

УДК: 616.12-005.4-085.361-056.7

**В.Н. Запорожан, Е.Л. Холодкова, Ю.И. Карпенко, В.П. Козлов, Ю.В. Козлов****ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ***Одесский национальный медицинский университет***Запорожан В.Н., Холодкова Е.Л., Карпенко Ю.И., Козлов В.П., Козлов Ю.В.** Генетические аспекты эффективности клеточной терапии ишемической кардиомиопатии // Украинский медицинский альманах. – 2014. – Том 17, № 1. – С. 155-158.

Этиологическими факторами ишемической болезни сердца являются экзогенные и эндогенные. Главные эндогенные факторы – генетические. Известно более 150 генов, полиморфизмы которых связывают с развитием сердечно-сосудистых заболеваний.

**Цель.** Данное клиническое исследование было направлено на изучения влияния полиморфизмов G-174C гена интерлейкина 6 (IL-6) и G-308A гена фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ) на прогрессию хронической сердечной недостаточности (ХСН) и ишемической кардиомиопатии (ИКМП), а также влияния данных полиморфизмов на эффективность интрамиокардиальной трансплантации мононуклеарной фракции клеток периферической крови (МКПК) больных с ИКМП.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 45 пациентов с ИКМП, которые резистентные к оптимальному медикаментозному и хирургическому лечению и 45 здоровых людей. Пациентов с ИКМП разделили на 2 группы: в первую группу (n=15) вошли больные, которым была проведена интрамиокардиальная трансплантация МКПК, группа №2 (n=30) получала оптимальную медикаментозную терапию.

**Результаты.** В результате исследования взаимосвязь полиморфизмов G-174C гена IL-6 и G-308A гена TNF $\alpha$  с тяжелым течением ИКМП или их влияние на эффективность трансплантации обнаружена не была.

**Перспективы дальнейших исследований.** Необходимо дальнейшее изучение полиморфизмов генов провоспалительных цитокинов и влияние их аллельных вариантов на процессы ремоделирования миокарда у больных ИКМП. Также целесообразно изучение влияния интрамиокардиальной трансплантации мезенхимально-стромальной фракции клеток костного мозга.

**Ключевые слова:** Интерлейкин 6; фактор некроза опухоли; ишемическая кардиомиопатия; прогениторные клетки; интрамиокардиальная трансплантация.

**Запорожан В.М., Холодкова О.Л., Карпенко Ю.И., Козлов В.П., Козлов Ю.В.** Генетичні аспекти ефективності клітинної терапії ішемічної кардіоміопатії // Український медичний альманах. – 2014. – Том 17, № 1. – С. // Украинский медицинский альманах. – 2014. – Том 17, № 1. – С. 155-158.

Етіологічними факторами ішемічної хвороби серця є екзогенні та ендогенні. Головні ендогенні фактори - генетичні. Відомо більше 150 генів, поліморфізми яких пов'язують з розвитком серцево-судинних захворювань.

**Мета.** Дане клінічне дослідження було спрямоване на вивчення впливу поліморфізмів G-174C гена інтерлейкіну 6 (IL-6) і G-308A гена фактора некрозу пухлини альфа (TNF $\alpha$ ) на прогресію хронічної серцевої недостатності (ХСН) та ішемічної кардіоміопатії (ІКМП), а також впливу даних поліморфізмів на ефективність інтраміокардиальної трансплантації мононуклеарної фракції клітин периферичної крові (МКПК) хворих з ІКМП.

**Матеріали та методи.** У дослідження було включено 45 пацієнтів з ІКМП, які резистентні до оптимального медикаментозного та хірургічного лікування і 45 здорових людей. Пацієнтів з ІКМП розділили на 2 групи: до першої групи (n = 15) увійшли хворі, яким була проведена інтраміокардиальна трансплантація МКПК, група № 2 (n = 30) отримувала оптимальну медикаментозну терапію.

**Результати.** У результаті дослідження взаємозв'язок поліморфізмів G-174C гена IL-6 і G-308A гена TNF $\alpha$  з важким перебігом ІКМП або їх вплив на ефективність трансплантації виявлена не була.

