor / S. Fazel, R. Chen, R. D. Wiesel [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2005. — Vol. 130, № 5. — P. 1310–1315.
145. Cell transplantation to prevent heart failure : a comparison of cell types / T. Fujii, T. M. Yau, R. D. Weisel [et al.] // Ann. Thorac. Surg. — 1999. — Vol. 76. — P. 2062–2070.
146. Cell-to-cell contact induced mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell / T. Wang, Z. Xu, W. Jiang, A. Ma // Int. J. Cardiol. In press 2005.
147. Ceradini D. J. Homing to hypoxia : HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue / D. J. Ceradini, G. C. Gurther // Trends Cardiovasc. Med. — 2005. — № 15. — P. 57–63.

148. Chambers I. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells / I. Chambers, A. Smith // Oncogene. — 2004. — Vol. 23. — P. 7150–7160.
149. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells / C. Xu, S. Police, N. Rao, M. K. Carpenter // Circ. Res. — 2003. — Vol. 91. — P. 501–508.
150. Characterization of long-term endogenous cardiac repair in children after heart transplantation / S. Rupp, M. Koyanagi, M. Iwasaki [et al.] // Eur. Heart J. — 2008. — Vol. 29. — P. 1867–1872.
151. Chimerism of the transplanted heart / F. Quaini, K. Urbanek, A. P. Beltrami [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2002. — Vol. 346. — P. 5–15.
152. Chiu R. C. J. Cellular cardiomyoplasty myocardial regeneration with satellite cell implantation / R. C. J. Chiu, A. Zibaitis, R. L. Kao // Ann. Thorac. Surg. — 1995. — Vol. 60. — P. 12–18.
153. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction / Y. S. Yoon, A. Wecker, L. Heyd [et al.] // J. Clin. Invest. — 2005. — Vol. 115. — P. 326–338.
154. Coletta John E. Cardiac mapping and stem cell delivery for the damaged myocardium / John E. Coletta, Noah Rosenthal, Marco A. Costa // Expert Rev. Cardiovasc. Ther. — 2008. — Vol. 9, № 6. — P. 1181–1190.
155. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction : the MYSTAR prospective, randomized study / M. Gyöngyösi, I. Lang, M. Dettke [et al.] // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. — 2009. — Vol. 6 (1). — P. 70–81.
156. Comparison of angioplasty with stenting, with of without abciximab, in acute myocardial infarction / G. W. Stone, C. L. Grines, D. A. Cox [et al.] // N. engl. J. Med. — 2002. — Vol. 346. — P. 957–966.
157. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts / K. A. Hutcheson, B. Z. Atkins, M. T. Hueman [et al.] // Cell Transplant. — 2000. — № 9. — P. 359–368.
158. Comparison of the effects fatal cardiomyocytes and skeletal myoblasts transplantation on post-infarct left ventricular function / M. Scorsin, A. A. Hagege, J. T. Vilquin [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2000. — Vol. 119. — P. 1169–1175.
159. Crucial role of stromal cell-derived factor-16 in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice / A. Schober, S. Knarren, M. Lietz [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 108. — P. 2491–2497.
160. CXCR-4-transgene expression significantly improves marrow engraftment of cultured hematopoietic stem cells / S. Brenner, N. Whiting-Theobald, T. Kawai [et al.] // Stem cells. — 2004. — Vol. 22, № 7. — P. 1128–1133.
161. Dai W. Stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction / W. Dai, S. Hale, R. Kloner // Eur. Heart. J. — 2003. — Vol. 24. — P. 2012–2020.
162. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis / R. Kornowski, S. Fuchs, M. B. Leon [et al.] // Circulation. — 2000. — Vol. 101. — P. 454–458.
163. Development of novel method for cell transplantation through the coronary artery / K. Suzuki, N. J. Brand, R. T. Smolenski [et al.] // Circulation. — 2002. — Vol. 102. — P. 359–364.
164. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart / G. Y. Koh, M. G. Klug, M. H. Soonpaa, L. J. Field // J. Clin. Invest. — 1993. — Vol. 92. — P. 1548–1554.
165. Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats / A. Tomescot, J. Leschik, V. Bellamy [et al.] // Stem Cells. — 2007. — № 25 (9). — P. 2200–2205.
166. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells / C. Mummery, D. Ward-van Oostwaard, P. Doevendans, R. Spijker, S. van den Brink // Circulation. — 2003. — Vol. 107. — P. 2733–2740.
167. Dimmeler S. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy / S. Dimmeler, A. Leri // Circ. Res. — 2008. — Vol. 102. — P. 1319–1330.
168. Dimmeler S. Unchain my heart : the scientific foundations of cardiac repair / Stefanie Dimmeler, Andreas M. Zeiher, Michael D. Schneider // The journal of clinical investigation. — 2005. — Vol. 115, № 3. — P. 572–583.

