

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИНИ-СВИНЕЙ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА© 2010 В.Н. Тихонов^{1*}, П.М. Ларионов², А.В. Тихонов³¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск² Учреждение Министерства здравоохранения Российской Федерации
Институт патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, Новосибирск³ Учреждение Российской академии медицинских наук
Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН, Новосибирск

Последние 30 лет ежегодно растет число использований для медико-биологического изучения атеросклероза и других заболеваний сердечно-сосудистой системы лабораторных животных нового вида — миниатюрных свиней, отличающихся от традиционных экспериментальных животных максимально адекватным сходством с человеком по анатомии и физиологическим функциям как в отношении сердечно-сосудистой, так и пищеварительной, выделительной и нейробиологической систем. Институтом цитологии и генетики СО РАН созданы специализированные лабораторные мини- и микросвиньи, адаптированные для использования в различных медицинских целях. В 2010 г. за рубежом и в России на мини-свиньях проводили работы несколько сот исследователей. В обзоре рассматриваются некоторые экспериментальные работы, которые могут представлять интерес для экспериментов и клиники.

Ключевые слова: мини- и микросибсы, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, ксено-трансплантация.

Миниатюрные свиньи все шире входят в практику медико-биологических исследований не только за рубежом, но и в нашей стране как удобный новый вид лабораторных животных в отношении генетики и возможного использования в медицинской практике [1]. При исследованиях в разных областях медицины используют ежегодно сотни миниатюрных свиней. Растущая популярность мини-свиней в качестве лабораторных основывается на очень большом сходстве свиней с человеком по анатомии и физиологии сердечно-сосудистой, пищеварительной и выделительной систем и органов нервной деятельности [2].

Изучению сердечно-сосудистых заболеваний на мини-свиньях, в том числе сосудов сердца и мозга, посвящено очень большое число исследований. В 1996 г. в США были опубликованы два больших сборника статей «Свинья в биомедицинских исследованиях» (под редакцией М. Тамблсона и Л. Шука (M. Tumblesson and L. Shook) [3], в которых опубликовано 73 статьи

с оригинальными исследованиями, посвященными влиянию наследственных особенностей разных генотипов свиней, взаимодействию генотипов и внешней среды, уровню и структуре липидного, углеводного и белкового питания на развитие атеросклероза сосудов сердца и мозга, оценки фармакологического действия разных препаратов на спонтанные и индуцированные нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы. Среди статей по этой теме выделяется работа W.G. Pond и H.J. Mersmann [4]. Тогда же была убедительно доказана эффективность моделирования на мини-свиньях стрессорных последствий, вызываемых физическими и нервными нагрузками. При этом на свиньях было показано значение питания, связанное с холестериновым и липопротеиновым метаболизмом. Одновременно подобное исследование сердечно-сосудистой системы было впервые проведено в 1980–1986 гг. на отечественных мини-свиньях А.В. Тихоновым под руководством Ю.П. Никитина [5, 6].

В этих исследованиях впервые изучены возрастные особенности биохимических показателей липидного обмена сыворотки крови мини-

* E-mail: Tikhonov@bionet.nsc.ru

свиней с целью выявления оптимальных сроков для постановки эксперимента по моделированию атеросклероза.

Исследование проводилось на отечественных миниатюрных свиньях селекции Института цитологии и генетики СО АН СССР. Для анализа было отобрано 99 животных в возрасте 2, 6, 12, 18, 24, 30 и 42 мес.

По общепринятым методикам было изучено содержание в сыворотке крови мини-свиней общего холестерина, α -холестерина, триглицеридов, соотношение фракций липопротеидов в осенне-зимний период. Биохимические показатели крови мини-свиней сравнивали с соответствующими показателями домашних свиней породы ландрас.

Полученные данные показали, что в возрасте 2 мес наблюдается самый высокий уровень холестерина в сыворотке крови миниатюрных свиней – в среднем 124,8 мг/дл (3,2 ммоль/л). При этом содержание α -холестерина было низким – 35 мг/дл (0,9 ммоль/л), что составляло только 28 % от общего холестерина крови. В этом возрасте также отмечен более высокий процент липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) – 41,6 % нежели в другие возрастные периоды.

С возрастом содержание общего холестерина в крови мини-свиней постепенно снижается, и к 18 мес достигает 82 мг/дл (2,1 ммоль/л). Затем содержание общего холестерина в крови увеличивается и к 30–42-месячному возрасту уровень его достигает в среднем 109–124 мг/дл (2,8–3,2 ммоль/л). Начиная с 6-месячного возраста уровень α -холестерина в крови составляет 44–47 мг/дл (1,1–1,2 ммоль/л). Однако доля его от общего холестерина увеличивается и к 18 мес составляет уже 54 %, что почти в 2 раза выше, чем в 2-месячном возрасте, и более высокое, чем в другие возрастные периоды. Соотношение холестерина и триглицеридов в крови свиней с возрастом практически мало изменяется. Исключением является 12-месячный возраст, когда их соотношение составляло 1:1,13, и 18-месячный возраст – 1:0,86.

Содержание липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) в 2-месячном возрасте составляет 43 % от общего уровня липопротеидов крови. Постепенно к 30 мес содержание ЛПВП возрастает до 55 %, а затем к 42 мес снижается. Все изменения в содержании липопротеидов в крови мини-свиней происходят в основном за счет изменения содержания ЛПНП. Содержание липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) практически мало изменяется и составляет 15–18 % от общего содержания липопротеидов в сыворотке крови. Достоверных

различий в содержании общего холестерина, α -холестерина, триглицеридов и их соотношении у самок и самцов не обнаружено. Соотношение липопротеидов в крови мини-свиней разного пола также мало различалось.

Изученные биохимические показатели липидного обмена у мини-свиней близки к соответствующим показателям у домашних свиней породы ландрас. Самый высокий уровень холестерина – 158 мг/дл (4,09 ммоль/л) – наблюдался у домашних свиней скороспелой мясной СМ-1 в 6-месячном возрасте. Исследование уровня холестерина в сыворотке крови показало, что у поросят при рождении он был довольно низким. Нарастание концентрации холестерина обнаружено у животных в возрасте 2 мес – 167 мг/дл (4,32 ммоль/л). У 6-месячных домашних свиней количество определяемого показателя уменьшалось. Сравнительная оценка напряженности метаболизма выявила наличие взаимосвязи между уровнем холестерина в крови свиней и возрастом достижения живой массы, который составил 0,258. Установлена возрастная изменчивость концентрации общего холестерина в сыворотке крови свиней, которая, видимо, связана с перестройкой обмена веществ в организме в разные периоды постнатального онтогенеза [7].

