



УДК 616.1:615.273.2

В. М. Запорожан, О. Л. Холодкова, Д. М. Пихтєєв,
М. М. Перепелюк, А. Л. Щербатюк, О. А. Кулєшова

ЦИТОКІНОВА ТЕРАПІЯ ГРАНУЛОЦИТАРНИМ КОЛОНІЄСТИМУЛЮЮЧИМ ФАКТОРОМ І РЕКОМБІНАНТНИМ ЕРИТРОПОЕТИНОМ ЯК АЛЬТЕРНАТИВНА СТРАТЕГІЯ ПРИ НЕКОРОНАРОГЕННІЙ КАРДІОМІОПАТІЇ

Одеський державний медичний університет

Вступ

Серцеві хвороби сучасної цивілізації, тобто есенціальна гіпертензія, атеросклероз і його ускладнення, цукровий діабет тощо, сучасною медициною контролюються вельми успішно [1; 2].

Здобутки у сфері лікування некоронарогенних захворювань міокарда, насамперед кардіоміопатій, не такі значні. Арсенал типових «серцевих» препаратів є недостатнім для лікування хворих із кардіоміопатіями.

Розв'язання цього завдання може стати реальністю вже у найближчій перспективі на ґрунті об'єднання нових наукових досліджень і даних першого клінічного досвіду в розвитку альтернативних терапевтичних стратегій, а саме застосування гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (Гр-КСФ) і рекомбінантного еритропоетину (рЕПО).

Вивчення негематологічних ефектів Гр-КСФ почалося з досліджень групи під керівництвом D. Orlic, яка продемонструвала значний ефект цитокіно-

вої мобілізації у мишей з індукованим інфарктом міокарда [3].

Виконано кілька клінічних досліджень у хворих як з інфарктом міокарда [4], так і зі стабільною стенокардією [5] та серцевою недостатністю різного генезу [6], спрямованих на вивчення ефективності та безпеки Гр-КСФ.

Спроби застосування рЕПО в кардіології пояснюються наявністю багатьох «негематологічних» ефектів. Він блокує апоптоз ендотелію, сприяє зменшенню гіпертрофії лівого шлуночка, оптимізує ремоделювання лівого шлуночка у хворих на інфаркт міокарда та хронічну серцеву недостатність [7–10].

Застосування рЕПО у щурів із доксорубіциніндукованою кардіоміопатією підвищувало скоротливість міокарда, а також зменшувало летальність серед піддослідних тварин [8]. У рЕПО-лікованих щурів утричі, порівняно з нелікованими, підвищився рівень ендотеліальних прогеніторних клітин крові. Було помічено, що максимальний регенеративний ефект рЕПО реалізувався як на рівні скоротли-

вих елементів, так і на рівні строми з судинами. Вираженість регенерації зменшується зі зростанням часу від початку дії міокардотравмуючого фактора до початку використання рЕПО.

Однак слід пам'ятати про певні обмеження, які потребують обережності у дозуванні рЕПО. Це, по-перше, активація ренін-ангіотензинової системи, тобто ініціація чи обтяження артеріальної гіпертензії — найчастіші побічні прояви рЕПО [12]. Рідше виникають тромбози, можливі загострення проліферативної діабетичної ретинопатії, активація онкогенезу за рахунок індукції ангиогенезу [9]. Також доведено, що рЕПО може виступати як фактор автокринної регуляції неопластично налаштованих тканин [10].

Узагальнюючи літературні дані, ми визначили мету нашого дослідження як з'ясування можливості застосування Гр-КСФ (Граноцит) і рЕПО (Рекормон) для відновлення структурно-функціонального стану серця за умов експериментально індукованої кардіоміопатії.



Наше дослідження проводилось у два етапи — спочатку вивчалися ефекти Гр-КСФ, а потім — рЕПО.

Матеріали та методи дослідження першого етапу

На статевозрілих мишах-самцях моделювали адрібластину (АК) двократним введенням розчину адрібластину. Ін'єкції здійснювали внутрішньочеревинно, з інтервалом 7 днів, разова доза адрібластину — 5 мг/кг. На 7-й день після другої ін'єкції адрібластину починали підшкірне введення Гр-КСФ разовою дозою 100 мг/кг протягом 3 днів. Група активного контролю замість Гр-КСФ отримувала дистильовану воду підшкірно. Пасивний контроль отримував дистильовану воду і замість адрібластину, і замість Гр-КСФ. Схема експерименту подана у табл. 1.

Результати дослідження та обговорення першого етапу

Гістологічне дослідження показало ознаки кардіоміопатії у тварин I та II груп: більшість клітин знаходилася у стані зернистої дистрофії, виявлялися ознаки вакуольної дегенерації, великі ділянки лізованої м'язової тканини заміщалися сполучною. При обстеженні у схрещених поляризаторах знайдені субсегментарні та сегментарні контрактурні ушкодження II та III ступенів у всій досліджуваній тканині [11].

