

Distribuce autologních značených mononukleárních buněk kostní dřeně v postischemickém myokardu (*ex vivo* model králičího srdce)*

Peter Scheer[■], Martin Klabusay[■], Kristína Řeháková, Michael Doubek*,
Leoš Křen**, Stanislav Palša*, Jaroslava Beránková, Drahomír Horký***,
Jiří Mayer****, Jaroslav Meluzín****, Jaroslav Doubek

Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,

*Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie, Interní-hematoonkologická klinika,

Ústav patologie, Fakultní nemocnice Brno, *Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity,

****Interní-hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno, *****I. interní-kardioangiologická klinika,
Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno, Česká republika

Scheer P, Klabusay M*, Řeháková K, Doubek M*, Křen L**, Palša S*, Beránková J, Horký D***, Mayer J****, Meluzín J****, Doubek J (Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, *Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie, Interní-hematoonkologická klinika, **Ústav patologie, Fakultní nemocnice Brno, ***Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, ****Interní-hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno, Česká republika). **Distribuce autologních značených mononukleárních buněk kostní dřeně v postischemickém myokardu (*ex vivo* model králičího srdce).** *Cor Vasa* 2006;48(10):334–339.

Studium buněčné terapie infarktu myokardu (IM) vyžaduje model s ideálně ischemickým poškozením a intraluminální aplikací buněk.

Cíl práce: Vyvolat subletální IM u králíka, ověřit schopnost železem značených mononukleárních buněk kostní dřeně (MKD) migrovat do poškozeného myokardu a zhodnotit krátkodobou distribuci podaných buněk v postižené levé komoře při intraluminálním podání.

Materiál a metody: Subletální IM byl navozen u 14 králíků 18hodinovou ligací diagonální větve ramus interventricularis anterior (výkon *in vivo*). Pro studium distribuce MKD byl v další fázi použit model izolovaného srdce s perfuzí Krebsova-Henseleitova roztoku podle Langendorfa (výkon *ex vivo*). Do koronárního oběhu bylo v průběhu 4 min aplikováno 1,48 milionu MKD. Izolovaná srdce byla rozdělena do 4 skupin: kontrolní skupina (K, n = 4) – srdce bez infarktu s 10minutovou periodou perfuze po aplikaci MKD; skupina P1 (n = 4) s perfuzí po aplikaci 2 min, skupina P2 (n = 6) s perfuzí po aplikaci 10 min; skupina P3 (n = 4) s perfuzí 25 min. Po ukončení perfuze byl myokard levé komory histologicky vyšetřen v místě nad ligací (nl) a v místě pod ligací (l). V histologických řezech byly semikvantitativně stanoveny počty MKD v 15 náhodných zorných polích v cévách (C), intersticiu myokardu (M) a celkem (C + M). Výsledky jsou uváděny jako medián (min; max).

Výsledky: Medián (minimum; maximum) počtu detekovaných MKD ve skupině K [nl = 0,5 (0; 1); l = 1 (0; 2)] a P1 [nl = 2 (1; 2), l = 1 (0; 3)] byl v infarktových zónách signifikantně nižší než ve skupinách P2 [nl = 1,5 (0; 18), l = 27 (19; 37)] a P3 [nl = 11 (0; 19), l = 22 (18; 25)]. V intersticiu, cévách a celkem z míst nad ligací nebyl rozdíl mezi počty detekovaných MKD v jednotlivých skupinách (K, P1, P2, P3) kromě srovnání C + M u P3 vs. K (p = 0,019) a P3 vs. P1 (p = 0,019). V infarktových ložiscích (l) byly signifikantní rozdíly mezi K vs. P2 – C (p = 0,009), M (p = 0,020) a C + M (p = 0,010); K vs. P3 – C (p = 0,018), M (p = 0,032), C + M (p = 0,020).

Závěr: Infarkt myokardu se podařilo vyvolat u všech zvířat v rozsahu, který dovoľoval posouzení migrace aplikovaných MKD. Mononukleáry KD značené nanopartikulemi železa prokázaly schopnost migrace do intersticia myokardu se signifikantně vyšší afinitou k infarktem poškozené tkáni.

