

УДК: 616.12-005.4-085.361-056.7

## Ю.В. Козлов ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРЕПЯТСТВУЮТ ПРОЦЕССАМ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ МИОКАРДА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

*Одесский национальный медицинский университет*

**Козлов Ю.В.** Прогениторные клетки периферической крови препятствуют процессам ремоделирования миокарда левого желудочка при ишемической кардиомиопатии // Украинський морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 65-68.

**Цель.** Данное клиническое исследование было направлено на изучение влияния интрамиокардиальной трансплантации аутологичных прогениторных клеток моноклеарной фракции периферической крови (МКПК) на процессы ремоделирования миокарда левого желудочка (ЛЖ) при ишемической кардиомиопатии (ИКМП).

**Материалы и методы.** В исследование включено 45 пациентов с ИКМП. Больных разделили на 2 группы: в первой группе (n=15) выполнялась интрамиокардиальная трансплантация МКПК, вторая группа (n=30) получала стандартную медикаментозную терапию.

**Результаты.** В результате исследования установлено, что интрамиокардиальная трансплантация МКПК препятствует процессам ремоделирования миокарда ЛЖ при ИКМП.

**Ключевые слова:** Ишемическая кардиомиопатия; прогениторные клетки; интрамиокардиальная трансплантация; периферическая кровь.

**Козлов Ю.В.** Прогениторні клітини периферичної крові протистоять процесам ремоделювання міокарду лівого шлуночка при ішемічній кардіоміопатії // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 65-68.

**Мета.** Дане клінічне дослідження було спрямоване на вивчення впливу інтраміокардіальної трансплантації аутологічних прогениторних клітин моноклеарної фракції периферичної крові (МКПК) на процеси ремоделювання міокарду лівого шлуночка (ЛШ) при ішемічній кардіоміопатії (ІКМП).

**Матеріали та методи.** У дослідження включено 45 пацієнтів з ІКМП. Хворих розділили на 2 групи: у першій групі (n = 15) виконувалася інтраміокардіальна трансплантація МКПК, друга група (n = 30) отримувала стандартну медикаментозну терапію.

**Результати.** У результаті дослідження встановлено, що інтраміокардіальна трансплантація МКПК перешкоджає процесам ремоделювання міокарду ЛШ при ІКМП.

**Ключові слова:** Ішемічна кардіоміопатія; прогениторні клітини; інтраміокардіальна трансплантація; периферична кров.

**Kozlov Yu.V.** Progenitor cells of peripheral blood resist the processes of remodelling of myocardium of the left ventricle in ischemic cardiomyopathy // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 1. – С. 65-68.

Internal medicine № 1 with the course of cardiovascular pathology department (head of the department medical sciences doctor, professor Karpenko Yu.I.)

Pathology of the heart muscle, which leads to acute or chronic ischemia, is the cause of persistent decreasing of working capacity and disability of the patients. Percutaneous coronary revascularization with optimal drug therapy with ACE inhibitors, or angiotensin-1 antagonists,  $\beta$ -blockers, aldosterone antagonists and statins are capable to decrease the process of myocardial remodeling and left ventricular failure. But despite the modern approaches to therapy in some patients develop adverse myocardial remodeling process that correlated with poor prognosis. Modern approaches to the treatment of the cardiovascular system's diseases based on the use of stem and progenitor cells.

**Purpose.** The aim of this clinical study was evaluation of the influence of intramyocardial transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells (PBMC) on remodeling of the myocardium of the left ventricle (LV) in patients with ischemic cardiomyopathy (ICMP).

**Materials and methods.** The study comprises 45 patients with ICMP. Patients were divided into 2 groups: in group 1 (n=15) intramyocardial PBMC transplantation was performed, group № 2 (n=30) underwent a standard drug therapy. The isolation of mononuclear cells was carried out by gradient centrifugation method recommended in literature. To create a density gradient a sterile polysaccharose and diatrizoate solution with density gradient 1.077 g/ml (Sigma-Aldrich, UK) was used. The intramyocardial transplantation of progenitor cells was performed after creating elektromechanical maps of left ventricular (LV) in the hibernating myocardium zones by means of NOGA.XP Navigation System and catheter MyoStar.

**Results:** Results showed that intramyocardial PBMC transplantation reduces remodeling of myocardium of the LV in patients with ICMP. Significant improvement in the LV myocardium's morphs-functional characteristics occurred in 3 months after implantation. The most pronounced effect was observed after 6 months. In the control mapping noted a significant improvement in ventricular conduction and contractile activity of the left ventricular myocardium. These effects are apparently due to a paracrine effect of PBMC. PBMC immediately differentiate into cardiomyocytes – the heart's own stem cells.