Наиболее подходящим сроком для постановки опытов по моделированию экспериментального атеросклероза оказался 2-месячный возраст и период от 12 до 18 мес. Полученные данные сопоставили с таковыми у обычных домашних свиней породы ландрас. Исследована кровь от 98 животных. Кровь брали после 18 ч голодания в утренние часы из яремной вены в пробирки с ЭДТА (1 мг/мл).

Анализ полученных данных позволил сделать вывод, который в дальнейшем полностью подтвердился: наиболее благоприятным для реципиентов при иммунизации их липопротеидами низкой плотности плазмы крови человека можно считать возраст 6–12 месяцев. В этом возрасте животные по живой массе, состоянию нервной и эндокринной систем, а также уровню показателей липидного обмена наиболее подготовлены к иммунному ответу в отношении выработки антител к липопротеидам низкой плотности.

Установлено, что при иммунизации животных плазменными белками человека большое значение имеет доза антигена: большое содержание белка обычно тормозит антителообразование с достаточной специфичностью, а малое может не обеспечить иммунного ответа. Кроме того, размер животного также важен при выборе дозы антигена, так как расчет последне-

го ведется на единицу массы тела животного. Было рассчитано, что иммунизацию лучше всего проводить животным в возрасте 6 мес при живой массе тела 18–20 кг. Опытным путем в предварительных исследованиях для получения эффективного иммунного ответа выбрана оптимальная доза антигена, составляющая 0,5–1,0 мг липопротеидов плазмы крови человека (в пересчете на белок) на 1 кг живой массы тела животного, при условии, что в общей массе антигена содержится не менее 16–24 мг белка.

Для получения оптимального иммунного ответа разработана специальная схема иммунизации животных, предусматривающая введение антигена в околушные и паховые лимфатические узлы. Для обеспечения пролонгирования и эффективности действия антигена первую иммунизацию проводили с полным адъювантом Фрейнда. Это позволило вторую иммунизацию провести на 21 день после первой иммунизации, имея уже достаточный уровень титра выработанных антител. Третью и последнюю иммунизацию оказалось лучше проводить через 7 дней после второй иммунизации. Если контрольный забор крови и проверочный анализ спустя еще 7 дней показывали удовлетворительный процесс антителиобразования, проводили забор крови с целью получения возможно большего ее количества. Часть животных была оставлена для реиммунизации, что позволило дополнительно получить гетероиммунные антисыворотки с высоким титром. В качестве антигена была приготовлена фракция плазмы крови доноров с высоким уровнем ЛПНП. Приготовление антигена проводили по вышеописанной общепринятой методике.

Особенно высокая адекватность модельных мини-свиней с организмом человека обусловлена не только общими размерами тела и органов, но и максимальным функциональным сходством последних. Так, при сравнительном рассмотрении анатомии сердца мини-свиней и человека можно увидеть, что топография расположения артерий кардиоваскулярной системы у них практически одинаковое. Некоторые анатомические отличия от других видов животных заключаются в присутствии дополнительной левой непарной вены (*L. azygous*), которая, как показал М. Swindle [8], входит в коронарный синус. У других млекопитающих гомологичная вена входит в переднюю полую вену. Для сравнения сердечно-сосудистой системы мини-свиней минисибс и человека приведены фотографии внешнего и внутреннего вида сердец мини-свиней и человека, показывающие кровопроводящую систему артерий и вен, обеспечивающую гемоди-

намический статус кровообращения организма (рис. 1).

Анатомия желудочно-кишечной системы мини-свиней значительно отличается от других видов традиционных лабораторных животных, но очень похожа на человеческую, что связано с вегетативно-мясным типом питания. Желудок у мини-свиней – типичный однокамерный, кишечный тракт относительно длинный и примерно в 15 раз больше длины туловища. В отличие от других традиционных лабораторных животных анатомия поджелудочной железы и половой системы, а также почек мини-свиней, имеет очень сходное строение с человеческими и по внутренней структуре, и по физиологии. Органы половой системы у самцов и самок особенно близки по анатомическим и гистологическим характеристикам с аналогичными у человека, включая простату у самцов и фаллопиевы трубы у самок, матка у которых имеет типичное строение, характерное для других многоплодных животных.

Одинаковый тип питания человека и мини-свиней («всеядность») определяет сходство углеводного и жирового метаболизма.

В результате 40-летней работы в ИЦиГ СО РАН созданы две лабораторные популяции миниатюрных свиней: минисибс и микросибс для наиболее адекватного моделирования различных патологических процессов [9, 10, 11] (рис. 2, 3).

Использование минисибсов оказалось в высшей степени эффективным при разработке новых методов изготовления первых отечественных биопротезов сердечных аортальных и легочных клапанов. Изучение пригодности сердечно-сосудистой системы мини-свиней для биопротезирования человеку при использовании ксенобиопротезов аортальных клапанов сердца в митральной и трикуспидальной позициях было многократно проведено на минисибсах в середине 1980-х годов. Исследованные клапаны от животных-доноров по линейным и весовым параметрам, толщине и эластичности створок, отсутствию фиброзных и жировых перерождений, кальциевых отложений, минимальной мышечной затененности признаны очень подходящими для использования соответствующих ксенобиопротезов при необходимых медицинских показаниях и адекватных гемодинамических данных при сердечной хирургии человека.

В соответствии с этими исследованиями на мини-свиньях в Кемеровском научно-производственном отделе биотехнологии Кемеровского СО РАМН под руководством академика Л.С. Барбараша было налажено производство