Klíčová slova: Infarkt myokardu – Kmenové buňky – Značení železem – Zvířecí model – Králík

Scheer P, Klabusay M*, Řeháková K, Doubek M*, Křen L**, Palša S*, Beránková J, Horký D***, Mayer J****, Meluzín J****, Doubek J (Department of Physiology, Veterinary and Pharmaceutical University Brno, *Laboratory of Flow Cytometry and Cell Therapy, Department of Internal Medicine and Hematooncology, **Department of Pathology, Faculty Hospital Brno ***Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, ****Department of Internal Medicine and Hematooncology, Faculty Hospital Brno, *****Department of Internal Medicine/Cardiology/Angiology,

*Práce byla podpořena grantem IGA VFU 37/2004/FVL a grantem IGA MZ ČR č. NR8003-3/2004.

■ Autoři se podíleli na práci stejným dílem.

Background/aims: Experiments in stem cell treatment of myocardial infarction (MI) require a model with ideally ischemic lesion and intravascular application of cells. The goal of our trial was to induce sub-lethal MI in rabbit to prove the ability of iron labeled mononuclear cells (IL-MNC) from bone marrow to migrate into the injured myocardium and to evaluate the short-term distribution of intravascularly administered cells in the damaged left ventricle.

Material and methods: Sub-lethal MI was induced successfully in 14 rabbits using 18-hour ligation of diagonal branches of the left anterior descending coronary artery (*in vivo* interposition). For study of distribution of transplanted IL-MNC, we used a model of isolated heart with perfusion according to Langendorf (*ex vivo* interposition). A total of 1.48 million of IL-MNC were administered into the coronary arteries of each rabbit over 4 minutes. Isolated hearts were divided into 4 groups: control group K (n = 4), where IM was not induced and 10-minute perfusion with isotonic Krebs-Henseleit solution was applied after IL-MNC infusion, group P1 (n = 4) with 2-minute perfusion, P2 (n = 6) with 10-minute perfusion, and P3 (n = 4) with 25-minute perfusion. Myocardial histology was performed after perfusion from MI zones (I) and non-MI zones (nI). Numbers of IL-MNC in the histological slides were determined semi-quantitatively from 15 randomized viewing fields in vessels (V), myocardial interstitial tissue (MIT), and altogether (T).

Results: Median (min, max) of numbers of detected IL-MNC from MI zones in groups K [nI = 0,5 (0.1), I = 1 (0.2)] and P1 [nI = 2 (1.2), I = 1 (0.3)] were significantly lower when compared with groups P2 [nI = 1.5 (0.18), I = 27 (19.37)] and P3 [nI = 11 (0.19), I = 22 (18.25)]. There were no significant differences in non-MI zones in comparison of IL-MNC numbers in vessels and myocardium among all groups (K, P1, P2, P3), except of comparison of total cell number in P3 vs. K ($p = 0.019$) and P3 vs. P1 ($p = 0.019$). In MI zones, significantly more cells were intercepted in group P2 vs. controls (V $p = 0.009$, MIT $p = 0.020$ and T $p = 0.010$) and in group P3 vs. controls (V $p = 0.018$, MIT $p = 0.032$, T $p = 0.020$).

Conclusion: In all animals, we successfully induced MI to an extent allowing analysis of IL-MNC migration. Iron-labeled mononuclear cells from bone marrow were able to migrate into myocardial interstitial space with significantly enhanced affinity to injured tissue.

Key words: Myocardial infarction – Stem cells – Iron labeling – Animal model – Rabbit

Adresa: MVDr. Peter Scheer, Ph.D., Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika, e-mail: scheerp@vfu.cz

ÚVOD

Transplantace buněk kostní dřeně je v klinické hematologii využívána více než čtyřicet let. První formulace koncepce kmenových buněk a jejich role v hematopoeze byla prezentována Maximovem dokonce již v roce 1906. Postupem času byly mimo kostní dřev objeveny a využívány další zdroje krvetvorných kmenových buněk: periferní a pupečnicková krev. Avšak teprve objevy z posledních let, související s výzkumem embryonálních i somatických kmenových buněk, iniciovaly zvýšený zájem o jejich biologii a uplatnění v terapii primárně nehematologických patologických procesů a nemocí. Za impuls lze považovat poznatek, že u mužů, kteří podstoupili transplantaci srdce od dárce ženy, byl v myokardu detekován buněčný chimérismus.⁽¹⁾ Současně bylo zpochybněno dogma, podle kterého měly být somatické kmenové buňky schopné diferenciaci pouze v linii buněk s morfologickými znaky a specializovanou funkcí tkáně, ve které se nacházejí.