**Perspectives.** Further investigations of intramyocardial transplantation of mesenchymal cell fraction of the bone marrow and adipose tissue on the left ventricular remodeling are needed.

**Key words:** Ischemic cardiomyopathy; progenitor cells; intramyocardial transplantation; peripheral blood.

Считается, что сердце является постмитотическим органом с ограниченной способностью к восстановлению. Патология сердечной мышцы, к которой приводит острая или хроническая ишемия, является причиной стойкого снижения работоспособности и инвалидизации пациентов [1].

Черескожная коронарная реваскуляризация совместно с оптимальной медикаментозной терапией ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента или антагонистами ангиотензина-1,  $\beta$ -блокаторами, антагонистами альдостерона и статинами способна препятствовать процессам ремоделирования миокарда и левожелудочковой недостаточности. Но, несмотря на современные подходы к терапии у части пациентов развиваются неблагоприятные процессы ремоделирования миокарда, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом [2].

Современные подходы к терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы основаны на применении стволовых и прогениторных клеток. Они являются потенциально новыми терапевтическими опциями, которые наиболее активно изучаются в регенеративной медицине. Проведены многочисленные клинические исследования I и II фазы, которые убедительно продемонстрировали улучшение сократительной функции миокарда левого желудочка в ответ на интрамиокардиальную имплантацию мононуклеарной фракции клеток костного мозга и прогениторных клеток при инфаркте миокарда и ишемической кардиомиопатии [3, 4].

Помимо мононуклеарной фракции костного мозга источниками полипотентных стволовых клеток могут быть: периферическая кровь, обонятельная зона слизистой оболочки полости носа, пуповинная кровь, жировая ткань и т.д. Однако, использование периферической крови как первичного цитологического материала для получения взвеси, содержащей необходимое количество стволовых и прогениторных клеток для клеточной терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы имеет неоспоримые преимущества перед другими источниками [5, 6].

Наиболее высокоточным методом доставки клеточных трансплантатов в сердце является имплантация клеточной взвеси при помощи навигационной системы NOGA.XP [7, 8]. Данная навигационная система предназначена для построения и анализа вольтажных карт и карт сократимости миокарда левого желудочка (ЛЖ). При сопоставлении этих карт определяются зоны гибернированного или «спящего» миокарда для последующей имплантации стволовых клеток [9].

Целью нашего клинического исследования было изучение влияния интрамиокардиальной трансплантации мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) на процессы ремоделирования миокарда ЛЖ при ишемической кардиомиопатии (ИКМП). Исследование проводится в рамках НИР кафедры внутренней ме-

дицины №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.** В исследование включались мужчины и женщины в возрасте от 45 до 75 лет, больные ИКМП СН III-IV NYHA. Пациенты должны были быть резистентны к оптимальной медикаментозной терапии. Также, необходимым условием являлось противопоказание или неэффективность хирургических методов прямой реваскуляризации миокарда либо отсутствие положительного результата операции.

В исследование не включались больные, которые перенесли инфаркт миокарда, операцию стентирования или аорто-коронарного шунтирования в пределах 3-х месяцев. Также критериями невключения были наличие онкопатологии и беременность.

Всего было включено 45 пациентов, которых разделили на две группы. В первой группе (n=15) больным выполнялась интрамиокардиальная трансплантация МКПК. Вторая группа (n=30) была контрольной. В нее вошли пациенты, которые принимали оптимальную медикаментозную терапию.

Для стимуляции гемопоэза и выхода прогениторных клеток из костного мозга в периферическую кровь пациентам первой группы назначался гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) филграстим в дозе 48 млн ЕД.

Сбор первичного цитологического материала (ПЦМ), которым являлась лейкоферезная взвесь, выполнялся при помощи сепаратора клеток крови Fresenius COM.TEC. На протяжении всей процедуры лейкофереза постоянно контролировалось общее состояние больного, выполнялся кардиомониторинг.

Приготовление клеточных трансплантатов выполнялось в условиях боксов биологической защиты. Изоляция мононуклеарных клеток проводилась при помощи градиентного центрифугирования, методом, рекомендованным в литературе. Для создания градиента плотности использовался стерильный раствор фиколистопака 1,077 г/мл (Sigma-Aldrich, