

Ląstelinė kardiomioplastika naudojant autologines miogenines ląsteles

Cellular cardiomyoplasty using autologous myogenic cells

Raimondas Širmenis¹, Daiva Baltriukienė², Audronė Kalvelytė², Mindaugas Balčiūnas³, Radvilė Malickaitė⁴, Edvardas Žurauskas⁵, Virginija Bukelskienė²

¹ *Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Širdies chirurgijos centras, Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius*

² *Biochemijos institutas, Mokslininkų g. 12, LT-08662 Vilnius*

³ *Vilniaus universiteto Patologijos, teismo medicinos ir farmakologijos katedra, Čiurlionio g. 21/27, LT-03101 Vilnius*

⁴ *Vilniaus universiteto Širdies chirurgijos centras, Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius*

⁵ *Valstybinis patologijos centras, P. Baublio g. 5, LT-08406 Vilnius*

El. paštas: virginija@bchi.lt

¹ *Vilnius University Hospital Santariškių Clinics, Cardial Surgery Centre, Santariškių str. 2, LT-08661 Vilnius, Lithuania*

² *Institute of Biochemistry, Mokslininkų g. 12, LT-08662 Vilnius, Lithuania*

³ *Vilnius University Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Čiurlionio str. 21/27, LT-08661 Vilnius, Lithuania*

⁴ *Vilnius University, Heart Surgery Centre, Santariškių str. 2, LT-08661 Vilnius, Lithuania*

⁵ *State Centre of Pathology, P. Baublio str. 5, LT-08406 Vilnius, Lithuania*

E-mail: Virginija@bchi.lt

Tikslas

Sudarius žmogaus ūmaus miokardo infarkto patologiniam židiniui būdingas sąlygas gyvūno organizme, persodinti autologines kamienines miogenines ląsteles į išeminę zoną ir patvirtinti, kad jos integravosi į audinį; įvertinti eksperimentinės infarkto procedūros ir ląstelių terapijos saugumą.

Metodai

Atviros eksperimentinių gyvūnų širdies operacijos, pirminių miogeninių ląstelių linijų gavimas ir ląstelių auginimas *in vitro*, ląstelių žymėjimas vitaliniais dažais ar genetiniais metodais, ląstelių persodinimas į gyvūno širdį, histologinė širdies raumens analizė.

Rezultatai

Išmokta taikyti eksperimentinio infarkto sukėlimo triušio širdyje modelį; infarktas patvirtintas histologiškai; pradėtas naudoti autologinių, iš triušio skeleto raumens gautų ląstelių žymėjimas vitaliniais dažais ir genetiniais metodais *in vitro*; ląstelių buvimas gyvūno širdies raumenyje patvirtintas histologiškai.

Išvados

Panaudojant eksperimentinius gyvūnus – triušius, įsisavinta modelinė ląstelinės kardiomioplastikos sistema, skirta reparacinio metodo taikymo gydymo praktikoje tyrimams. Ląstelių persodinimo ir prigijimo išeminiame židinyje triušio širdyje tyrimai patvirtino miokardo regeneracijos kamieninėmis ląstelėmis (mioblastais) galimybes.

Pagrindiniai žodžiai: kamieninė ląstelė, kardiomioplastika, miokardo infarktas, ląstelių terapija

Objective

Simulating human heart infarction in an animal (rabbit) organism, to implant autologous myogenic stem cells into the pathological focus of the animal heart and to confirm stem cell existence in the tissue; to evaluate the safety of cell therapy.

Methods

Heart operation on laboratory animals (rabbits); primary myogenic cell lines – origin and maintenance in the culture *in vitro*; labeling stem cells using vital dyes or genetic manipulations; cell transplantation into animal heart; histological evaluation of the tissue.

Results

In the rabbit organism, an experimental model of heart infarction was acquired; the heart infarction was confirmed histologically; the labeling of stem cells by using vital dyes and genetic manipulations was applied *in vitro*; histological existence of stem cells was confirmed in heart tissue.

Conclusions

In laboratory animals (rabbits), an experimental model system of cellular cardiomyoplasty was acquired. The model is intended to study the possibilities of cellular therapy in clinical practice. The study of cell transplantation into and integration in the pathological focus confirmed the possibilities of heart regeneration by using stem cell therapy.