**Перспективи подальших досліджень.** Необхідне подальше вивчення поліморфізмів генів прозапальних цитокинів та вплив їх алельних варіантів на процеси ремоделювання міокарда у хворих ІКМП. Також доцільно вивчення впливу інтраміокардиальної трансплантації мезенхімально-стромальної фракції клітин кісткового мозку.

**Ключові слова:** Інтрелейкін 6; фактор некрозу пухлини; ішемічна кардіоміопатія; прогеніторні клітини; інтраміокардиальні трансплантація.

**Zaporozhan V.N., Kholodkova E.L., Karpenko Yu.I., Kozlov V.P., Kozlov Yu.V.** Genetic aspects of the cell therapy effectiveness in case of ischemic cardiomyopathy // Украинский медицинский альманах. – 2014. – Том 17, № 1. – С. 155-158.

Main etiological factors of the ischemic heart disease are exogenous and endogenous. Main endogenous factors are genetic. It is known more than 150 genes, whose polymorphisms bind with development of cardiovascular diseases. The allelic variants 4G/5G of plasminogen activator inhibitor PAI-1, G-174C gene interleukin 6 (IL-6) and G-308A gene tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) are of particular interest. This cytokines takes a key role not only in the system of fibrinolysis, inflammatory reactions, but also in the pathogenesis of atherosclerotic coronary artery disease, myocardial remodeling processes in the presence of ischemic lesions and cell proliferation.

**Purpose.** The aim of this study was evaluation of the influence of polymorphisms of G-174C gene interleukin 6 (IL-6) and G-308A gene tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) on the progression of congestive heart failure (CHF) and ischemic cardiomyopathy (ICMP) and influence on effectiveness of intramyocardial transplantation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with ICMP.

**Materials and methods.** The study comprises 45 patients with ICMP, who are resistant to standard drug or surgical therapy and 45 healthy people. Patients with ICMP were divided into 2 groups: in group #1 (n=15) intramyocardial transplantation of PBMC was performed, group #2 (n=30) underwent standard drug therapy. Polymorphisms of genes were determined by means of polymerase chain reaction for all patients of the study. Isolation of mononuclear cells was carried out by gradient centrifugation method. The intramyocardial transplantation was performed after creating electromechanically maps of left ventricular (LV) in the hibernating myocardium zones by means of NOGA.XP Navigation System and catheter MyoStar.

**Results.** The result showed the absence of correlation between carriage of polymorphisms G-174C gene IL-6 and G-308A gene TNF $\alpha$  and severe progression of ICMP or influence on effectiveness of transplantation.

**Perspectives.** Further investigations of polymorphisms of proinflammatory cytokines and influence of their allelic variants on the left ventricular remodeling are needed. It is also advisable to study the influence of intramyocardial transplantation of mesenchymal-stromal cell fraction of bone marrow.

**Key words:** Interleukin 6; tumor necrosis factor; ischemic cardiomyopathy; progenitor cells; intramyocardial transplantation.

Ишемическая болезнь сердца этиологически является многофакторным заболеванием. Причинами развития данной патологии являются как экзогенные, так и эндогенные факторы. К главным эндогенным факторам относят генетические [1]. На сегодняшний день известно более 150 генов, полиморфные варианты которых связывают с развитием или неблагоприятным течением сердечно – сосудистых заболеваний [2]

Особый интерес представляет ген, кодирующий ингибитор активатора плазминогена PAI-I, и аллельные варианты генов провоспалительных цитокинов, таких как фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ) и интерлейкина (IL-6). Данные цитокины принимают участие не только в системе гемостаза, провоспалительных реакциях, но и в патогенезе атеросклероза. Доказано, что G/G генотип полиморфизма G-174C IL-6 существенно повышает риск ишемических осложнений [3], в то время как C/C полиморфизм наоборот обладает протективным эффектом [4]. Также известно непосредственное участие TNF $\alpha$  в процессах восстановления поврежденного миокарда [5].