Pokroky v léčbě infarktu myokardu (IM) i přes urgentní obnovení perfuze angioplastikou nebo konvenční medikamentózní terapií zatím stále nedokážou nahradit zaniklé buňky myokardu vzhledem k výrazně limitované schopnosti regenerace myokardu. Proto je experimentální koncepce založená na buněčné terapii infarktu myokardu tak atraktivní pro studium.

CÍL PRÁCE

Vzhledem k perspektivě pokračování experimentu na modelu *in vivo* zvolili jsme jako modelové zvíře králíka, tj. zvíře s dostatečnou velikostí na neinvazivní vyšetření (zejména echokardiografie, sériové odběry krve) a technickou proveditelností chirurgických výkonů na srdci. Z těchto důvodů bylo cílem práce:

- indukovat subletální IM u králíka ligací větve 2. řádu levé koronární tepny,
- sledovat přestup značených mononukleárních buněk KD z cévního řečiště do intersticiálního prostoru myokardu,
- hodnotit krátkodobé distribuce podaných mononukleárů v postižené levé komoře.

MATERIÁL A METODY

Pokusná zvířata

Bylo použito 30 králíků plemene Hy-Plus, samčího pohlaví, v hmotnostní kategorii 2,5–3,5 kg, z monitorovaného produkčního chovu (Ing. V. Pokorný, fa Malešovice, CZ). Experimentům předcházelo 7denní adaptační období. Zachován byl přirozený světelný režim. V adaptačním i pokusném období byl denně klinicky kontrolován zdravotní stav. Před vlastním zařazením do experimentu bylo u všech králíků provedeno echokardiografické vyšetření pro odhalení subklinických abnormalit a získání fyziologického rozmezí hodnot pro plánované pozdější experimenty *in vivo*.

Pokusní jedinci byli rozděleni do 4 skupin:

Skupina K (n = 4, kontrola) bez indukce IM, pouze s aplikací železem značených mononukleárních buněk kostní dřeně (MKD), s 10minutovou perfuzí.

Pro indukci infarktu myokardu bylo použito 26 králíků. Do vlastního modelu *ex vivo* bylo zařazeno vzhledem k mortalitě při vyvolání IM 14 zvířat (skupiny P1, P2, P3).

Skupina P1 (n = 4): indukovaný IM, aplikace MKD, 2minutová perfuze po vlastní aplikaci. Skupina P2 (n = 6): indukovaný IM, aplikace MKD, 10minutová perfuze po vlastní aplikaci. Skupina P3 (n = 4): indukovaný IM, aplikace MKD, 25minutová perfuze po vlastní aplikaci.

Pokus byl proveden v souladu se zákonem číslo 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

Odběr kostní dřeně

Odběr vzorku kostní dřeně byl proveden 21 dní před indukci IM u zvířat v celkové anestezii. Po premedikaci (i. v. pentazocin 3 mg/kg živé hmotnosti (ž. h.) + xylazin 5 mg/kg ž. h.) následovala standardní příprava pro odběr (depilace, dezinfekce). Po 5 minutách byla rychle aplikována polovina vypočítané dávky ketaminu (35 mg/kg ž. h.). Jeho další aplikace (čtvrtinová dávka) byla indikována podle klinického stavu s cílem dosáhnout nulovou obrannou reakci na aspiraci kostní dřeně. Odběr byl proveden asepticky z tuber ischiadicum pomocí jehly 18G do stříkačky předplněné 0,1 ml roztoku heparin : fyziologický roztok (1 : 1).

Separace, kultivace a značení mononukleárních buněk kostní dřeně nanočásticemi Fe

Aspiráty kostní dřeně byly zpracovány metodou centrifugace na hustotním gradientu (Histopaque 1077). Mononukleární buňky byly kultivovány 14–21 dní v médiu „cell-free“ pro hematopoetické buňky (H 3000, Stem Cell Technologies, Canada) s nanočásticemi oxidu železa (Resovist, Schering, Německo). V den implantace byly buňky odebrány z kultivace, propláchnuty a resuspendovány v Hanksově roztoku se 4% albuminem. Před aplikací do koronárních arterií byly buňky přefiltrovány přes nylonový filtr 70 μ m a byl odebrán vzorek k analýze počtu buněk.