169. Direct intramyocardial percutsneous delivery of autologous bone marrow in patients with refractory myocardial angina / C. Briguori, B. Reimera, C. Sarais [et al.] // Am. Heart J. — 2006. — Vol. 151, № 3. — P. 674–680.
170. Directed mugration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway / J. Imitola, K. Raddassi, K. I. Park [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 2004. — Vol. 101, № 52. — P. 18117–18122.
171. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? / M. Scorsin, A. A. Hagege, F. Marotte [et al.] // Circulation. — 1997. — Vol. 96, Suppl. 9. — P. 188–193.
172. Dong C. Endothelial progenitor cells : a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease / C. Dong, P. J. Goldschmidt-Clermont // J. Interv. Cardiol. — 2007. — Vol. 20, № 2. — P. 93–99.
173. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative after myocardial infarction / H. Iwasaki, A. Kawamoto, M. Ashikawa [et al.] // Circulation. — 2006. — Vol. 113, № 10. — P. 1311–1325.
174. Drukker M. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells / M. Drukker, N. Benvenixty // Trends Biotechnol. — 2004. — Vol. 22. — P. 136–141.
175. Dvash T. Human embryonic stem cells as a model for early human development / T. Dvash, N. Benvenisty // Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. — 2004. — Vol. 18, № 4. — P. 929–940.
176. Effects of G-CSF on serum cholesterol and development of atherosclerotic plaque in appolipoprotein E-deficient mice / S. Guo, T. M. Doherty, C. Espinoza [et al.] // Circulation. — 2004. — Vol. 110, Suppl. 3. — P. 1111–1129.
177. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulationf factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction : the MAGIC cell randomised clinical trial / H. J. Kang, H. S. Kim, S. Y. Zhang [et al.] // Lancet. — 2004. — Vol. 363. — P. 751–756.
178. Effects of stem-cell mobilization with recombinant human granulocyte colony stimulating factor in patients with percutaneously revascularized acute anterior myocardial infarction / L. J. Suarez de, A. Torres, I. Herrera [et al.] // Rev. Esp. Cardiol. — 2005. — Vol. 58. — P. 253–261.
179. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells / Z. Song, J. Cai, Y. Liu [et al.] // Cell Res. — 2009. — Vol. 19. — P. 1233–1242.
180. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle : implications for infarct repair / H. Reinecke, G. H. MacDonald, S. D. Hauschka [et al.] // J. cell. Biol. — 2000. — Vol. 149. — P. 731–740.
181. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells / I. Kehat, L. Khimovich, O. Caspi [et al.] // Nat. Biotechnol. — 2004. — Vol. 22. — P. 1282–1289.
182. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro [et al.] // Science. — 1998. — Vol. 282. — P. 1145–1147.
183. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint / S. Wakitani, K. Takaoka, T. Hattori [et al.] // Rheumatology. — 2003. — Vol. 42, № 1. — P. 162–165.
184. Emerson C. Perin Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure / Emerson C. Perin, Hans E. R. Dohmann, Radovan Borojevic // Circulation. — 2003. — Vol. 107. — P. 2294.
185. Endogenous G-CSF and CD 34+ cell mobilization after acute myocardium infarction / A. M. Leone, S. Rutello, G. Bonanno [et al.] // Int. J. Cardiol. In press 2005.
186. Endothelial progenitor cells : characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy / D. M. Smadja, A. Cornet, J. Emmerich [et al.] // Cell. Biol. Toxicol. — 2007. — Vol. 23, № 4. — P. 223–239.
187. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts / W. H. Zimmermann, I. Melnychenko, G. Wasmeier [et al.] // Nat. Med. — 2006. — № 12. — P. 452–458.
188. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy / C. Jorgensen, F. Djouad, F. Apparailly, D. Noel // Gene Ther. — 2003. — № 10. — P. 928–931.

189. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization / C. Heeschen [et al.] // Blood. — 2003. — Vol. 102. — P. 1340–1346.
190. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary ligation in rats / C. Moon, M. Krawczyk, D. Ahn [et al.] // Prac. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 11612–11617.
191. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-depedent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury / A. Iwakura [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 108. — P. 3115–3121.
192. Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells / H. Reinecke, E. Minami, V. Poppa, C. E. Murry // Circ. Res. — 2004. — № 94. — P. 56–60.
193. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction / A. P. Beltrami, K. Urbanek, J. Kajstura [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2001. — Vol. 344. — № 23. — P. 1750–1757.
194. Extracorporeal shock waves : from lithotripsy to anti-inflammatory action by NO production / S. Mariotto [et al.] // Nitric Oxide. — 2005. — Vol. 12, № 2. — P. 89–96.
195. Fate of pre-differentiated mouse embryonic stem cells transplanted in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats : Histological characterization of the grafted cells / K. Thinyane, P. C. Baier, J. Schindehutte [et al.] // Brain Res. — 2005. — Vol. 31. — P. 1045–1480.
196. Fernandez-Aviles F. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction / F. Fernandez-Aviles, J. A. San Roman, J. Garcia-Frade // Circ. Res. — 2004. — Vol. 95. — P. 742–748.
197. Foley A. Heart induction : embryology to cardiomyocyte regeneration / A. Foley, M. Mercola // Trends Cardiovasc. Med. — 2004. — Vol. 14. — P. 121–125.
198. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells / M. A. Laflamme, J. Gold, C. Xu [et al.] // Am. J. Pathol. — 2005. — Vol. 167. — P. 663–671.
199. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium / M. H. Soonpaa, G. Y. Koh, M. G. Klug, L. J. Fiekd // Science. — 1994. — Vol. 264. — P. 98–101.

200. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesechymal stem cells for cardiovascular tissue engineering / K. Fukuda // Artificial organs. — 2001. — Vol. 25, № 3. — P. 187–193.
201. Fukuda K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells / K. Fukuda // Congenital Anomalies. — 2002. — Vol. 42, № 1. — P. 1–9.
202. Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes / K. Fukuda // Comptes rendus biologies. — 2002. — Vol. 325, № 10. — P. 1027–1038.
203. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells / J. Zhang, G. F. Wilson, A. G. Soerens [et al.] // Circ. Res. — 2009. — Vol. 104. — P. 130–141.
204. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes : insights into the development of cell-based pacemakers / T. Xue, H. C. Cho, F. G. Akar [et al.] // Circulation. — 2005. — Vol. 111. — P. 11–20.
205. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes / M. Alvarez-Dolado, R. Pardal, J. M. Garcia-Verdugo [et al.] // Nature. — 2003. — Vol. 425. — P. 968–973.
206. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis / Elisabeth Deindl, Marc-Michael Zaruba, Stefan Brunner [et al.] // The FASB journal. — 2006. — Vol. 20. — P. 956–972.
207. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embronic stem cells form stable intracardiac grafts / M. G. Klug, M. H. Soonpaa, G. Y. Koh, L. J. Field // J. Clin. Invest. — 1996. — Vol. 98. — P. 216–224.
208. GM-CSF-based mobilization effect in normal healthy donors for allogeneic peripheral blood stem cell transplantation / S. K. Sohn, J. G. Kim, K. W. Seo [et al.] // Bone marrow transplant. — 2002. — Vol. 30, № 2. — P. 81–86.
209. Goldenthal M. J. Stem cells and cardiac disorders : an appraisal / M. J. Goldenthal, J. Marin-Garcia // Cardiovasc. Res. — 2003. — Vol. 58. — P. 369–377.
210. Grave J. E. Plasticity of bone marrow derived stem cells / J. E. Grave, E. Bruscia, D. S. Krause // Stem Cells. — 2004. — Vol. 22. — P. 487–500.

211. Haematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium / L. B. Balsam, A. J. Wagers, J. L. Christensen [et al.] // Nature. — 2004. — Vol. 428. — P. 668–673.
212. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts / C. E. Murry, M. H. Soonpaa, H. Reinecke [et al.] // Nature. — 2004. — Vol. 428. — P. 664–668.
213. Haider H. Kh. Bone marrow cells for cardiac regeneration and repair : current status and issues / H. Kh. Haider // Expert. Rev. Cardiovasc. Ther. — 2006. — № 4. — P. 557–568.
214. Hemangioblastic Derivatives from Human Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Limited Expansion and Early Senescence / Q. Feng, S. J. Lu, I. Klimanskaya [et al.] // Stem Cells Published Online : 12 Feb.
215. Hematopoietic stem cell mobilization with intravenous melphalan and G-CSF in patients with chemoresponsive multiple myeloma : report of a phase II trial / S. Gupta, P. Zhou, H. Hassoun [et al.] // Bone marrow transplant. — 2005. — Vol. 35, № 5. — P. 441–447.
216. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart / A. Deten, H. C. Volz, S. Clamors [et al.] // Cardiovasc Res. — 2005. — № 65. — P. 52–63.
217. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase / S. Dimmeler [et al.] // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 108. — P. 391–397.
218. Holden C. A. Seismic Shift for Stem Cell Research / C. A. Holden, G. Vogel // Science. — 2008. — Vol. 319. — P. 560–563.
219. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian [et al.] // Mol. Biol. Cell. — 2002. — Vol. 13, № 12. — P. 4279–4295.
220. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres / I. Klimanskayza, Y. Chung, S. Becker [et al.] // Nature. — 2006. — Vol. 444. — P. 481–485.
221. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes / I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir [et al.] // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 108. — P. 407–414.
222. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes : action potential characterization / J. Q. He, Y. Ma, Y. Lee [et al.] // Circ. Res. — 2003. — Vol. 93. — P. 32–39.

223. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid / M. J. Martin, A. Muotri, F. Gage, A. Varki // Nat. Med. — 2005. — Vol. 11. — P. 228–232.
224. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart / C. Toma, M. F. Pittenger, K. S. Cahill [et al.] // Circulation. — 2002. — Vol. 105. — P. 93–98.
225. Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium / J. Leor, E. Guetta, M. S. Feinberg [et al.] // Stem cells. — 2006. — Vol. 24. — P. 772–780.
226. Hyun-Jae Kang Stem cell therapy for myocardial infarction / Hyun-Jae Kang, Hyo-Soo Kim, Young-Bae Park // JAMC. — 2004. — Vol. 171, № 5. — P. 442–443.
227. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation / I. Huber, I. Itzhaki, O. Caspi [et al.] // FASEB J. — 2007. — № 21 (10). — P. 2551–2563.
228. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker / N. Barker, J. H. Van Es, J. Kuipers [et al.] // Nature. — 2007. — Vol. 449. — P.1003–1007.
229. Implantiion of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblast, angijgenic ligands, and cytokines / H. Kamihata, H. Matsubara, T. Nishiue [et al.] // Circulation. — 2001. — Vol. 104. — P. 1046–1052.
230. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells / B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan [et al.] // Exp. Cell Res. — 1998. — Vol. 238, № 1. — P. 265–272.
231. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by canditions that increase intracellular cyclic AMP / W. Deng, M. Obrocka, I. Fisher [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2001. — Vol. 282, № 1. — P. 148–152.
232. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction / F. Osakada, Z. B. Jin, Y. Hirami [et al.] // J. Cell Sci. — 2009. — Vol. 122. — P. 3169–3179.
233. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration / B. Bittira, J.-Q. Kuang, A. Al-Khaldi [et al.] // Ann. Thorac. Surg. — 2002. — Vol. 74. — P. 1154–1160.

234. In vivo cardiovasculogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells / S. Gojo, N. Gojo, Y. Takeda [et al.] // Exp. Cell. Res. — 2003. — Vol. 288. — P. 51–59.
235. In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocytes / R. K. Li, D. A. G. Mickle, R. D. Weisel [et al.] // Circ. Res. — 1996. — Vol. 78. — P. 283–288.
236. Increased cardiac myocyte progenitors in failing human hearts / H. Kubo, N. Jaleel, A. Kumarapeli [et al.] // Circulation. — 2008. — Vol. 118. — P. 649–657.
237. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction / M. Massa, V. Rosti, M. Ferrario [et al.] // Blood. — 2005. — Vol. 105, № 1. — P. 199–206.
238. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells / J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto et al. // Science. — 2007. — Vol. 318. — P. 1917–1920.
239. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction / S. Etzion, A. Battler, I. M. Barbash [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2001. — Vol. 33, № 7. — P. 1321–1330.
240. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy / K. Urbanek, F. Quaini, J. Taska [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 10440–10445.
241. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury / J. F. Ji, B. P. He, S. T. Dheen, S. S. Tay // Stem Cells. — 2004. — Vol. 22, № 3. — P. 415–427.
242. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury / D. Lu, Y. Li, L. Wang [et al.] // J. Neurotrauma. — 2001. — Vol. 18, № 8. — P. 813–819.
243. Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibrodlasts in myocardial infarct repair / T. Yano, T. Miura, Y. Ikeda [et al.] // Cardiovasc. Pathol. — 2005. — Vol. 14. — P. 241–246.
244. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction the BOOST randomised controlled clinical trial / K. C. Wollert, G. P. Meyer, J. Lotz [et al.] // Lancet. — 2004. — Vol. 364. — P. 141–148.