Key words: stem cell, cardiomyoplasty, infarcted myocardium, cell therapy

Įvadas

Ląstelių implantavimo į pažeistą širdies raumenį galimybių tyrimo eksperimentai daromi 10–15 metų [1]. 2000 metų liepą pirma tokia operacija žmogui atlikta Paryžiuje [2]. Nuo tada šį metodą bandyta taikyti Jungtinėse Amerikos Valstijose Kalifornijos universitete, Los Andže, Klivlendo klinikoje (Ohajo valstija) ir kai kuriose ligoninėse Prancūzijoje, Olandijoje, Lenkijoje, Kinijoje bei Pietų Amerikoje ir kitur. Tie, kuriems buvo atlikta ląstelinės kardiomioplastikos operacija, teigia, kad širdies veikla labai pagerėjo. Tai rodo ir daug žadantys širdies funkcijos tyrimo rezultatai, taip pat atkreipiamas dėmesys į mažai invazinį metodo taikymo aspektą [3, 4]. Tačiau vis dar aktualus klausimas, kaip parinkti tinkamiausią persodinti ląstelių tipą, būtina nuosekliai išsiaiškinti persodintų ląstelių funkcionavimo mechanizmus, pailginti persodintų ląstelių amžių, pagerinti transplantanto elektromechaninę integraciją. Tai problemos, ku-

rios dar nėra išspręstos ir todėl kamieninės ląstelės vis dar nėra plačiai taikomos klinikoje, nors tokios perspektyvos akivaizdžiai matomos.

Kardiomioplastikos eksperimentuose bene dažniausiai analizuojamos autologinių kamieninių miogeninių ląstelių persodinimo į patologinį židinį miokarde galimybės.

Palydovines ląsteles pirmą kartą aprašė A. Mauro 1961 metais, jis jau tada spėjo, kad jos gali atlikti ypatingą vaidmenį regeneruojant raumenį [5]. Gerokai vėliau nustatyta, kad skeleto raumens miogeninės arba palydovinės ląstelės galėtų pakeisti pažeistas širdies raumens ląsteles [6]. Metodas, kai autologinės *ex vivo* miogeninės ląstelės persodinamos į miokardą, tikintis regeneruoti širdies raumenį, pavadintas „ląsteline kardiomioplastika“ [7]. Šį metodą sukūrė Dr. Race L. Kao [8]. Dabar sąvoka „ląstelių kardiomioplastika“ apima daugelio rūšių kamieninių ląstelių eksperimentinį persodinimą į širdies raumenį. Eksperimentuose bandyta persodinti įvairias pir-

mines ląsteles [9, 10]: vaisiaus kardiomiocitus [11, 12], autologinius skeleto mioblastus [13, 14], lygiųjų raumenų ląsteles [15], imortalizuotus mioblastus [16], singeniinius skeleto mioblastus [17], fibroblastus [15], suaugusio organizmo širdies stromos ląsteles [18], kaulų čiulpų kamienines ląsteles [19–23], suaugusiųjų širdies kamienines ląsteles [24, 25] ir kai kurias kitas.

Lietuvoje miogeninių ląstelių pritaikymo kardiomioplastikai tyrimų pradžia siekia 1999 metus. Pirmas straipsnis „Ląstelių kardiomioplastija: pirma dalis. Raumens satelitinė ląstelių išskyrimas ir auginimas“ paskelbtas žurnale „Acta Medica Lituanica“, autoriai R. Širmenis, V. Bukelskienė, V. Domkus, V. Sirvydis (VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų ir Biochemijos instituto mokslininkų darbas) [26]. Miogeninių ląstelių auginimo sąlygos tobulintos [27], tirtas pirminių miogeninių ląstelių gyvybingumas [28], parodyta, kad iš suaugusio organizmo raumens išskirtos ląstelės pasižymėjo ne ribotu dauginimosi potencialu – ląstelės *in vitro* dauginosi daugiau nei metus (daugiau kaip 100 pasაžų) [29, 30].

Šis darbas skirtas ląstelių persodinimo į gyvūno širdyje sukurtą eksperimentinį pataloginį židinių operaciniams procedūroms tobulinti ir citoterapijos galimybes analizuoti. Atliekant ikiklinikinius bandymus buvo siekiama:

- sumodeliuoti pataloginiam židiniui žmogaus miokardo infarkto metu būdingas sąlygas gyvūno organizme;
- persodinti autologinių kamieninių linijų ląsteles į išeminę zoną *in vivo*;
- persodintoms ląstelėms audinyje identifikuoti naudoti skirtingai *in vitro* žymėtas ląsteles;
- įvertinti eksperimentinės ūmaus miokardo infarkto ir ląstelių terapijos procedūros saugumą.

Metodai

Darbai naudotas eksperimentinis gyvūnų (triušių) modelis (Biochemijos instituto vivariumas). Darant eksperimentą, gyvūnai buvo operuojami taikant visišką nejautrą [30]. Operacijos metu paimtas 0,5 cm³ raumeninio audinio gabalėlis buvo padėtas į paruoštą ląstelių auginimo terpę (DMEM – Dalbeko modifikuotą Iglo terpę; *Sigma-Aldrich*) su antibiotikais (100 vV/ml penicilino ir 100 μg/ml streptomocino; *Biological Industries*). Audinys smulkintas mechaniniu būdu, paskui veiktas fermentų mišiniu (kologenazė – 1 mg/ml, hialuronidazė – 0,3 mg/ml, ištirpinta 0,125% tripsino ir 0,1% EDTA tirpale; *Biological Industries*) ir 10–15 min. inkubuotas, purtant 37 °C temperatūroje. Gauta suspensija praskiesta

auginimo terpe su serumu ir 1–2 min. centrifuguota 500 aps./min. greičiu. Suspensija surinkta ir 2 kartus praskiedus auginimo terpe, centrifuguota 10 min. 1500 aps./min. greičiu. Ląstelės surinktos ir iššėtos į kultivavimo indus Iskovo modifikuotoje DME terpėje (IMDM; *Sigma-Aldrich*), praturtintoje 10% fetalinio veršelių serumo (FVS; Biochrom). Maždaug po 2 savaičių susiformavo kamieninių ląstelių monosluoksnis, gauta pirminė ląstelių kultūra, kuri vėliau buvo persėjama, ląstelių monosluoksnį skaidant tripsino 0,25% – EDTA tirpalu (*Biological Industries*). Ląstelės auginamos IMDM terpėje, praturtintoje 10% FVS ir antibiotikais. Gautos pirminės ląstelių linijos buvo palaikomos jas persėjant 1–2 kartus per savaitę. Tokios 15–30 pasაžų ląstelės buvo naudotos persodinimui.

Prieš persodinimą paruoštos ląstelės buvo skaičiuojamos Gorjajevo kameroje, naudojant šviesinį mikroskopą.

Eksperimentui ląstelių persodinimui į gyvūno širdį naudotos ląstelės buvo žymimos trimis būdais:

- dažyta branduolio dažais DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindolas; *Sigma-Aldrich*). Tam ląstelės pasėjamos, po 24 val. (ląstelių tankis turi būti 60–80% monosluoksnio) pakeičiama terpė ir pridedama DAPI, kad galutinė terpės koncentracija būtų 10 μg/ml. Dažoma 12 val.;
- dažyta membraniniais dažais PKH26 (*Sigma-Aldrich*). Dažoma pagal gamintojo instrukcijas: 10 × 10⁶ ląstelių/ml imama 2 × 10⁻⁶ M PKH26 dažų;
- atlikta genetinė ląstelių modifikacija – į tiriamąsias ląsteles pridedama žalio fluorescuojančio baltymo (EGFP) geno. Ląstelių transfekcijai buvo naudotas LIPOFECTAMINE™ 2000 (LF2000) (*Life technologies*) reagentas, formuojantis liposomas. Ląstelės buvo sėjamos į 6 duobučių plokštelę diena prieš transfekciją, auginamos terpėje su serumu, bet be antibiotikų. Vienos duobutės ląstelių transfekcijai buvo imama 2 μg DNR ir ištirpinama 100 μl ME terpėje (Erlo druskų tirpale, *Sigma-Aldrich*) be serumo ir inkubuojama 5 min. kambario temperatūroje. DNR ir LF2000 tirpalai buvo sumaišomi ir inkubuojami 30 min., kad susiformuotų DNR-LF2000 kompleksai. 200 μl tirpalo su DNR-LF2000 kompleksais buvo supilama į šulinėlį su ląstelėmis, esančiomis 0,8 ml Iskovo DME terpėje su FVS (be antibiotikų). Inkubuojama 37°C temperatūroje CO₂ termostate. Transfekcijai buvo naudota plazmidė pEGFP-C1 (*Clontech*). Transfektuotoms ląstelėms atrinkti buvo naudotas antibiotikas genecinas (100 μg/ml – 1 mg/ml).

Autologinės kamieninės ląstelės į eksperimentinio gyvūno širdį persodinamos operacijos metu, taikant bendrą nuskausminimą. Pradžioje triušiu į raumenis suleidžiama ksilazino (5 mg/kg) ir ketamino (50 mg/kg). Gyvūnui užmigus, įvesti kateteriai į ausies veną (vaistų ir skysčių infuzijoms) ir į ausies arteriją (tiesioginiam arterijos kraujo spaudimui matuoti) ir prijungti elektrokardiografijos elektrodai gyvybiniais duomenimis stebėti. Elektrokardiografinis vertinimas (EKG) atliktas standartiniu metodu, jungiant prie kardiografo-monitoriaus „Hewlett Packard 78834A“.

Prie ausies venos kateterio prijungta skysčių lašinimo sistema, pripildyta 5% gliukozės tirpalo (vidutinis lašinimo greitis 30 ml/val.), suleidžiama 25 mg/kg ketamino ir 2,5 mg/kg ksilazino. Triušis intubuojamas per burną 2–3 mm vidinio skersmens intubaciniu vamzdeliu. Plaučiai ventiliuoti „Engtrem“ (*LDK Medical ABER311*) dirbtinio kvėpavimo aparatu, palaikant 1,2 L minutinį tūrį, kvėpavimo dažnis 40 k./min., oro ir deguonies mišinio 50% /50% įpūtimo slėgis apie 30 mm H₂O. Triušio kairioji krūtinės ląstos pusė paruošiama operacijai. Atliekama šoninė torakotomija, prapjaunamas perikardas, netoli širdies viršūnės surandama priekinė kairiosios vainikinės arterijos šaka ir apsiūnama 5–0 *Prolen (Ethicon)* siūlu. EKG tuo metu fiksuoja atsiradusią išemiją. Išemija taip pat įvertinama vizualiai, stebint miokardo blyškumą ir akineziją vainikinės arterijos okliuzijos metu. Dalis išeminės zonos apsiuvama kisetine 5–0 *Prolen* siūle, kuri, ten suleidus ląsteles, užrišama, kad mažiau ląstelių ištektų iš įdūrimo vietų. Visą operacijos laiką taikyta palaikomoji dozė: 0,3 ml ketamino ir 0,3 ml ksilazino kas 15 min. į veną, lėtai lašintas 5% gliukozės tirpalas.

Kontrolinės grupės triušiams į miokardo išemijos zoną insulininiu švirkštu buvo suleista apie 0,5 ml IMDM terpės, tiriamiesiems – 0,5 ml IMDM terpės be serumo, kurioje suspenduota apie 10 mln. miogeninių ląstelių.

Žaizda susiuvama pasluoksniui *Vicryl (Ethicon)* siūlais pašalinant iš kairės pleuros liekamąjį orą, naudojant kateterį su švirkštu arba paliekant dreną, prijungtą prie vakuumo. Infekcijos profilaktikai jau 3 paros prieš operaciją pradėti leisti antibiotikai. Pooperaciniam nuskausminimui naudotas diklofenakas (25 mg x 3 d. į raumenis). Pabudęs triušis ekstubuojamas ir įleidžiamas į šildomą narvą pooperaciniam stebėjimui.

Visos chirurginės procedūros gyvūnams atliekamos visiškos anestezijos sąlygomis, kaip to reikalauja Lietuvos Respublikos Gyvūnų globos, laikymo ir naudojimo įstatymas ir poįstatyminiai aktai, reglamentuojantys darbą

su laboratoriniais gyvūnais. Darbui su gyvūnais gautas Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus leidimas (Nr. 0121, 2004-06-09) naudoti laboratorinius gyvūnus mokslo tiriamajam projektui.