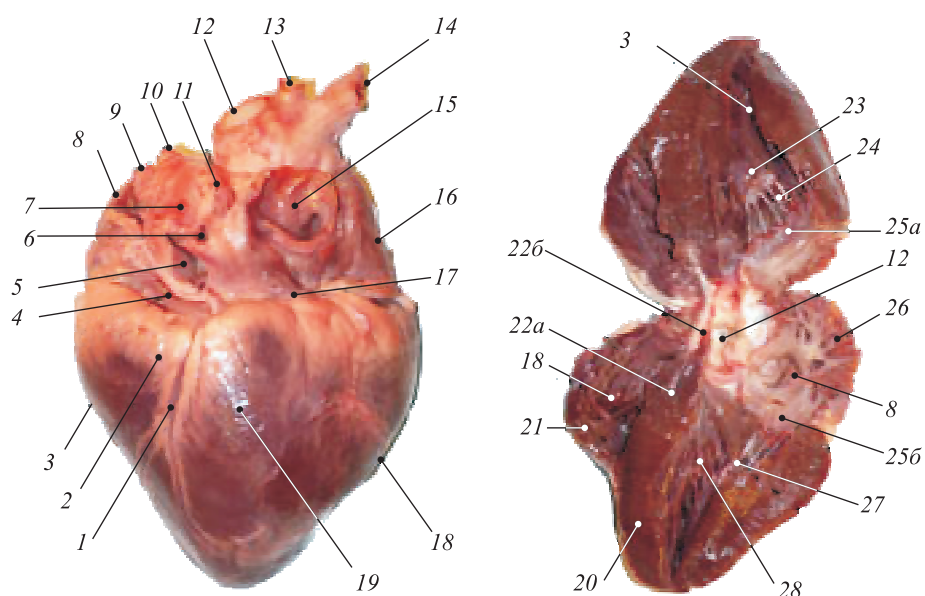


Рис. 1. Сердце минисибс (внешний и внутренний вид)

Русские и латинские названия артерий и вен кардиоваскулярной системы

№	Русское название	Латинское название
1	Средняя вена сердца	Vena cordis media
2	Передняя межжелудочковая борозда	Sulcus interventricuiaris anterior
3	Левый желудочек	Ventriculus sinister
4	Венечный синус	Sinus coronaries
5	Задняя полая вена	V. cava posterior
6	Добавочная легочная вена	V. accessorius pulmonalis
7	Правая нижняя легочная вена	V. pulmonalis inferior dextra
8	Левое предсердие	Atrium sinistrum
9	Левая нижняя легочная вена	V. pulmonalis inferior sinistra
10	Левая верхняя легочная вена	V. pulmonalis superior sinistra
11	Правая верхняя легочная вена	V. pulmonalis superior dextra
12	Аорта	Aorta
13	Левая общая сонная артерия	Arteria communis sinistra
14	Плечеголовной ствол	Truncus brachiocephalicus
15	Передняя полая вена	V. cava anterior
16	Правое предсердие	Atrium dextrum
17	Венечная борозда	Sulcus coronarius
18	Правый желудочек	Ventriculus dexter
19	Передняя поверхность сердца	Facies sternocostalis
20	Стенка левого желудочка	Myocardium sinistrum
21	Стенка правого желудочка	Myocardium dextrum
22	Межжелудочковая перегородка: а – мышечная часть, б – перепончатая часть	Septum interventriculari: a – partsmuscularis, б – partsmembranacea
23	Сосковые мышцы клапана	Musculus papilaris
24	Хорды клапана	Chordae tendeneae
25	Левый предсердно-желудочковый клапан: а – задняя створка, б – передняя створка	Valva atrioventricularis sinistra: a – cuspis posterior, б – cuspis anterior
26	Левое ушко предсердия	Aurikula atrii dextra
27	Левая сердечная артерия	A. coronaria sinistra
28	Добавочная хорда (вид порока сердца у человека)	Chorda accessorius
29	Большая сердечная вена, боковая ветвь	V. cordis magna, ramus lateralis



Рис. 2. Минисибс Хрюн, вес в 6-месячном возрасте 14,2 кг

биологических протезов нового поколения для сердечно-сосудистой хирургии, превосходящих по многим показателям американские аналоги, стоимость которых в несколько раз выше. Хорошо себя зарекомендовали биопротезы клапанов сердца «КемКор», монтированные на опорных каркасах с аортальной, митральной и трикуспидальной позициями (посадочные диаметры 26, 30 (и 32) и № 2 (35 мм)). Хорошие отзывы получили и бескаркасные биопротезы клапанов сердца «Кемерово-АБ-Моно» и «Кемерово-АБ-Композит». Одновременно были разработаны и внедрены биопротезы кровеносных сосудов «Кем-Ангиопротез» (конусные диаметром 3–7 мм и длиной сегментов до 12 см, 12–25 и 30–55 см). Разработаны также ксеноперикардиальный лоскут «КемПериплас» для интракардиальной хирургии и ангиопластики и моностворчатый ксеноперикардиальный биопротез. Эта большая многолетняя работа профессора Л.С. Барбараша, д-ра мед. наук И.Ю. Журавлевой [12, 13] и других ученых по созданию ксенобиопротезов с использованием исходных материалов от свиней, проводившаяся на минисибсах с 1975 г. совместно с Институтом цитологии и генетики СО РАН, удостоена премии Правительства РФ в 2001 г.

Последние 40 лет под руководством Леонида Семеновича Барбараша, ныне академика РАН, успешно ведется работа по модернизации ксенобиопротезов для сердечно-сосудистой хирургии. В 1978 г. в Кемеровском кардиоцентре выполнена первая в стране операция протезирования клапана сердца человека с использованием материала, полученного от минисибсов. В 1982 г. здесь создана специализированная лаборатория по производству биопротезов клапанов сердца

на основе материала от свиней и начат серийный выпуск каркасного клапана «БИОПАКС», консервированного глутаровым альдегидом. С 1991 г. начали применять принципиально новые методы консервирования биологического материала и начато клиническое использование эпоксиобработанных ксенопротезов клапанов сердца «КенКор» и впервые создана новая модель – каркасный биопротез клапана сердца «ПериКор», обладающий собственной антибактериальной активностью. В настоящее время в центре ЗАО «НеоКор» налажен серийный выпуск широкого спектра ксенобиологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии. В 2003 г. кемеровская группа «НеоКор» внедрила и сертифицировала, а в 2007 г. успешно ресертифицировала систему менеджмента качества в соответствии с международным стандартом ISO 9001:2000 в области разработки, производства и реализации биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии в ведущем зарубежном органе по сертификации TUV SERT (регистрационный номер сертификата 04 100 040520). Требования стандарта предусматривают активную обратную связь с клиникой и хирургами. Тесный контакт сотрудников Кемеровского центра с хирургами многих регионов страны позволяет постоянно совершенствовать модели ксенобиопротезов и внедрять новые. При этом обеспечивается тщательная оценка ближайших и отдаленных результатов применения свинных ксенобиопротезов. Дефицит адекватного сырья в виде аортальных клапанов свиного сердца потребовал форсированных разработок по созданию ксеноперикардиального биопротеза в 2002–2004 гг.

В 2005 г. в результате всесторонней оценки клинического применения модифицированы

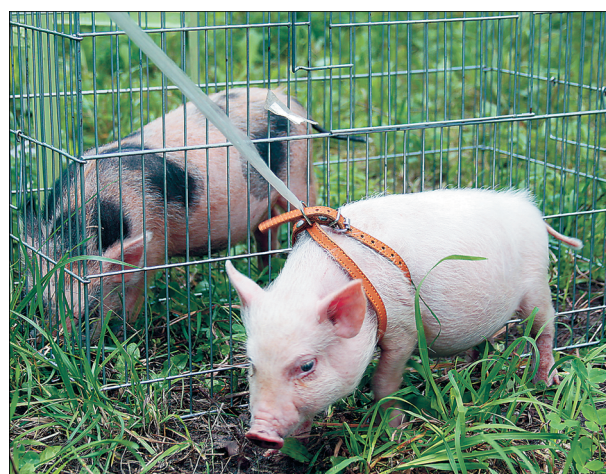


Рис. 3. Самка микросибс Нюся, вес в возрасте 4 мес 10 кг

бескаркасный биопротез аортального клапана и приточная часть бескаркасного протеза «АБ-Композит», что значительно улучшило его функционирование. В серийное производство запущена модифицированная модель бескаркасного ксенопротезного клапана сердца «АБ-Композит-Нео», представляющая собой сборную (из трех некоронарных створок аортального комплекса свиного сердца) модель. Отсутствие створки с мышечной частью позволяет добиться максимальной эффективной площади открытия и минимизировать перепад давления на клапане. Атриовентрикулярный ксеноперикардиальный клапан «ЮниЛайн» отличают такие качества, как хорошие имплантационные свойства, прочность, высокая биосовместимость, нулевая хирургическая пористость, естественная пластичность. Биопротез клапана сердца «ПериКор» сформирован из створок аортального клапана свиньи, монтирован на гибком опорном каркасе. Стойкий опорного каркаса обшиты ксеноперикардиальным лоскутом «КемПериплас-Нео». Материалом пришивной манжеты также служил ксеноперикард. Биопротез «ПериКор» предназначен для имплантации в митральную, трикуспидальную и аортальную позиции сердца человека. Разработаны новые рекомендации по клиническому использованию каркасных биопротезов «КемКор» и «ПериКор». Внедрена новая технология хранения биопротезов, позволяющая сократить время предимплантационной подготовки до 15 мин.

Ксенотрансплантация биопротезов сердечных клапанов, особенно в случаях, когда их имплантируют ребенку, часто осложняется тем, что размер клапана не меняется по мере роста пациента. Эту сложнейшую проблему ганноверские медики предложили решить удалением из сердца свиньи всех мышечных клеток, оставляя только клетки соединительной ткани. Оставшийся каркас заселяют клетками, выделенными из крови пациента. Такой новый, выращенный за несколько недель клапан не вызывает иммунного отторжения и, главное, растет одновременно с ростом пациента. За 15 лет трансплантацию ксенобиотехнологических клапанов сердца проводили более 20 раз детям разного возраста и многим из них не потребовалось проведения повторных трансплантаций. За создание растущего клапана сердца Ганноверская лаборатория биотехнологии и искусственных органов им. Лейбница была отмечена премией Президента ФРГ.

Ежегодная медицинская потребность для сотен тысяч трансплантаций остро нуждающимся пациентам во всем мире не может и никогда не сможет быть удовлетворена за счет только

человеческих донорских органов. Даже в сравнительно небольшой Англии ежегодно производится более 10 тыс. трансплантаций органов. Хронический и практически бесконечный дефицит усугубляется объективными причинами: очень высокой индивидуальной иммуногенетической специфичностью органов, необычайной трудностью их получения и высокой стоимостью. При этом по этическим, анатомо-генетическим и чисто финансовым причинам в качестве доноров для ксенотрансплантации из всех животных, включая приматов, могут рассматриваться только мини-свиньи.

Потенциальный мировой рынок в отношении сердец, почек, поджелудочных желез и других органов мини-свиней для ксенотрансплантации человеку (при достижении их гистосовместимости) по самым осторожным расчетам превосходит 5 млрд долларов. Но еще большая сумма требуется для лечения гастроэнтерологических заболеваний (включая диабет) и нейроэндокринных болезней, в том числе болезни Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, эпилепсии и многих других.

В 1998–2009 гг. на базе ИЦиГ СО РАН при участии кардиохирургов Научно-исследовательского института патологии кровообращения (НИИПК) МЗ России им. Е.Н. Мешалкина проведено изучение минисибсов в качестве потенциальных доноров для ксенотрансплантации сердца человеку. Целью этих исследований было определить возможность получения донорского сердца мини-свиней, соответствующего по морфофизиологическим характеристикам, гемодинамике и анатомическим параметрам сердцу человека разного возраста и веса [14]. Эти работы были продолжены и в 2009 г. в питомнике мини-свиней ИЦиГ профессором, д-ром мед. наук П.М. Ларионовым, заведующим лабораторией экспериментальной хирургии НИИПК [15, 16], совместно с другими сотрудниками этого института.

Для медико-биологических исследований морфофизиологических параметров сердечно-сосудистой системы были использованы 16 минисибсов в возрасте от 10 до 20 месяцев с живой массой от 20 до 55 кг. Основным методом изучения анатомо-физиологических особенностей минисибсов были ортотопические трансплантации сердца. Отличия минисибсов от соответствующих особенностей человека по реакции на медикаментозное обеспечение анестезиологических и перфузионных процедур, а также по изучению гемодинамики и биохимических параметров проведено методами, используемыми обычно в клинической операционной

практике. При операциях применяли стандартные инструментарий и оборудование, аппараты искусственного кровообращения «American Optical Company» и принудительного дыхания. Были использованы гипотермическая перфузия для углубленной гипотермической защиты (средняя температура в носоглотке 22 °С), мониторинг объемной скорости перфузии, показателей красной крови, газообмена и некоторых других физиологических параметров. Физиологические и биохимические данные, свидетельствующие об очень большом сходстве соответствующих показателей минисибса и человека, подтвердились.

Необходимо отметить, что при почти полном анатомическом сходстве сердца минисибса с человеческим установлены значительно меньшие его абсолютные и относительные весовые и линейные размеры (по отношению к массе тела). Масса сердца у минисибсов с общей живой массой тела от 20 до 55 кг составляла от 108 до 232 г, что указывает на очень хорошее соответствие минисибсов с живой массой тела менее 50 кг для ксенотрансплантации, прежде всего, что очень ценно, пациентам детского возраста. Получение донорских сердец оптимального размера для ксенотрансплантации взрослым пациентам возможно только от более крупных особей. В связи с этим мы предложили новую схему генетической работы, направленной на увеличение размеров сердца мини-свиней предполагаемых потенциальных доноров для ксенотрансплантации этого органа, что возможно при увеличении средней живой массы 10–12-месячных животных до 50–70 кг.

Изучение анатомических особенностей сердца и коронарных сосудов минисибса и общей системы их гемодинамических параметров при ортотопических трансплантациях показало практически полное морфофизиологическое сходство с человеком, что позволяет сделать заключение об анатомо-физиологической и хирургической возможности ортотопической ксенотрансплантации человеку сердца от миниатюрных сибирских свиной минисибс.

Использование органов генетически модифицированных клонированных мини-свиней может решить возникшую сложную проблему донорства для ксенотрансплантации, когда будут получены мини-свины интродукцией генов иммуногенетической гистосовместимости с необходимой толерантностью при ксенотрансплантации. Скорее это будет достигнуто нокаутированием некоторых хромосомных сублокусов, детерминирующих образование полисахарида *GGTA1* и протеинов, обуславливающих гистонесовместимость. Обнадеживающие исследования в этом

направлении уже несколько лет успешно проводятся в США, Англии, Японии, Италии, Израиле, Австралии, Южной Корее, Китае и начинаются в нашей стране.

В настоящее время продолжают совместные работы Института цитологии и генетики СО РАН с лабораторией экспериментальной хирургии и морфологии НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина по разработке новых кардиохирургических методов ортотрансплантации сердца на модельных мини-свиньях [17, 18]. Работы в этом направлении обещают дать реальную перспективу будущим ксенотрансплантациям не только сердечных клапанов и сосудов, но и всего сердца и других органов от мини-свиней пациентам детского возраста и взрослым больным. Благодаря исключительно большому анатомо-физиологическому сходству сердца и сердечно-сосудистой системы (включая гемодинамику) человека и свиной лабораторные мини-свины во всех странах рассматриваются как наиболее адекватные биомодели для изучения кардиологических болезней, биопротезирования и ксенотрансплантации гомологичных систем от животных человеку. Это уже нашло подтверждение в успешном широком биопротезировании многих тысяч сердечных клапанов, разработка которых была начата и проведена в нашей стране на мини-свиньях минисибс. Удачно прошло исследование липидного и жирового обмена, холестериновой и другим фракциям сыворотки крови при разных атеросклеротических заболеваниях человека с помощью антисывороток, приготовленных с использованием иммунизации отечественных мини-свиней [19].

В настоящее время широко используются хронические модели на животных с жизнеспособным дисфункциональным миокардом, которые формируют большинство, если не все основные черты гибернированного миокарда у человека. Они включают хроническое уменьшение перфузии покоя и контрактильной функции миокарда, значимо ограничивают коронарный резерв и увеличивают потребление глюкозы миокардом. Эти изменения сопровождаются регионарной редукцией кальцийобработывающих протеинов и потерей кардиомиоцитов вследствие развития вторичного апоптоза.

Продолжительные исследования дисфункции миокарда показали, что состояние хронической оглушенности миокарда с нормальным кровотоком покоя предшествует гибернации миокарда. Указанные состояния различаются и протекают в период адаптации миокарда к хронической ишемии. Это свидетельствует о том, что уменьшение перфузии миокарда в покое результат, а не

причина хронической контрактильной дисфункции миокарда. Таким образом, острая пролонгированная редукция кровотока может являться, по мнению J.M. Canty и J.A. Fallavollita, начальным стимулом гипертрофии миокарда [20].

В то же время к модели хронической ишемической болезни сердца часто относят модель, выполненную на животных, перенесших инфаркт миокарда [21]. Z. Issa показал, что именно такие модели могут приводить к сердечной недостаточности у животных и, как было установлено, сочетаются с высоким риском развития спонтанных ишемических желудочковых аритмий [22].

Считается, что независимо от используемого типа клеток в проводимом лечении, основанном на использовании клеточной терапии, выбор моделирования животных имеет принципиальное значение и необходимо для обеспечения развития теоретических аспектов и последующего внедрения полученных результатов в клиническую практику. В основе многих ранних исследований клеточной терапии миокарда были использованы модели острой ишемии миокарда. Вместе с этим для эффективного лечения острой ишемии в настоящее время разработан комплекс процедур, состоящий из тромболиза, коронаропластики и коронарного шунтирования. Однако для хронической миокардиальной ишемии выбор вариантов лечения ограничен. Подобное наблюдение показывает, что будущее с большой гарантией — за развитием моделей хронических сердечно-сосудистых заболеваний при последующем проведении клеточно-опосредованного лечения.

Следует отметить, что на сегодняшний день большинство моделей ишемии миокарда выполнены и выполняются на грызунах. Сейчас абсолютно ясно, что такие модели на мелких животных эффективны для изучения энgraфтинга стволовых клеток, однако значительные различия в анатомии и физиологии миокарда создают серьезные проблемы для последующей трансляции полученных данных на человека.

И наконец, очень важно, что модели на мини-свиньях лучше аппроксимируются на сердечные заболевания человека, возможна полная оценка энgraфтинга стволовых клеток, их дифференциации и функциональных улучшений, а также функциональная оценка миокарда, включая ангиографию, эхокардиографию, магниторезонансную томографию. В то же время R.P. Gallegos и R.M. Bolman [23] отмечают, что соответствующих линий стволовых клеток для клеточной терапии подобных моделей с использованием мини-свиней недостаточно. Вместе

с тем приводятся примеры, иллюстрирующие сроки выполнения клеточно-опосредованных процедур или вариантов непрямого ревазуляризации миокарда у свиней после моделирования инфаркта.

Георг Луттер [24] выполнил эксперимент на свиньях, однако ишемия экспланировалась только одну неделю. Также недельным сроком было ограничено время экспланации после моделирования инфаркта миокарда у свиней при исследовании распределения аутологичных клеток костного мозга при их интракоронарной имплантации [25]. В постинфарктной модели на свиньях с целью усиления ангиогенеза Н. Kamihata et al. провели исследование в сроки 3 недели после моделирования инфаркта миокарда [26]. Другая реперфузионная модель выполнена на свиньях в условиях 90-минутного пережатия средней трети передней межжелудочковой артерии с целью последующей интракоронарной имплантации клеток в сроки 4 недели от момента моделирования инфаркта миокарда [27].