245. Intracoronary Bone Marrow–Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction / Volker Schächinger, Sandra Erbs, Albrecht Elsässer [et al.] // N. Engl. Med. Jour. — 2006. — Vol. 33, № 12. — P. 1210–1221.
246. Intracoronary infusion of autologous mononuclear cells from bone marrow or granulocyte colony-stimulating factor-mobilized apheresis product may not improve remodeling, contractile function, perfusion, or infarct size in a swine model of large myocardial infarction / Ranil de Silva, Amish N. Raval, Mohiuddin Hadi [et al.] // European heart journal. — 2008. — Vol. 29. — P. 1772–1782.
247. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow / D. R. Martin, N. R. Cox, T. L. Hathcock, G. P. Niemeyer [et al.] // Exp. Hematol. — 2002. — Vol. 30, № 8. — P. 879–886.
248. Kan I. Integral ttherapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells / I. Kan, E. Melamed, E. Offen // Curr. Drug. Targ. — 2005. — № 6. — P. 31–41.
249. Katritsis D. G. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infracted human myocardium / D. G. Katritsis, P. A. Sotiropoulou, E. Karvouni // Catheter cardiovasc. Interv. — 2005. — Vol. 63, № 3. — P. 321–329.
250. Keating A. Bone marrow cells for cardiac repair / A. Keating // Biol. Blood Marrow Transplant. — 2005. — № 1. — P. 2–6.
251. Ketil Lunde Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells after acute myocardial infarction : lessons from the ASTAMI trial / Ketil Lunde, Svend Aakhus // European Heart Journal Supplements. — 2008. — Vol. 10, Suppl. — K. 35–38.
252. Koh C. J. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine / C. J. Koh, A. Atala // J. Am. Soc. Nephrol. — 2004. — Vol. 15. — P. 1113–1125.
253. Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions / F. Kuethe, B. M. Richartz, H. G. Sayer [et al.] // Int. J. cardiol. — 2004. — Vol. 97. — P. 123–127.
254. Laflamme M. A. Regenerating the heart / M. A. Laflamme, C. E. Murry // Nat. Biotechnol. — 2005. — Vol. 23. — P. 845–856.

255. Lange R. A. Reperfusion Therapy in acute myocardial infarction / R. A. Lange, L. D. Hillis // N. Eng. J. Med. — 2003. — Vol. 346. — P. 954–955.
256. Lee M. S. Stem-cell transplantation in myocardial infarctions a status report / M. S. Lee, R. R. Makkar // Ann. Intern. Med. — 2004. — Vol. 140, № 9. — P. 729–737.
257. Lincoff A. M. Illusion of reperfusion. Does anyone achieve optimal reperfusion during acute myocardial infarction? / A. M. Lincoff, E. J. Topol // Circulation. — 1993. — Vol. 88. — P. 1361–1374.
258. Lipopolysaccharide augments expression and secretion of vascular endothelial growth factor in rat ventricular myocytes / Y. Sugishita, T. Shimizu, A. Yao [et al.] // Biocgem. Biophys. Res. Commun. — 2000. — Vol. 268, № 2. — P. 657–662.
259. Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (Cyno 1) after transplantation / R. Sanchez-Pernaute, L. Studer, D. Ferrari [et al.] // Stem Cells. — 2005. — № 7. — P. 25–32.
260. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages / J. S. Wang, D. Shum-Tim, J. Galipeau [et al.] // J. Thorac. Casrdiovasc. Surg. — 2000. — Vol. 120, № 5. — P. 999–1006.
261. McDevitt T. C. Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway / T. C. McDevitt, M. A. Laflamme, C. E. Murry // J. Mol. Cell Cardiol. — 2005. — Vol. 39. — P. 865–873.
262. Mechanisms of cardiomyoplasty: comparative effects of adynamic versus dynamic cardiomyoplasty / B. D. Mott, J. H. Oh, Y. Misawa [et al.] // Ann. Thorac. Surg. — 1998. — Vol. 65. — P. 1039–1044.
263. Menasché P. Skeletal myoblasts and cardiac repair / P. Menasché // J. Mol. Cell Cardiol. — 2008. — № 45 (4). — P. 545–553.
264. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enchance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model / S. Davani, A. Marandin, N. Mersin [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 108. — P. 253–258.
265. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro / Wenrong Xu, Xiran Zhang, Hui Qian [et al.] // Experimental Biology and Medicine. — 2004. — Vol. 229. — P. 623–631.

266. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs / H. E. Young, M. L. Mancini, R. P. Wright [et al.] // Dev. Dyn. — 1995. — Vol. 202, № 2. — P. 137–144.
267. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and trageted-delivery vehicles for anticancer agents / M. Studeny, F. C. Marini, J. L. Dembinski [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. — 2004. — Vol. 96, № 21. — P. 1593–15603.
268. Meyer G. P. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction the BOOST randomized controlled clinical trial / G. P. Meyer, K. C. Wollert, J. Lotz // Circulation. — 2006. — Vol. 113, № 10. — P. 1272–1274.
269. Michael S. Lee Stem-Cell Transplantation in Myocardial Infarction: A Status Report / Michael S. Lee, Raj R. Makkar // Ann. Intern. Med. — 2004. — Vol.140. — P. 729–737.
270. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection / G. D. Wu, J. A. Nolta, Y. S. Jin [et al.] // Transplantation. — 2003. — Vol. 75, № 5. — P. 679–685.
271. Mixed chimerism of cardiomyocites and vessels after allogenic bont marrow and stem-cell transplantation in comparison with cardiac allografts / J. Thiele [et al.] // Transplantation. — 2004. — Vol. 77. — P. 1902–1905.
272. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction / W. Wojakowski, M. Tendera, A. Michalowska [et al.] // Circulation. — 2004. — Vol. 110. — P. 3213–3220.
273. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction / S. Shintani, T. Murohara, H. Ikeda [et al.] // Circulation. — 2001. — Vol. 103. — P. 2776–2779.
274. Mobilized bone marrow cells repair the infarcts heart, improving function and survival / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenty [et al.] // Prac. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 98. — P. 10344–10349.
275. Mobillizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha) treatment / Y. L. Tang, K. Qian, Y. C. Zhang [et al.] // Regul. Pept. — 2005. — Vol. 125, № 1–3. — P. 1–8.

276. Murohara T. Thearapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors / T. Murohara // Trends. Cadiovasc. Med. — 2001. — № 11. — P. 303–307.
277. Muscle regenerastion by bone marrow derived myogenic progenitors / G. Ferrari, G. C. Angelis, M. Colleta [et al.] // Science. — 1998. — Vol. 279. — P. 1528–1530.
278. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host / B. Leobon, I. Garcin, P. Menasche [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 7808–7811.
279. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery / P. Raake, G. von Degenfeld, R. Hinkel [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. — 2004. — Vol. 44 (5). — P. 1124–1129.
280. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy? / J. Kastrup, R. S. Ripa, Y. Wang, E. Jorgensen // Eur. Heart. J. — 2006. — Vol. 27. — P. 2748–2754.
281. Myocyte proliferation in and-stage cardiac failure in humans / J. Kajstura, A. Leri, N. Finato [et al.] // Proc. Natl. Acad. SCI. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 8801–8805.
282. Myoendothelial differentiation of human umbil-call cord blood-derived stem cells in aschemic limb tissues / M. Persce, A. Orlandi, M. G. Iachininoto [et al.] // Cir. Res. — 2003. — Vol. 93. — P. 51–62.
283. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue / R. K. Li, D. A. G. Mickle, R. D. Weisel [et al.] // Circulation. — 1997. — Vol. 96, suppl. 2. — P. 179–187.
284. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduced remodeling and improves cardiac function / A. A. Koocher, M. D. Schuster, M. J. Szabolcs [et al.] // Nat. Med. — 2001. — № 7. — P. 430–436.
285. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells / X. Long, M. Olszewski, W. Huang, M. Kletzel // Stem cells Dev. — 2005. — № 1. — P. 65–69.

286. Nitric oxide mediates anti-inflammatory action of extracorporeal shock waves / Ciampa A. R. [et al.] // FEBS lett. — 2005. — Vol. 579, № 30. — P. 6839–6845.
287. Optimal time for cardiomyocute transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury / R. K. Li, D. A. Mickle, R. D. Weisel [et al.] // Ann. Thorac. Surg. — 2001. — Vol. 72, № 6. — P. 1957–1963.
288. Palumbo R. Extracellular hmgpl, a signal of tissue damage, induces mesangioblast migration and proliferation / R. Palumbo // J. Cell Biol. — 2004. — Vol. 164. — P. 441–449.
289. Palumbo R. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment / R. Palumbo, M. E. Bianchi // Biochem. Pharmacol. — 2004. — № 6. — P. 1165–1170.
290. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial / T. Siminiak, D. Fiszer, O. Jerzykowska [et al.] // Eur. Heart J. — 2005. — № 26 (12). — P. 1188–1195.
291. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty: a novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation / C. A. Thompson, B. A. Nasseri, J. Makower [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. — 2003. — Vol. 41 (11). — P. 1964–1971.
292. Perin E. C. Methods of stem cell delivery in cardiac diseases / E. C. Perin, J. López // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. — Vol. 2006, № 3 (suppl 1). — S. 110–113.
293. Perin E. C. Adult stem cell therapy in perspective / E. C. Perin, Y. J. Geng, J. T. Willerson // Circulation. — 2003. — Vol. 107. — P. 935–938.
294. Peritransplant ischemic injury is associated with up regulation of SDF-1 / M. H. Yamani, N. B. Rati iff, D. J. Cook [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. — 2005. — Vol. 46, № 6. — P. 1029–1035.
295. Pfeffer M. A. Ventricular enlargement following infarction is a modifiable process / M. A. Pfeffer, E. Braunwald // Am. J. Cardiol. — 1991. — Vol. 68. — P. 127–131.
296. Pfeffer M. A. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications / M. A. Pfeffer, E. Braunwald // Circulation. — 1990. — Vol. 81. — P. 1161–1172.

297. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis / U. Laufs et al. // Circulation. — 2004. — Vol. 109. — P. 220–226.
298. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation / M. Rubart, K. B. Pasumarthi, H. Nakajima [et al.] // Circ. Res. — 2003. — Vol. 92. — P. 1217–1224.
299. Pittenger M. E. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics / M. E. Pittenger, B. J. Marin // Circ. Res. — 2004. — Vol. 95. — P. 9–20.
300. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting vegfr1 stem cells from bone-marrow microenvironment / K. Hattori [et al.] // Nat. Med. — 2002. — Vol. 8. — P. 841–849.
301. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells / K. Hattori [et al.] // Blood. — 2001. — Vol. 97. — P. 3352–3360.
302. Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells / M. Tada, A. Morizane, H. Kimura [et al.] // Dev. Dyn. — 2003. — Vol. 227, № 4. — P. 504–510.
303. Pluripotential completence of cells associated with Nanog activity / S. Y. Hatano, M. Tada, H. Kimura [et al.] // Med. Dev. — 2005. — Vol. 122. — P. 67–79.
304. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulationg factor / H. Ince, M. Petzsch, H. D. Kleine [et al.] // Circulation. — 2005. — Vol. 112. — P. 3097–3106.
305. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI) / H. Ince, M. Petzch, H. D. Kleine [et al.] // Trial. Circulation. — 2005. — Vol. 112. — P. 173–180.
306. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxia gradients through HIF-1 induction of SDF-1 / D. J. Ceradini, A. Kulkarni, M. J. Callaghan [et al.] // Nature Med. — 2004. — Vol. 10. — P. 858–864.

307. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo / E. Lagasse, H. Connors, M. Al-Dhalimy [et al.] // Nat. Med. — 2000. — Vol. 11, № 6. — P. 1229–1234.
308. Quesenberry P. Perspective: fundamental and clinical concepts on tem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond / P. Quesenberry, G. Colvin, M. Abedi // Exp. Hematol. — 2005. — Vol. 33. — P. 9–19.
309. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function / J. Muller-Ehmsen, K. L. Peterson, L. Kedes [et al.] // Circulation. — 2002. — Vol. 105. — P. 1720–1726.
310. Recovery of left ventricular function after primary angioplasty for acute myocardial infarction / T. Baks, R. J. van Geuns, E. Biagini [et al.] // Eur. Heart. J. — 2005. — Vol. 26. — P. 1070–1077.
311. Recruitment of stem cells from bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand / B. Heissig, K. Hattori, S. Dias [et al.] // Cell. — 2002. — Vol. 109. — P. 625–637.
312. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation / D. A. Taylor, B. Z. Atkins, P. Hungspreugs [et al.] // Nat. Med. — 1998. — № 4. — P. 929–933.
313. Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation / J. Thiele [et al.] // Histol. Histopathol. — 2004. — Vol. 19. — P. 201–209.
314. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells / K. A. Jackson, S. M. Majaka, H. Wang [et al.] // J. Clin. Invest. — 2001. — Vol. 107, № 1. — P. 1395–1402.
315. Reinecke H. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting / H. Reinecke, V. Poppa, C. E. Murry // J. Mol. Cell Cardiol. — 2002. — Vol. 34. — P. 241–249.
316. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR-4 positive cells to the kidney after ischemic injury / F. Togel, J. Isaac, Z. Hu [et al.] // Kidney Int. — 2005. — Vol. 65, № 5. — P. 1772–1784.
317. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans / B. E. Strauer, M. Brehm, T. Zeus [et al.] // Circulation. — 2002. — Vol. 116. — P. 1913–1918.
318. Rickey T. Statins Have Unexpected Effect on Pool of Powerful Brain Cells / T. Rickey // News room Rochester medical center. —

Jule 28, 2008. — http ://www.urmc.rochester.edu/news/story/index.cfm?id=2051.
319. Role of stem cell homing in myocardial regeneration / M. S. Penn, M. Zhang, I. Deglurkar [et al.] // Int. J. cardial. — 2004. — Vol. 95, Suppl. 1. — P. 23–25.
320. Ryden L. Treatment of congestive heart failure / L. Ryden, W. J. Remme // Eur. Heart. J. — 1999. — Vol. 20. — P. 867–871.
321. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease / S. Funchs, R. Korowski, J. Honold [et al.] // Am. J. Cardiol. — 2006. — Vol. 97, № 6. — P. 823–829.
322. Sakai T. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury / T. Sakai, R. K. Li, R. D. Weisel // Ann. Thorac. surg. — 1999. — Vol. 68. — P. 2074–2081.
323. Schwartsburd P. M. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control / P. M. Schwartsburd // Cancer and metastasis Rev. — 2003. — Vol. 22. — P. 95–102.
324. Schwartsburd P. M. Microenvironments induced ba cancer and chronic inflammation have similar effects on behavior of stem/progenitor cells: analysis of common mechanisms / P. M. Schwartsburd // Critical Rev. Oncology and hematology. — 2008 (in press).
325. Segers V. F. Stem-cell therapy for cardiac disease / V. F. Segers, R. T. Lee // Nature. — 2008. — Vol. 451. — P. 937–942.
326. Shizuru J. A. Hematopoietic stem and progenitor cells clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system / J. A. Shizuru, R. S. Negrin, I. I. Weissman // Annu Rev. Med. — 2005. — Vol. 56. — P. 509–638.
327. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendor-bone junction / C. J. Wang, F. S. Wang, K. D. Yang [et al.] // A study in rabbits. J. Orthop. Res. — 2003. — Vol. 21, № 6. — P. 984–989.
328. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates / F. D. Camargo, R. Green, Y. Capetanaki [et al.] // Nat. Med. — 2003. — Vol. 12, № 9. — P. 1520–1527.
329. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis / C. E. Murry, R. W. Wiseman, S. M. Schwartz, S. D. Hauschka // J. Clin. Invest. — 1996. — Vol. 98. — P. 2512–2523.

330. Smith A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men / A. G. Smith // Annu Rev. Cell Dev. Biol. — 2001. — № 17. — P. 435–462.
331. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function / R. K. Li, Z. Q. Jia, R. D. Weisel, F. Merante, D. A. Mickle // J. Mol. Cell Cardiol. — 1999. — Vol. 31. — P. 513–522.
332. Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts / R. Glaser et al. // Circulation. — 2002. — Vol. 106. — P. 17–19.
333. Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research / D. Solter // Nat. Rev. Genet. 2006. — № 7 (4). — P. 319–327.
334. Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation / M. Rubart, M. H. Soonpaa, H. Nakajima, L. J. Field // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 114. — P. 775–783.
335. Spontaneous human adult stem cell transformation / D. Rubio, Garcia-J. Castro, M. C. Martin [et al.] // Cancer Res. — 2005. — Vol. 65, № 8. — P. 3035–3039.
336. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction / D. M. Hodgson, A. Behfar, L. V. Zingman [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2004. — Vol. 287. — P. 471–479.
337. Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs / G. Y. Koh, M. H. Soonpaa, M. G. Klug [et al.] // J. Clin. Invest. — 1995. — Vol. 96. — P. 2034–2042.
338. Stadtfeld M. Assesing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing / M. Stadtfeld, T. Graf // Development. — 2005. — Vol. 132, № 1. — P. 203–213.
339. Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells / S. Rupp, C. Badorff, M. Koyanagi [et al.] // Basic Res. Cardiol. — 2004. — Vol. 99. — P. 61–68.
340. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart / A. Behfar, L. V. Zingman, D. M. Hodgson [et al.] // FASEB J. — 2002. — Vol. 16. — P. 1558 –1566.

341. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial / D. Zohlnhofer, I. Ott, J. Mehilli [et al.] // JAMA. — 2006. — Vol. 295. — № 9. — P. 1003–1010.
342. Stem cell mobilization induced by improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction. Result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction / R. S. Ripa, E. Jorgensen, Y. Wang [et al.] // Trial. Circulation. — 2006.
343. Stem cell therapy for the Heart / Loren E. Wold, Wangde Dai, Casilde Sesti [et al.] // Congestive heart failure. — 2004. — Vol. 10, № 6. — P. 293–301.
344. Stem cells derived cardiomyocytes demonstrate arrythmic potential / Y. M. Zhang, C. Hartzell, M. Narlow [et al.] // Circulation. — 2002. — Vol. 106, № 10. — P. 1294–1299.
345. Stem cells for myocardial regeneration / D. Orlic, J. M. Hill, A. E. Arai // Circ. Res. — 2002. — Vol. 91. — P. 1092–1102.
346. Stem cells, myocardial regeneration and methodological artifacts / P. Anversa et al. // Stem cells. — 2007. — Vol. 25. — P. 589–601.
347. Strategies for myocardial repair / G. Y. Koh, M. H. Soonpaa, M. G. Klug [et al.] // J. Interv. Cardiol. — 1995. — № 8. — P. 387–393.
348. Stromal cell-derived factor-1 plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury / J. Abbott, Y. Huang, D. Liu [et al.] // Circulation. — 2004. — Vol. 110. — P. 3300–3305.
349. Successful transplantation of fetal cardiomyoblasts into the infarcted myocardium of rat: a potential method for repair of infarcted myocardium / J. Leor, M. Patterson, M. J. Quinones [et al.] // Circulation. — 1995. — Vol. 92, Suppl. I. — P. 51–50.
350. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study / A. N. Patel, L. Geffner, R. F. Vina [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2005. — Vol. 130, № 6. — P. 1631–1638.
351. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium / J. Muller-Ehmsen, P. Whittaker, R. A. Kloner [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2002. — Vol. 34. — P. 107–116.

352. Sustained effect of autologous bone marrow mononuclear cell injection in patients with refractory angina pectoris and chronic myocardial ischemia: twelve-month follow-up results / S. Beeres, J. Bax, Dibbets P. Scheider [et al.] // Am. Heart J. — 2006. — Vol. 152, № 4. — P. 11–16.
353. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution / I. M. Barbash, P. Chouraqui, J. Baron [et al.] // Circulation. — 2003. — Vol. 108, № 7. — P. 863–868.
354. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiological and therapeutic implications / J. S. Wang, D. Shum-Tim, E. Chedrawy [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2001. — Vol. 122, № 4. — P. 699–705.
355. The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators / J. Gailit, M. J. Marches, P. P. Kew [et al.] // J. invest. Dermatol. — 2001. — Vol. 117. — P. 1113–1119.
356. The human heart: A self-renewing organ / J. Kajstura, T. Hosoda, C. Bearzi [et al.] // Clin. Translat. Sci. — 2008. — № 1. — P. 80–86.
357. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation / P. Menasché, O. Alfieri, S. Janssens [et al.] // Circulation. — 2008. — Vol. 4, № 117 (9). — P. 1189–1200.
358. Theraputic angiogenesis with intramuscular injection of low-dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor / M. Lee, M. Aoki, T. Kondo [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2005. — Vol. 25, № 12. — P. 2535–2541.
359. Topol E. J. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition: the GUSTOV randomized trial / E. J. Topol // Lancet. — 2001. — Vol. 357. — P. 1905–1914.
360. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: Pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis / M. Kucia, R. Reca, K. Miekus, J. Wanzack // Stem Cells. — 2005. — Vol. 23. — P. 879–894.
361. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction / B. Assmus, J. Honold, V. Schachinger [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2006. — Vol. 355. — P. 1222–1232.

362. Transendocardial autologous bone marrow mononuclear cell injection in ischemic heart failure: postmortem anatomicopathologic and immunohistochemical findings / H. F. Dohmann, E. C. Perin, C. M. Takiya [et al.] // Circulation. — 2005. — Vol. 112, № 4. — P. 521–526.
363. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia / S. Fuchs, R. Baffour, Y. F. Zhou [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. — 2001. — Vol. 37. — P. 1726–1732.
364. Transformation of the adult human mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells in vivo / S. Rangappa, V. G. Reddy, A. Bongso [et al.] // Cardiovasc. Engineering. Int. J. — 2002. — Vol. 2. — P. 7–14.
365. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells / S. Yuasa, Y. Itabashi, U. Koshimizu, T. Tanaka [et al.] // Nat. Biotechnol. — 2005. — Vol. 23. — P. 607–611.
366. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats / J. Y. Min, Y. Yang, K. L. Converso [et al.] // J. Appl. Physioil. — 2002. — Vol. 92. — P. 288–296.
367. Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types / D. K. Singla, T. A. Hacker, L. Ma [et al.] // J. Mol. Cell Cardiol. — 2006. — Vol. 40. — P. 195–200.
368. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? / J. Leor, M. Patterson, M. J. Quinones [et al.] // Circulation. — 1996. — Vol. 94, Suppl. 9. — P. 332–336.
369. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood / J. Jansen, S. Hanks, J. M. Thompson [et al.] // J. Cell Mol. Med. — 2005. — Vol. 9, № 1. — P. 37–50.
370. Transplantation of neonatal cardiomyocites after permanent coronary artery occlusion increases regional blood flow of infarcted myocardium / T. Reffelmann, J. S. Dow, W. Dai [et al.] // J. Mol. Celll. Cardioal. — 2003. — Vol. 35. — P. 607–613.
371. Transplantation of progenitor cells and regeneration enchancement in acute myocardial infarction. Final one-year resulsof the TOPCARE-AMI trial / V. Schachinger, B. Assmus, M. B. Britten [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. — 2004. –Vol. 44, № 8. — P. 1690–1699.
372. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularizatiion / T. Murohara, H. Ikeda, J. Duan [et al.] // J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 105. — P. 1527–1536.
373. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle / K. A. Lapidos, Y. E. Chen, J. U. Earley [et al.] // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 114. — P. 1577–1585.
374. Update on therapeutic neovascularization / Y. Cao, A. Hong, H. Schulten [et al.] // Cardiovasc. Res. — 2005. — Vol. 65. — P. 639–648.
375. Urbich C. Endotelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology / C. Urbich, S. Dimmler // Circ. Res. — 2004. — Vol. 95. — P. 343–353.
376. Urbich C. Endothelial progenitor cells functional characterization / C. Urbich, S. Dimmeler // Trends. Cardiovasc. Med. — 2004. — Vol. 14, № 8. — P. 318–322.
377. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile / M. Valgimigli, G. M. Rigolin, C. Cittanti [et al.] // Eur. Heart. J. — 2005. — Vol. 26. — P. 1838–1845.
378. Utilizang granulocyte colony-stimulating factor to enhance vascular graft endothelialization from circulating blood cells / Q. Shi, V. Bhattachrya, Wu M. Hong-De, L. R. Sauvange // Ann. Vasc. Surg. — 2002. — Vol. 16. — P. 314–320.
379. Vassilopoulos G. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion / G. Vassilopoulos, P. R. Wang, D. W. Russell // Nature. — 2003. — Vol. 422. — P. 901–904.
380. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells / T. Asahara [et al.] // EMBO J. — 1999. — Vol. 108. — Suppl.1 — P. 3964–3972.
381. Wang C. J. An overview of shock wave therapy in musculoskeletal disorders / C. J. Wang // Chang. Gung. Med. J. — 2003. — Vol. 26, № 4. — P. 220–232.

382. What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat? / E. R. Schwarz, Y. Somoano, S. L. Hale, R. A. Kloner // J. Thromb. Thrombolysis. — 2000. — № 10. — P. 181–187.
383. Wu S. M. Origins and fates of cardiovascular progenitor cells / S. M. Wu, K. R. Chien, C. Mummery // Cell. — 2008. — Vol. 132. — P. 637–643.
384. Zaki Labadidi. Stem cell therapy for myocardial regeneration / Zaki Labadidi, Nabil Dib // Stem cell therapy. — Ch. 13. — P. 149–158.
385. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial complicance / M. F. Berry, A. J. Engler, Y. J. Woo [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. — 2006. — Vol. 10, N 2. — P. 2196–2203.
386. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enchanced survival of implanted cells and angiogenesis / H. Xinyang, Yu, P. Shan, J. L. Fraser [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2008. — Vol. 135. — P. 799–808.
387. Empowering adult stem cells for myocardial regeneration / S. Mohsin, S. Siddiqi, B. Collins, M. A. Sussman // Circ. Res. — 2011. — Vol. 109, N 12. — P. 1415–1428.
388. Stem cell engraftment and survival in the ischemic heart / K. H. Wu, X. M. Mo, Z. C. Han, B. Zhou // Ann. Thorac. Surg. — 2011. — Vol. 92, N 5. — P. 1917–1925.
389. Review article: current status of myocardial regeneration: new cell sources and new strategies / S. Ragappa, R. Makkar, J. Forrester // J. of cardiovasc. Pharmac. And therapeutics. — 2010. — Vol. 15, N 5. — P. 338–343.
390. Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells / S. M. Chacko, S. Ahmed, K. Selvendiran [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2010. — Vol. 299. — N 6. — P. 1562–1570.
391. Genesis of myocardial repair with catdiac progenitor cells and tissue engineering / E. K. W. Sim, H. K. Haider, N. Lila [et al.] // Heart Aisa. — 2010. — N2. — P. 109–111.

Наукове видання

Гринь Владислав Костянтинович
Михайліченко Вячеслав Юрійович
Гнилорибов Андрій Михайлович
Попандопуло Андрій Геннадійович
Естрін Сергій Ігорович

КЛІТИННА КАРДІОМІОПЛАСТИКА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНФАРКТІ МІОКАРДУ

Монографія

Російською мовою

Технічний редактор *Д. В. Акіндєєв*

Підписано до друку 27.06.2014 р.
Формат 60x84/16. Папір офсетний.
Гарнітура «Newton C». Друк — лазерний.
Ум. друк. арк. 14,42. Обл.-вид. арк. 12,35.
Наклад 300 прим. Зам. № 039.

Видавництво та друк ТОВ «Юго-Восток, Лтд».
83001, Донецьк, вул. Р. Люксембург, 2б, оф. 211.
Тел./факс: (062) 305-50-13; www.yugo-vostok.com.ua
e-mail: zakaz@yugo-vostok.com.ua; dakindeev@yandex.ru
Свідоцтво про держреєстрацію:
серія ДК №1224 від 10.02.2003 р.

Гринь В. К.

Г85 Клеточная кардиомиопластика при экспериментальном инфаркте миокарда : монография / [В. К. Гринь, В. Ю. Михайличенко, А. М. Гнилорыбов и др.]. — Донецк : Юго-Восток, 2014. — 248 с.

ISBN 978-966-374-811-5

Монография посвящена изогенной клеточной кардиомиопластике при инфаркте миокарда в эксперименте и сравнительному анализу эффективности применения эмбриональных, мезенхимальных и комитированных мезенхимальных стволовых клеток и введению гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Аутологичные мезенхимальные стволовые клетки выступают в роли индуктора процессов регенерации и ремоделировании поврежденного миокарда, обеспечивая репаративный морфогенез и повышение адаптационных резервов жизнеспособного миокарда.

Для патофизиологов, трансплантологов, кардиологов, кардиохирургов, врачей общей практики, врачей-интернов и студентов высших медицинских заведений.

УДК 616.127-005.8.001.53
ББК Р457.345.1в615