Несмотря на все достижения современных методов лечения (оптимальную медикаментозную терапию, фармакологическую реперфузию, чрескожную реваскуляризацию миокарда), отдаленный прогноз для этой группы пациентов остается неблагоприятным. Результатом обширного инфаркта миокарда левого желудочка (ЛЖ) является последующее нарушение его сократительной функции, патологическое ремоделирование и, как следствие, формирование тяжелой хронической сердечной недостаточности (ХСН). Трансплантация сердца может быть единственной эффективной опцией в лечении пациентов, которые резистентны к оптимальной медикаментозной терапии. Но практическое ее использование ограничено этическими проблемами и нехваткой донорских органов [6].

Интрамиокардиальная трансплантация стволовых и прогениторных клеток мононуклеарной фракции периферической крови (МКПК) – является новым подходом в лечении пациентов с ИКМП [7, 8]. Наиболее высокоточным методом доставки клеточных транс-

плантатов в сердце является имплантация клеточной взвеси при помощи навигационной системы NOGA.XP. При сопоставлении вольтажных карт и карт сократимости миокарда ЛЖ определяются зоны гибернированного или «спящего» миокарда для последующей имплантации стволовых клеток.

На сегодняшний день не до конца ясны все механизмы, посредством которых МКПК улучшают сократительную способность миокарда ЛЖ и причины отсутствия в некоторых случаях эффекта от проводимой клеточной терапии [9]. Наши исследования свидетельствуют о влиянии 4G/5G полиморфизма PAI-I на эффективность клеточной терапии и прогноз ИКМП [10]. Выяснено, что носительство 4G/4G полиморфизма PAI-I является предиктором тяжелого течения ХСН и фактором риска развития ИКМП. Определено, что при данном аллельном варианте целесообразно выполнять интрамиокардиальную трансплантацию МКПК как можно раньше.

Целью данного клинического исследования было изучение влияния носительства различных полиморфизмов G-174C гена IL-6 и G-308A TNF $\alpha$  на прогноз и эффективность клеточной терапии ИКМП. Исследование проводилось в рамках НИР кафедры внутренней медицины №1 с курсом сердечно-сосудистой патологии Одесского национального медицинского университета «Эндокардиальная и внутрикоронарная имплантация аутологичных стволовых клеток больным с ишемической болезнью (ИБС) и дилатационной кардиомиопатией» (гос.№ 0112U003435).

**Материалы и методы.** Критериями включения в исследование были: больные в возрасте от 45-75 лет, страдающие резистентной к медикаментозному и хирургическому лечению ИКМП СН III-IV NYHA.

Основными критериями не включения были: перенесенный инфаркт миокарда в пределах 3 месяцев, выполнение операции стентирования или аорто-коронарного шунтирования в пределах 3 месяцев, онкопатология, беременность. Всего в исследование включили 45 пациентов больных ИКМП, которых разделили на две группы. В первую группу (n=15) вошли пациенты, которые принимали стандарт-

ную медикаментозную терапию, и которым была выполнена операция интрамиокардиальной трансплантации МКПК. Во вторую группу (n=30) включили пациентов, которые принимали только стандартную медикаментозную терапию. Для сравнения частоты полиморфизмов генов и их влияния на процессы ремоделирования миокарда ЛЖ при интрамиокардиальной трансплантации МКПК дополнительно была сформирована третья группа, состоящая из здоровых людей (n=45).

Всем участникам исследования определяли G-174C полиморфизм IL-6 и G-308A TNF $\alpha$  при помощи полимеразной цепной реакции [11]. Сравнение частоты полиморфизмов генов TNF $\alpha$  и IL-6 больных ИКМП проводили с частотой встречаемости в группе здоровых людей (группа №3).

Стимуляцию гемопоэза выполняли за сутки до процедуры лейкафереза при помощи подкожного введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) филграстим в дозе 48 млн. ЕД.

Процедуру лейкафереза выполняли при помощи сепаратора клеток крови Fresenius COM.TEC.

Процессинг лейкаферезной взвеси выполнялся в условиях блока высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга в ламинарном боксе биологической защиты. Выделение мононуклеарной фракции клеток проводилось методом градиентного центрифугирования по стандартной методике [12]. В качестве градиента плотности использовался фиколл-гистопак (Sigma-Aldrich, Англия). По-

лученная клеточная взвесь для трансплантации концентрировалась в 8 мл раствора натрия хлорида в концентрации 0,9 %.