Histologické vyšetření

Místem odběru vzorku pro histologické vyšetření byla svalovina levé komory nad zdravým myokardem a pod místem ligace (ložisko IM). Řez byl veden asi 0,5 cm nad místem ligace, resp. pod ním. V kontrolní skupině se odebírala svalovina z báze a srdečního hrotu. Od každého králíka byly tedy posuzovány dva vzorky. Zpracování vzorků bylo provedeno standardním způsobem zalitím do parafinu. Parafinové řezy byly po odvodnění barveny hematoxylinem-eozinem (HE) a turnbullovou modří. Zpracování vzorků bylo provedeno v Brně, v Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty.

Semikvantitativnímu hodnocení počtu značných buněk v řezu byly z důvodu snadnější identifikace podrobeny pouze preparáty barvené na přítomnost železa (turnbullovou modří). Při meandrovitém způsobu prohlížení bylo hodnoceno každé druhé zorné pole (ZP) při zvětšení 400 \times . Celkový počet vyhodnocených ZP na jeden vzorek byl 15. Jako pozitivní nález byla hodnocena každá železem značená buňka, resp. ložisko velikostí, tvarem a intenzitou zabarvení odpovídající takovéto buňce. V každém ZP byly zvlášť počítané buňky v cévách a zvlášť buňky vycestované do tkáně.

Indukce infarktu myokardu

Vzhledem k plánovanému chirurgickému výkonu byla tři dny před indukci infarktu provedena s. c. aplikace enrofloxacinu (5 mg/kg ž. h.). Králíci byli nejprve uvedeni do celkové anestezie i. m. aplikací diazepam (0,5 mg/kg ž. h.) v kombinaci s xylazinem (5 mg/kg ž. h.)

a ketaminem (35 mg/kg ž. h.). Anestezie byla průběžně udržována podle klinického stavu re aplikací ketaminu v původní nebo poloviční dávce.

K operativnímu výkonu byl zvolen levostranný přístup. Preparace po vrstvách s provedením thorakotomie byla provedena v 3. interkostálním prostoru. Pro indukci infarktu myokardu byl ligován podle aktuálních anatomických poměrů ramus proximalis ventriculi sinistri (RPVS), jako první ventrální větev ramus circumflexus a. coronariae sinistrae, nebo častěji ramus collateralis distalis, jako druhá horizontální větev ramus interventricularis paraconalis (u lidí RIA) a. coronariae sinistrae. Cílem bylo ischemizovat hrot levé komory ligací dominantní větve zásobující tuto oblast. Podvaz byl ponechán *in situ* do následujícího dne. Dutina hrudní byla uzavřena standardním způsobem apozicí svalových vrstev s následným odstraněním pneumothoraxu. Celková doba výkonu nepřekročila 60 min včetně premedikace.

Extrakce a perfuze izolovaného srdce podle Langendorfa

Po uplynutí 18–24 hodin od indukce IM, byla u králíků navozena celková anestezie respektující výše popsany protokol. Po uvedení do tolerančního stadia anestezie následovala eutanázie předávkováním anestetik (X + K) další plnou iniciální dávkou, aplikovanou i. v. Při dosažení zástavy dechu byla urgentně provedena sternotomie a srdce bylo odděleno od velkých cév. Izolovaný orgán byl ihned uložen v ledové tříšti fyziologického roztoku NaCl a srdce bylo fixováno na kanylu umístěnou v aortě a následně připojeno k perfuznímu systému. Celková doba studené ischemie trvala maximálně 5 minut, doba teplé ischemie nejvýše jednu minutu. Následovala perfuze izolovaného srdce podle Langendorfa. Obsah kolony, ke které bylo srdce fixováno, byl tvořen Krebsovým-Henseleitovým roztokem s albuminem syčným směsí O₂/CO₂ 95 : 5. Teplota v koloně se udržovala v rozmezí 37–38 °C, výška vodního sloupce byla udržována na hodnotě 80 cm. Po stabilizaci zavěšeného preparátu *ex vivo*, která trvala 15 minut, následovalo odstranění ligace koronární tepny a následovala další 5minutová perfuze.

Aplikace autologních mononukleárních buněk kostní dřeně

Suspenze železem značených mononukleárních buněk KD se podávala pomocí katetru přes trojcestný ventil. Průměrný počet buněk 1 480 000 v objemu 1,8 ml byl aplikován frakcionovaně po dobu zhruba 4 min. Spontánní perfuze byla ukončena za 2 min (skupina P1), 10 min (skupiny P2 a K) a 25 min (skupina P3). Následovala 5minutová intravazální fixace srdce 2,5% roztokem glutaraldehydu v objemu 20 ml. Odebrané vzorky svaloviny byly rutinně zpracovány metodou histologických řezů (viz výše).

Statistická analýza

Ke statistickému zpracování výsledků byl využit program SPSS 14.0. Výsledky počtů buněk jsou uváděny jako medián (minimum; maximum). Ke srovnání jednotlivých skupin byl použit neparametrický Mannův-Whitneyův test. Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Ve skupině 28 králíků byl proveden IM ligací větve koronární tepny. U přeživších 14 zvířat probíhala intrakoronární aplikace železem značených mononukleárních buněk kostní dřeně po uplynutí 18–24 hodin na modelu izolovaného srdce s perfuzí podle Langendorfa. Perfuze po aplikaci buněk u skupin P1 probíhala 2 min, u P2 10 min a u P3 25 min. V kontrolní skupině K byla provedena pouze aplikace značených buněk *ex vivo* na stejném modelu s 10minutovou perfuzí.

Semikvantitativně byla hodnocena schopnost mononukleárních buněk značených železem osídlit oblast infarktového ložiska. Jako pozitivní nález byla hodnocena každá železem značená buňka, resp. ložisko velikostí, tvarem a intenzitou zabarvení odpovídající takovéto buňce. V každém zorném poli (ZP) byly zvlášť počítány značené buňky v cévách a zvlášť značené buňky vycestované do tkáně, a to nad místem ligace a pod ním.

Semikvantitativní hodnocení migrace značených buněk v rámci skupin prokázalo v kontrolní skupině pouze ojediněle přítomnost značených buněk jak v oblasti báze srdeční, tak v oblasti hrotu. Stejně tak záchyt značených buněk nad místem ligace a pod ním ve skupině P1 – tj. s 2minutovou perfuzí – byl sporadický. Naproti tomu ve skupině P2 – tj. s 10minutovou perfuzí – byly pod místem ligace zaznamenány maximální hodnoty počtu značených buněk jak v cévách (33/15 ZP), tak ve svalovině (37/15 ZP). Srovnání počtu nad místem ligace a pod ním ve skupině P2 prokázalo statisticky významný rozdíl mezi počtem značených buněk v cévách ($p = 0,009$), v intersticiu ($p = 0,004$), a tím i celkem ($p = 0,004$), což svědčí o výrazné tendenci značených mononukleárních buněk migrovat do místa poškozené tkáně. Ve skupině P3 (tj. s 25minutovou perfuzí) byly statisticky významné změny v zachytu značených buněk v intersticiu ($p = 0,043$) mezi ložisky pod místem ligace a nad ním. Tyto změny ve skupině P3 se promítly i do signifikantních změn v jejich celkových počtech ($p = 0,028$). Při srovnání počtu značených buněk v cévách nad místem ligace a pod místem ligace nebyl ve skupině P3 zjištěn signifikantní rozdíl.

Výsledky mediánů a interval minimum-maximum počtů značených buněk v 15 ZP v jednotlivých lokalizacích u všech skupin shrnuje *tabulka I*.

Při vzájemném srovnání jednotlivých skupin nebyly rozdíly v počtu značených buněk v lokalizaci nad místem ligace v cévách a intersticiu statisticky významné s výjimkou celkového počtu buněk (tj. cévy + intersticiu), a to mezi skupinou K a P3 ($p = 0,019$) a dále mezi skupinou P1 a P3 ($p = 0,019$).

Tabulka II ukazuje statistické srovnání počtu značených buněk nalezených v infarktovém ložisku (oblast pod ligací koronární tepny). Lze zdůraznit signifikantní vzestup v počtu značených buněk ve všech sledovaných lokalitách (cévy, intersticiu i celkem) jak při srovnání skupin K a P1 se skupinou P2, tak skupin K a P1 se skupinou P3. Na druhé straně nebyl shledán rozdíl v počtu MKD mezi skupinou K vs. P1 a stejně tak mezi skupinou P2 vs. P3.

Z 26 králíků, kterým byl navozen IM, uhynulo 12 králíků. Exitus nastal v důsledku vzniku fibrilace

Tabulka I

Medián a interval minimum-maximum počtů značených buněk v 15 náhodných zorných polích

Neischemizovaný myokard – nad ligací			
Skupina	Cévy	Intersticiu	Celkem
K	0 (0–0)	0,5 (0–3)	0,5 (0–3)
P1	0,5 (0–2)	2 (1–2)	2,5 (2–3)
P2	0,5 (0–3)	1,5 (0–18)	4 (0–19)
P3	1 (0–8)	11 (0–19)	11 (8–21)

Infarktové ložisko – pod ligací			
Skupina	Cévy	Intersticiu	Celkem
K	0 (0–1)	0,5 (0–2)	1 (0–2)
P1	1,5 (0–3)	1 (0–3)	2,5 (1–5)
P2	8,5 (7–33)	27 (19–37)	45 (26–55)
P3	12 (3–23)	22 (18–25)	34 (21–48)

Formát uvedených hodnot: medián (minimum-maximum)

Tabulka II

Hodnoty p Mannova-Whitneyova testu u srovnání počtů značených buněk v 15 náhodných zorných polích v oblasti IM (pod ligací). Tučně zvýrazněné hodnoty ukazují statisticky významné rozdíly

Cévy			
Skupiny	P3	P2	P1
K	0,018	0,009	0,122
P1	0,029	0,010	
P2	0,392		

Intersticiu			
Skupiny	P3	P2	P1
K	0,032	0,020	0,435
P1	0,020	0,010	
P2	0,201		

Celkem			
Skupiny	P3	P2	P1
K	0,020	0,010	0,102
P1	0,021	0,011	
P2	0,240		

komor. Fibrilace komor se objevila zhruba 5–10 minut po podvazu. Celková mortalita způsobená indukci infarktu myokardu činila 46,2 %.

DISKUSE

V předkládané práci byla ověřována možnost navození subletálního infarktu myokardu u králíka ligací větve koronární tepny. V experimentu byl použit model izolovaného srdce s perfuzí podle Langendorfa. Hodnotila se schopnost autologních mononukleárních buněk kostní dřeně po jejich označení nanopartikulami oxidu železa migrovat z koronárního řečiště a kolonizovat poškozené ložisko.

Model perfuze izolovaného srdce má všechny nedostatky orgánového modelu. Jeho použití neredukuje počet pokusných zvířat. Také nelze zohlednit neurohumorální mechanismy, jež v průběhu patofyziologické odpovědi na poškození regulují situaci na úrovni různých orgánových systémů. Na druhé straně ale umožňuje zkoumat myokard včetně jeho metabolických funkcí způsobem, který by *in situ* nebyl jinak z hlediska praktického provedení možný. Z hlediska vytčeného cíle, naše uspořádání modelu výrazně

usnadnilo intrakoronární aplikaci značených buněk. Model umožňuje lehce a účinně zhodnotit schopnost migrace značených buněk (ověření viability a nepoškozené funkce značených buněk) a změřit počet zachycených buněk (prostý rozdíl mezi aplikovaným počtem a počtem vyplavených buněk).

Indukce infarktu myokardu může být dosaženo více způsoby. Z hlediska simulace akutního infarktu myokardu u člověka lze považovat za vhodné metody založené na ischemickém poškození myokardu. Z tohoto důvodu jsme zvolili k navození IM ligaci větve koronární tepny. U králíka jsme dominantně prováděli ligaci r. collateralis distalis rami interventricularis paraconalis levé věnčité tepny.

Vhodnost tohoto postupu jsme prokazovali na základě hodnocení mortality a histopatologických změn. Náš experiment byl zatížen mortalitou 46,2 %. Exaktní srovnání tohoto ukazatele s údaji v literatuře je ale obtížné, neboť experimentální protokoly nejsou stejné. Pokusíme-li se přesto o komparativní přístup, můžeme konstatovat, že námi zjištěná mortalita se výrazně nelišila od výsledků kryogenně navozeného IM u králíka, získaných Thompsonem a spol. (38,9 %); indukci IM ligací prováděli též Norol a spol. a Terrovitis a spol. s mortalitou 50 %, resp. 47,4 %.⁽²⁻⁴⁾

Námi zvolený model indukovaného infarktu myokardu s délkou trvání do 24 hod. skýtá určitou možnost redukce časné mortality. Orlic a spol. uvádějí, že mortalita dramaticky stoupá mezi 3.–6. dnem po indukci IM.⁽⁵⁾ Při délce trvání námi vyvolaného IM (18–24 hod.) jsme dosáhli synchronizace rozvoje histopatologických změn a minimalizace mortality. V literatuře uváděný model s reperfuzí po jednohodinové ligaci jsme nepoužili z obavy interference s následky možné reperfuzní toxicity (negativního účinku reaktivních forem kyslíku).⁽⁶⁾

Antiarytmika a resuscitace nebyly použity pro nutnost standardizace protokolu, resp. obtížné odfiltrování vlivu délky resuscitace/zástavy, protektivního vlivu betablokátoru, resp. i jiné medikace na hodnocené výsledky.

V preklinických studiích bylo v souvislosti s buněčnou terapií IM v humánní medicíně odzkoušeno již několik buněčných typů: skeletální myoblasty injikované do ložiska a jeho okolí, mononukleární buňky kostní dřeně (KD) aplikované do koronární tepny, hematopoetické kmenové buňky KD a mononukleární buňky KD aplikované přímo do infarktového ložiska, resp. u něj.⁽⁷⁻¹¹⁾ Ve všech případech bylo pozorováno jisté zlepšení funkce levé komory.

V námi dostupných pracích převládá intramyokardiální podávání buněk, ať již přímo do ložiska poškození, nebo do periinfarktové zóny.⁽¹²⁻¹⁵⁾ To ale nevypovídá o potenciální schopnosti buněk aktivně nidovat v infarktovém ložisku při jejich autologní transplantaci. Tyto buňky v ložisku pasivně přežívají, aniž by došlo k jejich rejekci. Proto jsme přistoupili k aplikaci buněk do koronárního řečiště, což by mohlo být, na rozdíl od intramyokardiálního podání, využito v poznávání zákonitostí terapie.

K autologní transplantaci buněk kostní dřeně jsme přistoupili z důvodu vyloučení jakékoliv nežádoucí reakce na jejich podání, byť krátkost trvání experimentu a model *ex vivo* by patrně neovlivnily ani jejich alogenní aplikaci.

K identifikaci aplikovaných buněk lze použít řady metod, zejména imunofluorescenčních. S ohledem na perspektivní využití modelu při neinvazivním monitorování průběhu buněčné terapie IM jsme použili metodu detekce podávaných buněk založenou na inkorporaci částic železa, což u imunofluorescenčních metod nelze. U použitého značení není uváděna zvýšená toxicita po jejich inkubaci se železem a navíc lze tyto sloučeniny identifikovat prostřednictvím světelného mikroskopu.^(16,17)

Při semikvantitativním hodnocení migrace podávaných buněk bylo nutné definovat pozitivní nález. Podobně jako Orlic a spol. i my jsme jej definovali jako přítomnost buněk bez narušení charakteristické morfologie.⁽⁵⁾ Tím jsme se snažili vyloučit falešně pozitivní reakce vyplývající ze samotného histologického zpracování vzorku, tzn. vzniklé vymytím částic železa z aplikovaných buněk do tkáně. Stejně tak Jackson a spol. považovali za pozitivní nález každou buňku, resp. shluk buněk, který nebylo možné blíže kvantifikovat.⁽¹⁸⁾ Pro správnost našeho postupu hovoří fakt, že i ve vzorcích pocházejících z orgánu perfundovaného 25 minut nebyla celistvost buněk ve srovnání s ostatními pozměněna. Principem barvení turnbullovou modří je průkaz přítomnosti Fe^{2+} v reakci s hexakvanoželezitanem, která vyžaduje volné železnaté (Fe^{2+}) ionty. Z tohoto důvodu bylo snadné vyloučit falešně pozitivní reakce, ke kterým by mohlo docházet v přítomnosti agregátů erytrocytů. Stejně tak jsme nepředpokládali – jednak na základě klinického vyšetření, věku a makroskopického posouzení orgánů po extrakci srdce – zkreslení výsledků, ke kterému by mohlo dojít v případě zvýšené koncentrace hemosiderinu v organismu.