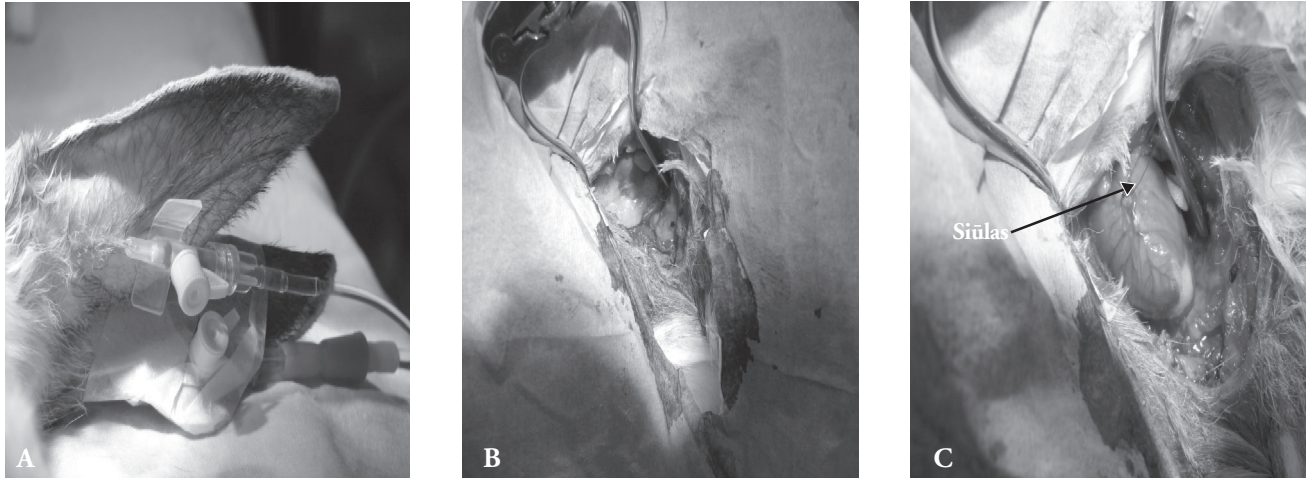
Histologinei analizei preparatai ruošti vadovaujantis standartine metodika, pamažu juos dehidratuojant etanolyje ir kietinant parafine. Pjūvio storis 5 μm, dažoma hematoksilinu ir eozinu (HE). Vertinta šviesiniu mikroskopu (didinimas 150–300 kartų).

Rezultatai ir jų aptarimas

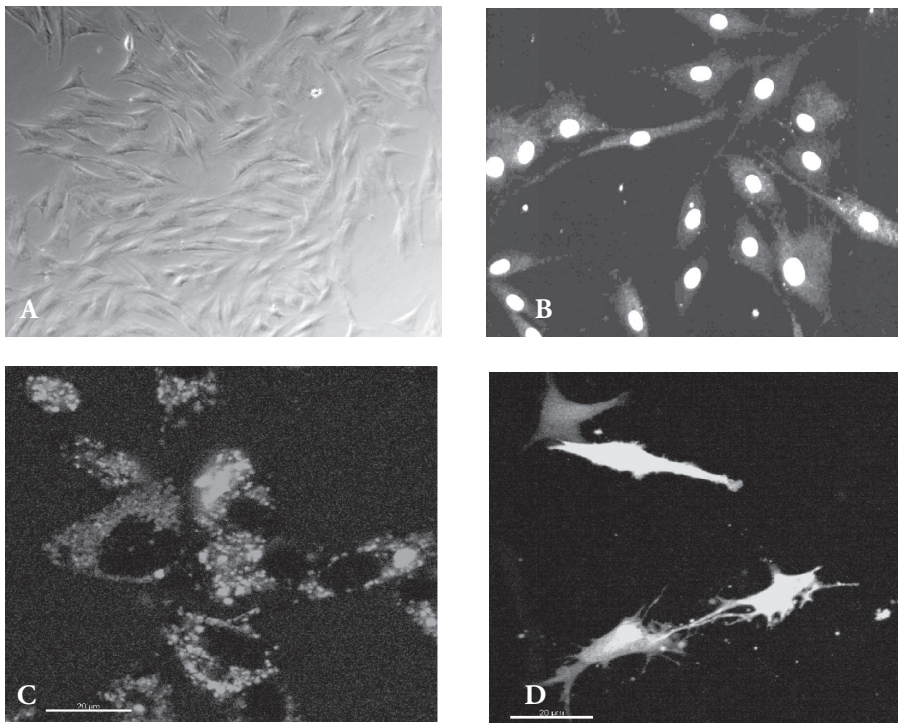
Modeliuojant klinikinę žmogaus ūmaus miokardo infarkto situaciją, eksperimentinių gyvūnų (triušių) organizme buvo atliekami ląstelių terapijos tyrimai, siekiant įdiegti reparacinio gydymo metodą kardiokirurginėje praktikoje, įvertinti ilgalaikį procedūros saugumą ir gauti daugiau žinių apie kamieninių ląstelių integracijos į patologinį židinį širdyje ypatumus. Eksperimentinės operacijos buvo daromos dviem etapais. Pirmos operacijos metu nuskausminus iš gyvūno organizmo buvo paimtas 0,5 cm³ dydžio skersaruožio raumens gabalėlis. Iš jo buvo išskirtos ląstelės.

Miokardo infarktas triušio organizme sumodeliuotas anestezuotam gyvūnui (1 pav., A) operacijos metu (1 pav., B), perrišus vainikinę arteriją (1 pav., C). Visos operacijos metu monitoriaus ekrane buvo stebima elektrokardiograma. Prieš vainikinės arterijos perrišimą elektrokardiogramoje nefiksuota širdies susitraukimo dažnio ir depoliarizacijos ar repoliarizacijos pokyčių. Maždaug 30 min. po vainikinės arterijos perrišimo procedūros elektrokardiogramoje fiksuoti ST segmento pakilimai arba nusileidimai. Kai kuriais atvejais suretėjo širdies susitraukimų dažnis ir pasireiškė aritmija (EKG nepateikta). Miokardo infarkto faktas patvirtintas histologiškai *post mortem*, baigus eksperimentą (3 pav., A).

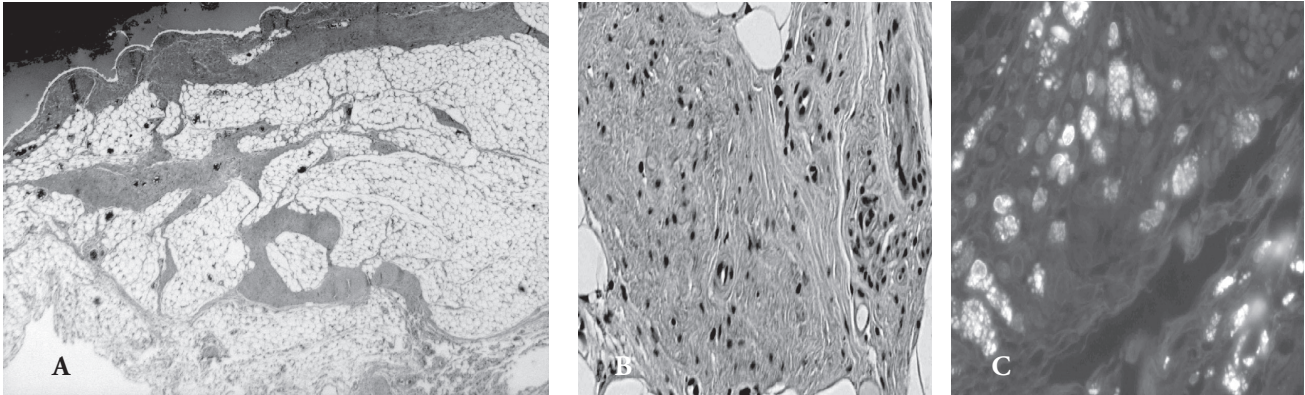
Į susidariusį patologinį židinį, imituojančią ūmų miokardo infarktą, persodintos autologinės kamieninės miogeninės ląstelės, kurios anksčiau buvo išskirtos iš suaugusio individo skeleto raumens. Vykdamas šį darbą, buvo gautos 10-ies gyvūnų ląstelių linijos, kurių kiekvienos ląstelės buvo padaugintos kultūroje *in vitro*, o vėliau persodintos į patologinį židinį širdyje. Esame nustatę, kad šių linijų ląstelės kultūroje galėjo daugintis ilgiau negu metus (daugiau kaip 100 pasažų). Ankstesni mūsų tyrimai parodė, kad šios ląstelės turėjo desmino baltymą ir galėjo diferencijuotis į miozino sunkiąją grandinę (MHC) turinčias daugiabranduoles ląsteles. Šie požymiai leido mū-



1 pav. A – kateteriai ausies venoje (vaistų ir skysčių infuzijoms) ir ausies arterijoje (arterijos kraujo spaudimui tiesiogiai matuoti); B – IV tarpšonkauliniame tarpe atvarta krūtinės ląsta; C – apsiūta ir užrišta priekinė kairiosios vainikinės arterijos šaka (nuotraukoje matomas siūlas užrišus)



2 pav. A – miogeninių ląstelių monoslauksnis kultūroje *in vitro*. Skirtingais būdais pažymėtos miogeninės ląstelės: B – dažyta branduolio dažais DAPI, C – dažyta membraniniais dažais PKH26; D – panaudojus žalią fluorescuojantį baltymą (GFP) koduojantį geną



3 pav. **A** – infarkto sritis – vietoj miokardo išsivystęs jungiamasis, riebalinis audinys; **B** – į širdies raumenį persodintos miogeninės ląstelės; **C** – persodintos miogeninės ląstelės, pažymėtos DAPI dažais, integruotos į širdies raumenį

su *in vitro* auginamas ląsteles atpažinti kaip kamienines miogenines ląsteles [30], kurios kultūroje turėjo būdingą verpstės formą (2 pav., A).

Norėdami atpažinti persodintas ląsteles audinyje, procedūros pradžioje jas pažymėjome. Žymėjimui buvo naudojami su DNR kompleksą sudarantys DAPI (2 pav., B) ir su ląstelių membranomis besijungiantys PKH26 (2 pav., C) dažai arba genetinė ląstelių modifikacija – pridėjama žalia fluorescuojanti baltymą (EGFP) koduojančių genų (2 pav., D).

Atliekant persodinimą, gyvūnai buvo suskirstyti į dvi grupes:

1. kontroliniai gyvūnai, kuriems perrišus vainikines arterijas sukeltas miokardo infarktas;
2. tiriamieji gyvūnai, kuriems perrišus vainikines arterijas buvo sukeltas miokardo infarktas ir injekuota paruoštų kamieninių miogeninių ląstelių.

Kontrolinės grupės triušiams į miokardo išemijos zoną insulininiu švirkštu buvo suleista apie 0,5 ml IMDM terpės, tiriamiesiems – 0,5 ml IMDM terpės, kurioje buvo suspenduota apie 10×10^6 miogeninių ląstelių. Šios ląstelės dėl savo dydžio buvo injekuotos tiesiogiai į raumenį, nes buvo bijomasi suleidus į vainikines arterijas sukelti mikroemboliją. Kita vertus, taip į išeminį miokardą injekuotos ląstelės sudaro saleles, kuriose kraujotaka nėra pakankama, todėl ląstelių išgyvenimo tikimybė taip pat mažėja. Kita tokio ląstelių persodinimo problema yra sudėtinga injekcija – siekiant suleisti ląsteles į ribinę infarkto zoną, galimas nekrotinio miokardo plyšimas. Dėl šių metodo apribojimų ir atsižvelgiant į tai, kad dalis gyvūnų infarkto sukėlimo metu žūva, ir tai,

kad triušio miokardas yra daug plonesnis nei žmogaus, sėkmingai injekuoti mioblastus yra gana sunku.

Praėjus 1–3 mėn. po transplantacijos, buvo vertinami liekamieji reiškiniai po miokardo infarkto, ieškoma persodintų ląstelių gyvūno širdies raumenyje (3 pav., B). Tam tiriamasis triušis vėl buvo anestezuotas ir dekapituotas. Širdies miokardo infarkto zona ir dydis nustatytas pagal kairiojo skilvelio sienos pokyčius: pabalimą, fibrozę ir išplonėjimą – faktas patvirtintas histologiškai (3 pav., A).

Mūsų gauti rezultatai leidžia teigti, kad kultūroje *in vitro* užaugintos ląstelės, sušvirkštos į patologinį židinį širdyje, nesukėlė jokių pašalinių reakcijų. Gyvūnai jau antrą dieną po operacijos pradėjo ieškoti maisto, o po savaitės tapo smalsūs (tai rodo gerą gyvūno savijautą) ir elgesiu nebesiskyrė nuo kontrolinės grupės gyvūnų. Baigus eksperimentą, histologinė širdies audinio analizė, panaudojus HE dažus, parodė galimą transplantuotų ląstelių integraciją į širdies raumenį (3 pav., B). Eksperimentiškai labiausiai pasiteisino ląstelių žymėjimas DAPI dažais. Mums pavyko rasti į triušio širdį persodintas ląsteles praėjus mėnesiui po persodinimo (3 pav., C). Kitais būdais žymėtų ląstelių triušio širdyje, tikriausiai dėl techninių priežasčių, šiame tyrimų etape rasti nepavyko. Didelė tikimybė, kad šiais atvejais ląstelės buvo prarastos persodinimo metu.

Po *ex vivo* kultivuotų ląstelių transplantacijos į organizmą atmetimo reakcijų nenustatyta. Literatūros duomenimis, ilgalaikio kamieninių ląstelių dauginimosi *in vitro* metu galima vėžinė jų transformacija. Mūsų atveju, atlikus histologinę širdies audinio analizę, po ląstelinės kardiomioplastikos navikų širdyje nenustatyta. Taigi citoterapijos metodą, naudojant autologinių ląstelių linijų ląsteles, galima laikyti saugiu.

Išvados

Naudojant eksperimentinius gyvūnus (triušius), įsisavinta modelinė ląstelių kardiomioplastikos sistema, skirta reparacinio metodo taikymui gydymo praktikoje analizuoti. Ląstelių prigijimo išeminiame židinyje tyrimai patvirtino miokardo regeneracijos kamieninėmis ląstelėmis (mioblastais) galimybes. Mioblastų kultivavimas ir žymėjimas *in vitro* neturėjo įtakos gyvūnų išgyvenimui. Orga-

nizme nenustatyta atmetimo reakcijų, kurios galėtų būti siejamos su persodintų ląstelių auginimu *in vitro*. Ilgalaimė miogeninių ląstelių proliferacija kultūroje nesukėlė navikų širdies audinyje.

Padėka

Darbą finansavo Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas, projekto registracijos Nr. P-23/04, sutarties Nr. U-04001.

LITERATŪRA

1. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4(8): 929–933.
2. Menasche P, Hagege A, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2001; 94(3): 180–182.
3. Chachques JC, Shafy A, Duarte F, Cattadori B, Goussef N, Shen L, Carpentier A. From dynamic to cellular cardiomyoplasty. *J Card Surg* 2002; 17(3): 194–200.
4. Zhang F, Yang Z, Chen Y, Qin J, Zhu T, Xu D, Xu Z, Xu Q, Qian Y, Ma W, Chen L, Gao X, Li C, Ha T, Kao RL. Clinical cellular cardiomyoplasty: technical considerations. *J Card Surg* 2003; 18(3): 268–273.
5. Mauro A. Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 493–495.
6. Chiu RC-J, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: Myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 12–18.
7. Yoon PD, Kao RL, Magovern GJ. Myocardial regeneration. Transplanting satellite cells into damaged myocardium. *Texas Heart Inst J* 1995; 22: 119–125.
8. Kao RL, Rizzo C, Magovern GJ. Satellite cells for myocardial regeneration. *Physiologist* 1989; 32: 220.
9. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 1999; 100: 193–202.
10. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10733–10738.
11. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated discs between grafted fetal cardiomyocytes and host myo-cardium. *Science* 1994; 264: 98–101.
12. Li RK, Mickle DA, Weisel RD. (1997) Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. *Circulation* 1997; 96: II179–186
13. Taylor DA, Silvestry SC, Bishop SP, Annex BH, Lilly RE, Glower DD, Kraus WE. Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: a potential approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109(3): 245–253.
14. Atkins BZ, Hueman MT, Meuchel JM, Cottman MJ, Hutcheson KA, Taylor DA. Myogenic cell transplantation improves *in vivo* regional performance in infarcted rabbit myocardium. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18(12): 1173–1180.
15. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(3): 513–522.
16. Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest* 1993; 92(3): 1548–1554.
17. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98(11): 2512–2523.
18. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98(1): 216–224.
19. Nishida M, Li TS, Hirata K, Yano M, Matsuzaki M, Hamano K. Improvement of cardiac function by bone marrow cell implantation in a rat hypoperfusion heart model. *Ann Thorac Surg* 2003; 75(3): 768–774.
20. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344–10349.

21. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci* 2001; 938: 221–229.
22. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45–46.
23. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Repair of Infarcted Myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913–1918.
24. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbaneck K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114(6): 658–659.
25. Oh H, Bradfute SB, Gallarpo TD, Nakamura T, Gausin V, Mishina Y, Pacius J, Michael LH, Beringer RR, Garry DJ, Entman MI. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *PNAS* 2003; 100(21): 12313–12318.
26. Širmenis R, Bukelskienė V, Domkus V, Sirvydis V. Cellular cardiomyoplasty: isolation and cultivation of skeletal muscle satellite cells. *Acta med Lituanica* 1999; 6(3): 178–181.
27. Širmenis R, Bukelskienė V, Domkus V, Sirvydis V. Sateilitinių ląstelių paruošimas ląstelinės kardiomioplastikos eksperimentui. (Cellular cardiomyoplasty: preparation of myogenic cells). *Medicina* 2000; 36: 1315–1319.
28. Sirvydis V, Bukelskienė V, Širmenis R. Preparation of myogenic cells for cardiomyoplasty: growth and apoptosis study in rabbit primary cell culture. 51st International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery, Helsinki, Finland, Abstracts 2002; p. 114.
29. Bukelskienė V, Baltriukienė D, Bironaitė D, Širmenis R, Balčiūnas M, Kalvelytė A. Development of muscle-derived primary cell lines for heart repair. *Journal of cardiovascular surgery. Abstracts* 46(3) Suppl.1 2005; p. 85.
30. Bukelskienė V, Baltriukienė D, Bironaitė D, Imbrasaitė A, Širmenis R, Balčiūnas M, Žurauskas E, Kalvelytė A. (2005) Muscle-derived primary stem cell lines for heart repair. *Seminars in Cardiology* 2005; 11(3): 99–105.