Количество мононуклеаров подсчитывали при помощи световой микроскопии в камере Горяева. Минимальная концентрация клеток должна была составлять не менее 100 млн клеток в мл. Жизнеспособность мононуклеаров определяли окраской раствора трепанового синего в концентрации 0,4 % по стандартной методике. Необходимый уровень жизнеспособности клеток для интрамиокардиального введения должен был составлять не менее 92 %.

Определение зон гибернированного миокарда и трансплантация клеточной взвеси выполнялась при помощи системы NOGA.XP Navigation System.

Морфофункциональные характеристики миокарда ЛЖ пациентов определяли через 1, 6 и месяцев после процедуры трансплантации. Наиболее важными исследованиями, которые для этого использовались, были: повторное электрокардиографическое картирование ЛЖ при помощи навигационной системы NOGA.XP и ЭхоКС.

**Результаты.** При изучении полиморфизма гена IL-6 было отмечено, что пациенты с ИКМП в 20 % (n=9) случаев были носителями C/C полиморфизма, в 46.6 (n=21) случаев – C/G полиморфизма и в 33.4 % (n=15) случаев G/G полиморфизма (таблица 1). В здоровой группе частота встречаемости составила C/C – 24.4 % (n=11), C/G – 48.8 % (n=22), G/G – 26.8 % (n=12).

Таблица 1. Распределение некоторых аллельных вариантов генов IL-6 и TNF $\alpha$

Группы	IL-6			TNF $\alpha$		
	C/C	C/G	G/G	A/A	A/G	G/G
Группа с ИКМП (n=45)	20% (n=9)	46.6% (n=21)	33.4% (n=15)	4.4% (n=2)	24.4% (n=11)	71.2% (n=32)
Здоровая группа (n=45)	24.4% (n=11)	48.8% (n=22)	26.8 (n=12)	2.2% (n=2)	28.8% (n=13)	69 (n=31)

Для TNF $\alpha$  в группе пациентов с ИКМП частота встречаемости полиморфизмов была следующая: A/A – 4.4 % (n=2); A/G – 24.4 % (n=11); G/G – 71.2 (n=32). В здоровой группе частота составила: A/A – 2.2 % (n=1); A/G – 28.8 % (n=13); G/G – 69 (n=31).

При сравнении частоты встречаемости полиморфизмов в обеих группах ни в случае IL-6, ни в случае TNF $\alpha$  достоверная разница не выявлена.

Процедуру стимуляции гемопоэза и лейкафереза все пациенты перенесли удовлетворительно. Существенных побочных явлений не наблюдалось. Все клеточные трансплантаты после процессинга соответствовали требованиям протокола.

Процедуру картирования ЛЖ и интрамио-

кардиальной трансплантации МКПК все пациенты перенесли удовлетворительно. Во время и после процедуры не отмечалось нарушений проводимости и появления угрожающих жизни аритмий. Послеоперационный период у всех пациентов протекал без осложнений.

При контрольных обследованиях пациентов в первой группе отмечилось существенное улучшение насосной функции сердца по сравнению со второй группой, где операция выполнена не была. Данные подтвердились при заключительном картировании миокарда ЛЖ при помощи навигационной системы NOGA.XP.

Также отмечено, что максимальный эффект развивался через 6 месяцев после трансплантации (табл.2).

**Таблица 2.** Динамика некоторых показателей насосной функции ЛЖ. «\*» - отмечены достоверно значимые результаты

Показатели \ Время наблюдения	До имплантации МКПК	30 дней после имплантации МКПК	3 мес. после имплантации МКПК	6 мес. после имплантации МКПК	12 мес. после имплантации МКПК
Группа 1 (ФВ %)	23.7±0.4	24.7±0.2	28.0±0.2*	32.0±0.1*	33.0±0.1*
Группа 2 (ФВ %)	23.7±0.2	23.3±0.1	23.2±0.2	23.0±0.1	23.9±0.1
Группа 1 (КДО мл)	249.5±1.6	250.4±0.4	243.0±0.1*	211.0±0.1*	208.1±0.1*
Группа 2 (КДО мл)	248.9±1.0	250.5±0.2	249.1±0.2	251.0±0.1	249.3±0.1

### Обсуждение полученных результатов.

Носительство различных аллельных вариантов генов IL-6 и TNF $\alpha$  не влияют на течение ХСН и ИКМП. Доказано, что различные полиморфизмы данных генов не являются фактором риска развития ремоделирования миокарда ЛЖ, результатом которого является развитие ишемической кардиомиопатии.