При цьому у мишей I групи кількість змінених кардіоміоцитів була на 30–50 % меншою, ніж у II (активний контроль), вираженість контрактурних ушкоджень також була меншою. За допомогою електрокардіографії з реєстрацією потенціалів від кінцівок виявлено прояви внутрішньощлуночкової блокади та порушення процесів реполяризації в усіх мишей на фоні збільшення частоти серцевих скорочень у контрольній групі. У дослідній групі (тобто після введення Гр-КСФ) спостерігалася виражена позитивна динаміка процесів реполяризації та вірогідно зменшувалася частота серцевих скорочень порівняно з групою активного контролю [11–12].

Ми також досліджували часозалежний ефект Гр-КСФ на тій же моделі АК. Мишам I групи підшкірно вводили Гр-КСФ дозою 100 мкг/кг паралельно з внутрішньочеревинним введенням адрібластину, мишам II групи — через 7 днів після ін'єкції адрібластину. Морфологічні зміни оцінювали імуногістохімічно (Actin, Collagen II, Troponin T) і шляхом поляризаційної мікроскопії; виконувалася морфометрія. Протективна дія Гр-КСФ на регенераторно-пластичні процеси в міокарді була найбільш вираженою у I групі (раннє введення Гр-КСФ).

Дія Гр-КСФ реалізується, скоріше за все, через модифікацію «цитокінового коктейлю» з інгібуванням прозапальних суб-

станцій. Що раніше після ушкодження міокарда застосовано Гр-КСФ, то менший об'єм міокарда зазнає необоротних змін.

Таким чином, можна вважати, що Гр-КСФ позитивно впливає на серцевий м'яз за умов розвитку кардіоміопатії. Проте можливість його широкого застосування потребує вивчення впливу на гомеостаз і морфофункціональний стан внутрішніх органів, обрання оптимальної дози та кратності введення препарату.

Другим етапом нашого дослідження було вивчення регенеративно-протективних ефектів рЕПО щодо некоронарогенної кардіоміопатії.

Матеріали та методи дослідження другого етапу

У 58 статевозрілих самців мишей лінії ICR масою 28–32 г, які знаходились у стандартних умовах віварію, індукували АК (див. матеріали та методи першого етапу). Усі тварини були розподілені на 6 груп: 4 експериментальні та 2 контрольні. Схема експерименту подана в табл. 2.

Виведення тварин з експерименту проводилося під легкою ефірною анестезією шляхом дислокації шийних хребців. Виділені серця фіксували в 10%-му нейтральному розчині формаліну. Через добу вирізували блоки тканини завтовшки 0,5 см, проводили через спирти зростаючої концентрації, за-

Таблиця 1

Експеримент з дослідження ефектів гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора у мишей з адрібластиною кардіоміопатією

День експерименту	Група		
	I — дослідна, n=12	II — активний контроль, n=12	III — пасивний контроль, n=10
1-й	Адрібластин, 5 мг/кг, в/о	Адрібластин, 5 мг/кг, в/о	Дист. вода, 0,5 мл, в/о
7-й	Адрібластин, 5 мг/кг, в/о	Адрібластин, 5 мг/кг, в/о	Дист. вода, 0,5 мл, в/о
14-й	Гр-КСФ, 100 мкг/кг, п/ш	Дист. вода, 0,15 мл, п/ш	Дист. вода, 0,15 мл, п/ш
15-й	Гр-КСФ, 100 мкг/кг, п/ш	Дист. вода, 0,15 мл, п/ш	Дист. вода, 0,15 мл, п/ш
16-й	Гр-КСФ, 100 мкг/кг, п/ш	Дист. вода, 0,15 мл, п/ш	Дист. вода, 0,15 мл, п/ш
24-й	Забій	Забій	Забій

Примітка. У табл. 1–2: дист. вода — дистильована вода; в/о — внутрішньочеревинно; п/ш — підшкірно.



**Схема експерименту з дослідження ефектів
рекомбінантного еритропоєтину
у мишей з адрибластиною кардіоміопатією**

День експерименту	Група					
	I, n=10	II, n=10	III, n=10	IV, n=10	контроль I–II, n=8	контроль III–IV, n=8
1-й	Адрибластин, 5 мг/кг, в/о	Адрибластин, 5 мг/кг, в/о	рЕПО, п/ш, 50 МО/тварину	рЕПО, п/ш, 25 МО/тварину	Дист. вода, 0,5 мл, в/о	Дист. вода, 0,15 мл, п/ш
3-й			рЕПО, п/ш, 50 МО/тварину	рЕПО, п/ш, 25 МО/тварину		Дист. вода, 0,15 мл, п/ш
7-й	Адрибластин, 5 мг/кг, в/о	Адрибластин, 5 мг/кг, в/о	Адрибластин, 5 мг/кг, в/о	Адрибластин, 5 мг/кг, в/о	Дист. вода, 0,5 мл, в/о	Дист. вода, 0,5 мл, в/о
10-й	рЕПО, п/ш, 50 МО/тварину	рЕПО, п/ш, 25 МО/тварину			Дист. вода, 0,15 мл, п/ш	
12-й	рЕПО, п/ш, 50 МО/тварину	рЕПО, п/ш, 25 МО/тварину			Дист. вода, 0,15 мл, п/ш	
14-й			Адрибластин, 5 мг/кг, в/о	Адрибластин, 5 мг/кг, в/о		Дист. вода, 0,5 мл, в/о
20-й	Забій	Забій	Забій	Забій	Забій	Забій

ливали у парафін за загально-прийнятою методикою. З отриманих парафінових блоків виготовляли мікротомні зрізи завтовшки 3–5 мкм, забарвлювали гематоксиліном і еозином, за Ван-Гізеном, проводили PAS-реакцію, виявляли ретикулінові волокна метенаміном срібла. Отримані препарати досліджували за допомогою звичайної та поляризаційної мікроскопії з використанням світлового мікроскопа “Leica DMLS”. Методами світлової мікроскопії в серці оцінювали стан кардіоміоцитів і сполучної тканини. Контрактурні ушкодження кардіоміоцитів оцінювали методами поляризаційної мікроскопії.

Результати дослідження та обговорення другого етапу

При морфологічному дослідженні міокарда тварин, яким вводили рЕПО і в яких була заздалегідь сформована АК (I і II групи, див. табл. 2), було виявлено таке: не спостерігалось набрякості стромального компонента міокарда, кількість колагену була значно меншою, ніж у групі тварин, яким

рЕПО не вводили; відмінності між субендокардіальними та субепікардіальними ділянками значно згладжені. При введенні рЕПО в міокарді починають переважати десмолітичні процеси в стромі при зростаючій ролі внутрішньоклітинної регенерації міокарда, яка призводить до редукції фіброзної тканини.

Можна припустити, що в даному випадку наявне посилення активності системи колагенолітичних ферментів із репаруючих кардіоміоцитів, яка була активована введенням рЕПО. При цьому помічено, що десмолітична реакція стромі відбувається без помітного розмноження стромальних клітинних елементів.

Таким чином, рЕПО дозою 50–100 МО/кг у мишей зі сформованою АК приводить до посилення стромально-паренхіматозної взаємодії в міокарді, нормалізації метаболічних особливостей кардіоміоцитів, вираженої внутрішньоклітинної репарації кардіоміоцитів.

У результаті морфологічного дослідження міокарда III–IV груп тварин (розподіл на групи — див. табл. 2) було виявлено, що набрякості стромаль-

ного компонента виражена досить різко, проте характеризується значною вогницевістю даного процесу. Основними морфологічними видами ураження кардіоміоцитів є білкова (зерниста) дистрофія, що призводить до зернисто-глибчастого розпаду м'язових сегментів. Водночас досить часто спостерігається розбухання м'язових сегментів, втрата ними своєї фібрилярності. Контрактурні ушкодження кардіоміоцитів характерні для всіх шарів стінки, проте частіше виявляються в середньому шарі міокарда. Крім того, спостерігається порушення ламінарності розподілу волокон міокарда, особливо у середньому шарі. Виявлена наявність дрібних скупчень клітин гістіоцитарно-макрофагальної природи, що формують окремі вузлики. Усі зміни в міокарді мають дифузний характер розподілу по шарах стінки міокарда, безумовно, з більшою інтактністю середнього шару.

Особливістю даних груп тварин була наявність кровоносних капілярів, заповнених еритроцитами, що часто знаходилися в стані «сладж-феномена». У цілому, морфологічна карти-



на характеризується як порушення мікроциркуляції кровоносного русла.

Загалом, превентивне застосування рЕПО дозою 50–100 МО/кг (тобто перед введенням адрибластину) індукує мозаїчний характер патологічних змін у кардіоміоцитах, що відображається в їх структурно-метаболичній гетерогенності. Одночасно спостерігається кілька типів ушкоджень. Один із них пов'язаний з контрактуєю міофібрил, інший — із лізисом міофібрилярного апарату і порушенням у системі мікроциркуляції крові в міокарді.

У тварин контрольних груп (див. табл. 2) зміни у міокарді не виявлялися.

Висновки

Таким чином, результати наших досліджень дозволяють зробити такі загальні висновки:

1) трикратне застосування Гр-КСФ сумарною дозою 300 мкг/кг на фоні сформованої АК індукує регенеративно-пластичні процеси в міокарді; використання Гр-КСФ одночасно з адрибластином сприяє більш ранній і вираженій регенерації міокарда;

2) двократне застосування рЕПО сумарною дозою 50–100 МО/кг у мишей зі сформованою АК приводить до посилення стромально-паренхіматозної взаємодії в міокарді, нормалізації метаболізму кардіоміоцитів, їх активної внутрішньоклітинної репарації; превентивне застосування рЕПО тими же дозами погіршує стан міокарда, насамперед, за рахунок утворення контрактур міофібрил і лізису міофібрилярного апарату, а також унаслідок порушень у системі мікроциркуляції в міокарді;

3) отримані дані дозволяють вважати корекцію цитокинами, що вивчалися, можливою альтернативою існуючим методам лікування некоронарогенної кардіоміопатії.

Перспектива подальших досліджень. Експерименталь-

но перевірити ефекти досліджуваних цитокинів за умов:

1) розширення діапазону доз Гр-КСФ як у бік зменшення (сумарна доза — 100 мкг/кг), так і збільшення (сумарна доза — 600 мкг/кг) у мишей із АК;

2) збільшення кратності й тривалості введення рЕПО мишам із АК без зміни сумарної дози (100 МО/кг).

Крім того, доцільним є експериментальне обґрунтування можливості застосування при АК рекомбінантного інтерлейкіну-2 й індукторів інтерферону.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Okrainec K.* Coronary artery disease in the developing world / K. Okrainec, D. K. Banerjee, M. J. Eisenberg // *Am. Heart J.* — 2004. — Vol. 148, N 1. — P. 7-15.

2. *2007 guidelines for the management of Arterial Hypertension ESC/ESH* // *J. Hypertens.* — 2007. — Vol. 25. — P. 1105-1187.

3. *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival* / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti [et al.] // *PNAS.* — 2001. — Vol. 98. — P. 10344-10349.

4. *Kang H.-J.* Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial / H.-J. Kang, H.-S. Kim, S.-Y. Hang // *Lancet.* — 2004. — Vol. 363. — P. 751-756.

5. *Hill J. M.* Efficacy and Risk of Granulocyte Colony Stimulating Factor Administration in Patients with Severe Coronary Artery Disease / J. M. Hill, J. D. Paul, T. M. Powell // *Circulation.* — 2003. — Vol. 108 (Suppl. IV). — P. 478.

6. *Мобилизация стволовых клеток костного мозга в лечении больных с сердечной недостаточностью. Протокол и первые результаты исследования РОТ ФРОНТ (РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ в лечении БОЛЬНЫХ с хронической сердечной недостаточностью)* / Ю. Н. Беленков, Ф. Т. Агеев, В. Ю. Мареев, В. Г. Савченко // *Кардиология.* — 2003. — Т. 43, № 3. — P. 7-12.

7. *The cardiovascular effects of erythropoietin* / K. J. Smith, A. J. Bleyer, W. C. Little, D. C. Sane // *Cardiovasc Res.* — 2003. — Vol. 59, N 3. — P. 538-548.

8. *Hamed S.* Erythropoietin improves myocardial performance in doxorubicin-induced cardiomyopathy / S. Hamed, I. Barshack, G. Luboshits // *European Heart Journal.* — 2006. — Vol. 27, N 15. — P. 1876-1883.

9. *Hardee M. E.* Erythropoietin Blockade Inhibits the Induction of Tumor Angiogenesis and Progression / M. E. Hardee, Y. Cao, P. Fu // *PLoS ONE.* — 2007. — Vol. 2, N 6. — P. 549.

10. *Kumar M. Suresh.* Functional Erythropoietin Autocrine Loop in Melanoma / Kumar M. Suresh, Geza Acs, Dong Fang // *Am. J. Pathol.* — 2005. — Vol. 166, N 3. — P. 823-830.

11. *Granulocyte-colony stimulating factor usage in regeneration of dystrophic myocardium* / V. Zaporozhan, N. Perepelyuk, E. Kholodkova, D. Pykhtyeyev // *The International Journal of Artificial Organs.* — 2005. — Vol. 28, N 4. — P. 354.

12. *Experimental substantiation of the use of cellular technologies in the regeneration of myocardium* / V. N. Zaporozhan, E. L. Kholodkova, N. N. Perepelyuk, D. M. Pykhtyeyev // *The International Journal of Artificial Organs.* — 2005. — Vol. 28, N 9. — P. 935.