Логика использования моделей на мини-свиньях с хронической ишемией очевидна, так как в большей степени соответствует сегодняшней реальности, если рассмотреть эту ситуацию в плоскости проявлений человеческой патологии. Так, срок течения острого инфаркта миокарда составляет 8 недель, этот период считается фактором риска для проведения хирургических манипуляций на сердце. В то же время понятна внутренняя логика использования клеточной терапии на моделях острой ишемии — попытаться уменьшить зону инфарктированного миокарда. Это и есть столкновение мнений и технологических подходов, которое в будущем будет решаться в продолжительных ретроспективных мультидисциплинарных исследованиях на больших рандомизированных группах подопытных особей.

Так, при использовании инфарктной модели у свиней через 1 неделю после моделирования меченые мезенхимные стволовые клетки имплантировались в миокард перинфарктной зоны на остановленном и работающем сердце. Меченые клетки обнаруживались в сердце, а также в селезенке, печени, легких. При этом Н. Zhang et al. отмечали, что клетки чаще выявлялись при имплантации их на остановленном сердце, без уточнения их характеристик [25]. В других исследованиях через 4 недели после моделирования с помощью амероидной манжеты (констриктором) и последующей интрамиокардиальной имплантации у мини-свиней обнаруживали аутологичные клетки в мононуклеарной фракции с высокой (5×10^8) и низкой (5×10^7) дозами.

По результатам восьми некроскопий с последующим гистологическим анализом не выявлено никаких гистопатологических проявлений, связанных с инъекцией клеток [28].

Используя клетки моноклеарной фракции костного мозга на инфарктной модели у свиней, через 3 недели после инъекции клеток в зону инфаркта обнаружили почти двукратное увеличение перфузии. При ангиографии отмечено увеличение количества коллатералей [26].

Полученные данные согласуются с результатами других исследовательских групп, занимающихся разработкой методов реваскуляризации миокарда. На модели хронической ишемии миокарда у мини-свиней инъекция клеток моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в миокард, по данным H.F. Tse et al., через 12 недель приводила к увеличению региональной перфузии на 73 % как эндокардиального, так и эпикардиального слоев миокарда [29]. На модели хронической ишемии у свиней успешно изучали эффекты имплантации в миокард аутологичных CD 31+ клеток костно-мозгового происхождения и клеток моноклеарной фракции через 12 недель после интрамиокардиальной инъекции клеток моноклеарной фракции костного мозга. При этом обнаружено увеличение региональной перфузии на 73 % эндокардиальной и эпикардиальной зон. Инъекции в миокард CD 31+ позитивных клеток не приводили к таким результатам, оставаясь на уровне инъекции физиологического раствора [29].

В недавней работе M. Shigetoshi et al. при изучении вариантов клеточного процессинга с замораживанием—размораживанием показано, что независимо от состояния клеток, свежие или замороженные, изолектин В4 окрашивает 95–96 % эндотелиальных прогениторных клеток [30]. Использование изолектина В4 в качестве эндотелиальной метки вполне оправдано: окраска метит практически весь сосудистый эндотелий.

Другие авторы, изучая эффекты имплантации в миокард аутологичных CD 31+ клеток костно-мозгового происхождения и клеток МНФ, на модели хронической ишемии у свиней нашли увеличение через 12 недель после интрамиокардиальной инъекций МНФ плотности капилляров до 1132+/-69 против 903+/-44 per mmI ($p=0,047$). Результаты исследования [29] показали увеличение плотности капилляров на 37 % против 25 % в миокарде при использовании моноклеарной фракции костного мозга [29].

Используя моноклеарные фракции костного мозга у свиней через 3 недели после инъекции в зону инфаркта наблюдалось почти двукратное увеличение плотности капилляров. В то же время имплантация в коронарную ар-

терию зрелых микрососудистых эндотелиальных клеток не вызывала увеличения плотности капилляров. При мечении моноклеарных фракций костного мозга приблизительно 31 % неокapилляров оказались с позитивной меткой [26]. В модели на мини-свиньях с реперфузией изучалась интракоронарная доставка моноклеарной фракции костного мозга, имплантация которой выполнялась на следующий день. Через 4 недели значительно увеличивалась плотность капилляров [27].

Интересные результаты были получены H. Lim et al. [31] при использовании модели хронической ишемии у свиней с трехмесячной экспланацией. Без заметных некротических изменений миокарда выявлялась регионарная потеря ядер кардиоцитов (35 %) за счет включения механизмов апоптоза на фоне регионарной гипертрофии. Эта была первая работа, показавшая связь между хронической ишемией и ишемической кардиомиопатией.

В более позднем исследовании на инфарктной окклюзии с 90-минутной экспозицией, проведенной на миниатюрных свиньях, сразу за которой следовала интракоронарная инъекция мезенхимных стволовых клеток или моноклеарной фракции костного мозга, показано, что фракция выброса левого желудочка была обратно пропорциональна апоптотическому уровню кардиоцитов и кардиоцитарному NF- κ B. В то же время фракция выброса левого желудочка позитивно коррелировала с количеством кровеносных сосудов и экспрессией VEGF и bFGF в зоне инфаркта. Авторы сделали вывод, что увеличение экспрессии VEGF и bFGF уменьшает апоптоз в кардиоцитах, реализуя тем самым клеточно-опосредованный паракринный механизм [27]. На мини-свиньях была убедительно показана возможность восстановления кардиомиоцитов за счет костно-мозговых стволовых клеток. В модели с реперфузией изучалась интракоронарная доставка клеток моноклеарной фракции костного мозга у мини-свиней, имплантация которых выполнялась на следующий день после ишемии—реперфузии миокарда. Через четыре недели больше чем в 3 раза достоверно уменьшалась зона инфаркта [27].

Недавняя работа P. Atluri et al., выполненная на модели ишемии у мини-свиней с амевроидной констрикцией, стенозирующей просвет огибающей артерии 4 недели, продемонстрировала увеличение жизнеспособности миокарда после трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации на основе увеличения плотности кардиомиоцитов [32].

Известно, что при операциях на сердце наибольшую опасность в раннем послеопераци-

онном периоде представляет функциональная дисфункция миокарда, которая определяет в настоящее время 20%-ю раннюю летальность. В связи с этим важное значение имеет разработка методов диагностики жизнеспособности миокарда. Методически удобным для изучения этого вопроса оказалось использование сердца минисибс [15–17]. В конце прошлого века сотрудниками НИИ ПК МЗ РФ совместно с ИТПМ СО РАН и ИЦиГ СО РАН успешно начато создание нового метода оптической диагностики жизнеспособности миокарда. Получены результаты, показывающие суммарное снижение интенсивности аутофлуоресценции миокарда в диагностической полосе 400–500 нм, при возбуждении эксимерным УФ-лазером на 248 нм в зависимости от времени эксплантации, начиная со 150 мин от начала введения изолированного сердца в охлажденный раствор «ТрансВекта». Последующий спектральный анализ этой области с центральной точкой на 450 нм также показал однонаправленное снижение уровня флуоресценции этой области [18].

На сегодняшний день основные усилия биотехнологов и генных инженеров при создании трансгенных животных для органной трансплантации с «ближайшим выходом» сосредоточены на предотвращении ранних кризов отторжения органов, что выполнимо на основе следующих основных подходов.

Во-первых, блокирование активации комплементарного каскада при классическом и лектиновом пути активации на уровне *C4b2-C3*-конвертаза за счет decay accelerating factor (DAF), на уровне *C4b2a3b-C5*-конвертаза за счет протеина membrane cofactor protein (MCP).

Во-вторых, блокирование лизирующего мембрану комплекса *C5b6789-MAC* за счет протеина *CD59*. Кроме того, есть ряд белковых систем, которые могут инактивировать или снижать повреждающие эффекты и эффекторный комплекс комплемента, например S-белок, витронектин и другие.

В мировой исследовательской практике успешно используют различные подходы в моделировании ишемической болезни сердца – это так называемые «безинфарктные» ишемические модели и модели с инфарктом миокарда.

Первыми, кто использовал модель с фиксированным (80 %) инструментальным стенозом проксимальной части передней межжелудочковой нисходящей коронарной артерии для индукции «оглушенного» и гибернированного миокарда у свиней через 7 недель эксплантации ишемии, были I. Mills с коллегами (1994 г.), продемонстрировав уменьшение перфузии покоя

при отсутствии проявлений инфаркта миокарда. И хотя при этом не изучали контрактильную функцию сердца, была обнаружена депрессия потребления кислорода покоя [33].

В заключении вышеприведенного обзора необходимо еще раз подтвердить, что все модели, которые аппроксимируются к человеческой патологии, всегда содержат некоторое приближение к действительности. Однако модель, выполненная на мини-свиньях, наиболее адекватна с проявлением атеросклероза хронической ишемической болезни сердца у человека и в полной мере соответствует задаче разработки вариантов непрямого реваскуляризации миокарда.

Успешно продолжающиеся в настоящее время исследования, которые проводятся учеными США, Китая и других стран, показывают большие перспективы научной работы по созданию животных (мини-свиней)-моделей развития атеросклероза и диабета, индуцированного специальными диетами. Исследования по изучению метаболического синдрома (атеросклероза, артериальной гипертонии, диабета, ожирения – комплекса заболеваний, которым подвержен и человек) проведены большим коллективом ученых на китайских мини-свиньях – породы Джуишу со сравнительным изучением американских породных групп мини-свиней – юкатанских и Оссабой [34, 35]. Большой интерес имеют и другие новые исследования атеросклероза крупных научных коллективов, опубликованные в 2009 г. [36–38]. Нет сомнения, что огромные возможности подобных работ следует использовать и в нашей стране на отечественных мини-свиньях.

Особую благодарность авторы выражают академику Ю.П. Никитину за внимание и очень полезные советы, которые они получали на протяжении более 30 лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи, генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. 305 с.
2. Тихонов В.Н. Формирование генофонда миниатюрных сибирских свиней «Минисибс» и их использование в медико-генетических исследованиях // Генетика. 2000. Т. 36, № 6. С. 829–836.
3. *Advances in Swine in biomedical research* / Eds. M.E. Tumbleson, L.B. Svhook. N.Y.; L.: Plenum Press, 1996. Vol. 1, an 2. 905 p.
4. Pond W.G., Mersmann H.J. Genetically Diverse Pig Models in Nutrition Research Related to Lipoprotein and Cholesterol Metabolism/ Ibid. P. 843–863.
5. Тихонов А.В. Возрастные особенности липидного обмена у мини-свиней //Мат. Всесоюз. конф. «Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных». М., 1980. С. 21–22.

6. **Тихонов А.В.** Атерогенность сывороточного липопротеида (а) и его роль как генетического маркера в диагностике ишемической болезни сердца: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Новосибирск: Ин-т терапии СО РАМН, 1996. 31 с.
7. **Дементьева Т.А., Жучаев К.В.** Динамика изменения содержания холестерина в крови свиней // *Фундаментальные исследования*. 2008. № 10. С. 36–37.
8. **Swindle M.M.** Comparative Anatomy of the Pig Technical Bulletin of Ch. R. Laboratories, Wilmington, Massachusetts, 1987.
9. **Tikhonov V.N.** The Siberian Miniature pig, its development, genetics, and use in biomedical research // *Advances in swine in biomedical research*. N.Y.; L.: Plenum Press, 1996. Vol. 2. P. 693–707.
10. **Тихонов В.Н., Жучаев К.В.** Микроэволюционная теория и практика пороодообразования свиней. Новосибирск: СП «Наука» РАН, 2008. 394 с.
11. **Тихонов В.Н.** О геномной модификации мини-свиней по гистосовместимости для ксенотрансплантации органов человеку // *Матер. конф. по генетике лабораторных животных*. Томск, 2009.
12. **Барбараш Л.С., Барбараш Н.А., Журавлева И.Ю.** Биопротезы клапанов сердца: проблемы и перспективы. Кемерово: Полиграфкомбинат, 1995. 400 с.
13. **Барбараш Л.С.** Биопротезы для сердечно-сосудистой хирургии: проблемы и перспективы // *Докл. юбилейной конф. II Научные чтения, посвященные памяти Е.Н. Мешалкина*. Новосибирск, 2000.
14. **Тихонов В.Н.** Стандартизация лабораторных мини-свиней для медико-биологических исследований // *Сборник «Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований»*. М., 1988. С. 41–43.
15. **Ларионов П.М., Литасова Е.Е., Малов А.Н. и др.** Исследование жизнеспособности тканей сердца методом лазерно-индуцированной флуоресценции и флуоресцентными зондами // *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2002. № 2. С. 61–66.
16. **Ларионов П.М., Малов А.Н., Мандрик М.М. и др.** Изменение спектра лазерно-индуцированной флуоресценции ткани миокарда по мере снижения ее жизнеспособности // *Журн. прикл. спектроскопии*. 2003. Т. 70, № 1. С. 38–42.
17. **Литасова Е.Е., Караськов А.М., Ларионов П.М. и др.** Способ определения жизнеспособности тканей сердца // *Патент на изобретение № 2181486 от 20.04.02 2002 по заявке № 99125729 от 02.12.1999*. БИ. № 11.
18. **Fomin V.M., Karas'kov A.M., Larionov P.M. et al.** Determination of Myocardium Viability on the Basis of the Spectra of Laser-Induced Fluorescence // *Doklady Biological Sciences*. 2003. Vol. 391 (July). P. 296–298.
19. **Тихонов А.В., Никитин Ю.П.** Липопротеид (а) и многоступенчатая атерогенность: коронарный атеросклероз, цереброваскулярные осложнения и другие корреляции ЛП(а) и апоА // *Атеросклероз*. 2010. Т. 6, № 1. С. 34–42.
20. **Canty J.M., Fallavollita J.A.** Lessons from experimental models of hibernating myocardium // *Coron. Artery Dis*. 2001. 12. P. 371–380.
21. **Schwartz P.J., Billman G.E., Stone H.L.** Autonomic mechanisms in ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia during exercise in dogs with a healed myocardial infarction: an experimental preparation for sudden cardiac death // *Circulation*. 1984. Vol. 69. P. 780–790.
22. **Issa Z., Bhakta D., Navarrete A. et al.** A novel canine model of ischemic ventricular arrhythmias // *Heart Rhythm*. 2004. P. 1–189.
23. **Gallegos R.P., Bolman R.M.** Stem Cell-Induced Regeneration of Myocardium / Ch.III. Animal Models for Stem Cell Research // *Cohn Lh, ed. Cardiac Surgery in the Adult*. N. Y.: McGraw-Hill, 2008. P. 1657–1668.
24. **Lutter G., Attmann T., Heilmann C. et al.** The combined use of transmyocardial laser revascularization (TMLR) and fibroblastic growth factor (FGF-2) enhances perfusion and regional contractility in chronically ischemic porcine hearts // *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 2002. Vol. 22. P. 753–761.
25. **Zhang H., Song P., Tang Y. et al.** Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2007. Vol. 134. N 5. P. 1234–1240.
26. **Kamihata H., Matsubara H., Nishiue T. et al.** Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines // *Circulation*. 2001. Vol. 104. P. 1046–1052.
27. **Li S.R., Qi X.Y., Hu F.L. et al.** Mechanisms of improvement of left ventricle remodeling by trans-planting two kinds of autologous bone marrow stem cells in pigs // *Chin. Med. J*. 2008. Vol. 121 (23). P. 2403–2409.
28. **Goodchild T., Pang W., Tondato F. et al.** Safety of intramyocardial injection of autologous bone marrow cells to treat myocardial ischemia in pigs // *Cardiovasc. Revasc. Med*. 2006. Vol. 7 (3). P. 136–145.
29. **Tse H.F., Siu C.W., Zhu S.G. et al.** Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium // *Eur. J. Heart. Fail*. 2007. Vol. 9, N 8. P. 747–753.
30. **Shigetoshi M., Richard C.T., Munir B. et al.** Characteristics and function of cryopreserved bone marrow-derived endothelial progenitor cells // *Ann. Thoracic Surgery*. 2008. Vol. 85, N 4. P. 1361–1366.
31. **Lim H., Fallavollita J.A., Hard R. et al.** Profound apoptotic-mediated regional myocyte loss and compensatory hypertrophy in pigs with hibernating myocardium // *Circulation*. 1999. Vol. 100. P. 2380–2386.
32. **Atluri P., Panlilio Corinna M., Liao George P. et al.** Transmyocardial revascularization to enhance myocardial vasculogenesis and hemodynamic function // *J. Thorac Cardiovasc Surg*. 2008. Vol. 135. P. 283–291.
33. **Mills I., Fallon J.T., Wrenn D. et al.** Adaptive responses of coronary circulation and myocardium to chronic

- reduction in perfusion pressure and flow // *Am. J. Physiol.* 1994. Vol. 266. P. 447–457.
34. **Xi S., Yin W., Wang Z. et al.** A minipig model of high-fat/high-sucrose diet-induced diabetes and atherosclerosis / *Int J. Exp. Pathol.* 2004. Oct; Vol. 85 (4). P. 223–231.
35. **Neeb Z.P., Edwards J.M., Alloosh M. et al.** Metabolic syndrome and coronary artery disease in Ossabaw compared with Yucatan swine // *Comp Med.* 2010. Vol. 60, (4). P. 300–315.
36. **Tharp D.L., Masseau I., Ivey J. et al.** Vulnerable plaque in a Swine model of carotid atherosclerosis // *Cardiovasc. Res.* 2009. Apr 1. Vol. 82, N 1. P. 152–160.
37. **Liang Y., Zhu H., Friedman M.H.** The correspondence between coronary arterial wall strain and histology in a porcine model of atherosclerosis // *Phys. Med. Biol.* 2009. Vol. 21, N 54(18). P. 5625–1541.
38. **Granada J.F., Kaluza G.L., Wilensky R.L. et al.** Swine model of carotid artery atherosclerosis: experimental induction by surgical partial ligation and dietary hypercholesterolemia // *EuroIntervention.* 2009. May. Vol. 5, N 1. P. 140–148. Review.

APPLICATION OF MINI-PIGS AS A MODEL FOR DEVELOPING NEW METHODS OF ISCHEMIC HEART DISEASE (IHD) TREATMENT

V.N. Tikhonov, P.M. Larionov, A.V. Tikhonov

At the last 30 years the application of the new laboratory species mini-pigs is progressively increasing in medical and biological research of atherosclerosis and other disorders of cardiovascular system. Mini-pigs differ from traditional experimental animals in maximal similarity of their anatomy and physiological functions of cardiovascular, digestive, excretory, and nervous systems with human ones. In the Institute of Cytology and Genetics SB RAS the specialized laboratory mini- and micro-pigs adapted for using under our conditions were created. In 2010 several hundreds of studies on mini-pigs were conducted in Russian Federation and abroad. The present review highlights some experimental works that could be applied for wide use in medicine.

Keywords: mini- and micro-pigs, atherosclerosis, ischemic heart disease (IHD), xenotransplantation.

Статья поступила 18 мая 2010 г.