Semikvantitativní hodnocení migrace buněk značených železem v rámci skupin prokázalo v kontrolní skupině pouze ojediněle přítomnost značených buněk jak v oblasti báze srdeční, tak v oblasti hrotu. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že u nepoškozeného myokardu dochází k minimálnímu zachytu aplikovaných buněk. Chabý záchyt buněk ve skupině P1 – tj. po 2 minutách perfuze – se signifikantně nelišil od zachytu v kontrolní skupině. Vzhledem k způsobu aplikace jde o čas, kdy lze předpokládat, že velká část aplikovaných buněk není ještě aktivně uchycena v kapilárním řečišti. Statisticky významné rozdíly mezi místy nad ligací a pod ligací v obou sledovaných lokalizacích (cévy, intersticiu) ve skupině P2 – tj. s 10minutovou perfuzí – naznačují výraznou tendenci značených mononukleárních buněk migrovat do místa poškození. Signifikanční rozdíl v celkovém počtu buněk i ve svalovině mezi místem nad ligací a pod ní ve skupině P3 – tj. s 25minutovou perfuzí – vypovídá o schopnosti buněk perzistovat v poškozeném ložisku.

Při vzájemném srovnání jednotlivých skupin v počtu značených buněk nad místem ligace nebyly rozdíly v cévách a svalovině statisticky významné. Toto zjištění je ve shodě s naší hypotézou, že v místě nepoškozeného myokardu nedochází k zvýšenému zachytu značených buněk. Překvapivé byly pouze signifikantní rozdíly v celkovém počtu značených buněk nad místem ligace mezi skupinou K a P3 a dále mezi skupinou P1 a P3. Příčinou těchto výsledků by mohl být rozdílný rozsah IM způsobený podvazem, který

byl proveden mírně proximálněji než obvykle zvolené místo podvazu.

Srovnáním skupin K a P1 se skupinou P2 (10minutová perfuze) se prokázal signifikantní vzestup celkového počtu značených buněk, který se promítl i do signifikantního vzestupu buněk jak v cévách, tak ve svalovině. Lze tedy konstatovat, že zvolený časový interval 10 min od aplikace postačuje k tomu, aby buňky na základě signálu migrovaly z koronárního řečiště do oblasti tkáňového poškození. To je v souladu s údaji, jež uvádějí Sait a spol., avšak v modelu *in vivo* u laboratorního potkana.⁽¹⁹⁾ Stejně tak při srovnání skupin K a P1 se skupinou P3 (25minutová perfuze) byl v záchytu značených buněk ve svalovině a v ukazateli celkem pod místem ligace zjištěn signifikantní vzestup. Znamená to, že podané buňky perzistují v ložisku i po 25 minutách perfuze a nejsou z místa poškození vyplavovány. Svědčí o tom rovněž zjištěný nesignifikantní rozdíl mezi skupinami P2 a P3.

ZÁVĚR

Ověřili jsme možnost indukce subletálního infarktu myokardu ligací větve koronární tepny u králíka. Infarkt myokardu se podařilo vyvolat u všech zvířat v rozsahu, který dovoľoval posouzení migrace aplikovaných mononukleárních buněk. Z hlediska cíle práce bylo postačující přežívání zvířat v prvních 24 hodinách.

Mononukleární buňky KD značené nanopartikulemi železa prokázaly schopnost migrace do intersticia myokardu se signifikantně vyšší afinitou k infarktem poškozené tkáni.

LITERATURA

1. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. In: Norol F, Merlet P, Isnard R, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 2003;102:4361–7.
2. Thompson RB, Bos EJ van den, Davis BH, et al. Intracardiac transplantation of mixed population of bone marrow cells improves both regional systolic contractility and diastolic relaxation. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:205–4.
3. Norol F, Merlet P, Isnard R, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 2003;102:4361–8.
4. Terrovitis J, Charitos Ch, Dolou P. No effect of stem cell mobilization with GM-CSF on infarct size and left ventricular function in experimental acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2004;99:241–6.
5. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:10344–9.
6. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919–6.
7. Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279–80.
8. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913–8.
9. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009–17.
10. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45–6.
11. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389–97.
12. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701–5.
13. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668–73.
14. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664–8.
15. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow re-generate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005;115:326–38.
16. Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:2290–3.
17. Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* 2003;228:480–7.
18. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395–402.
19. Saito T, Kuang JQ, Bittira B, et al. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg* 2002;74:19–24.

Došlo do redakce 26. 4. 2006

Přijato k otištění 11. 7. 2006