МКПК достоверно улучшают насосную функцию ЛЖ. Несмотря на трансэндокардиальный интрамиокардиальный путь введения клеточной взвеси угрожающих жизни аритмий не возникает. Выделение МКПК при помощи лейкофереза является предпочтительным способом для пациентов с сердечно – сосудистой патологией ввиду его малой травматичности.

**Выводы:** Различные аллельные варианты генов IL-6 и TNF $\alpha$  не являются предикторами ремоделирования миокарда ЛЖ у пациентов с ХСН и не могут быть использованы как прогностические критерии выбора ранней интрамиокардиальной трансплантации МКПК.

**Перспективы дальнейших исследований.** Необходимо дальнейшее изучение полиморфизмов генов провоспалительных цитокинов и влияние их аллельных вариантов на процессы ремоделирования миокарда у больных ИКМП. Также целесообразно изучение влияния интрамиокардиальной трансплантации мезенхимально-стромальной фракции клеток костного мозга.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Баранов В.Г. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / В. Г. Баранов. – М.: Н-Л, 2009. – С. 232-233;
2. Kathiresan S. Genetics of human cardiovascular disease / S. Kathiresan, D. Srivastava // Cell. - 2012. – Vol.148 (6). – P.1242 – 1257;
3. Synergistic effect of -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke / R. Pola, A. Flex, E. Gaetani [et al.] // Stroke. – 2003. – Vol.34 (4). – P. 881-885;
4. Balding J. The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischemic stroke in patients without a history of hypertension / J. Balding, W. J. Livingstone // Ir J Med Sci. – 2004. – Vol. 173 (4). – P. 200-203;
5. Ablation of TNF-alpha receptors influences mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection against ischemia / J. Tan, B.R. Weil, A.M. Abarbanell [et al.] // Shock. – 2010. – Vol. 34(3). – P. 236 – 242;
6. Cardiac progenitor cells and bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells for cardiac repair after myocardial infarction / X.L. Tang, D.G. Rokosh, Y. Guo [et al.] // Circ J. – 2010. – Vol. 74(3). – P. 390-404;
7. Effects of peripheral blood stem cell mobilization with granulocyte-colony stimulating factor and their transcortical transplantation after primary stent implantation for acute myocardial infarction / C. Steinwender, R. Hofmann, J. Kammler [et al.] // Am Heart J. – 2006. – Vol. 151(6). – P. 1296 – 1313;
8. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy // D.M. Leistner, U. Fischer-Rasokat, J. Honold [et al.] // Clin Res Cardiol. – 2011. – Vol. 100(10). – P. 925 – 934;
9. Yamahara K. Pathological role of angiostatin in heart failure: an endogenous inhibitor of mesenchymal stem-cell activation / K. Yamahara, K.D. Min // Heart. – 2009. – Vol. 95. – P. 283–289;
10. Intramyocardial transplantation of peripheral progenitor cells in patients with ischemic cardiomyopathy and carriage of the 4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor type 1 gene (PAI-1) / V.N. Zaporozhan, Yu.I. Bajora, Yu.I. Karpenko [et al.] // Journal of Health Sciences. – 2013. – Vol. 3 (10). – P. 275 – 286;
11. Germ-line MTHFR C677T, FV H1299R and PAI-1 5G/4G Variations in Breast Carcinoma / F. Ozen, E. Erdis, E. Sik, [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. – 2013. – Vol. 14(5). – P. 2903 – 2908;
12. Jaatinen T. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient / T. Jaatinen, J. Laine // Curr Protoc Stem Cell Biol. – 2007. – Vol. 2. – P. 39 – 45.

Надійшла 10.12.2013 р.

Рецензент: проф. Ю.Г.Бурмак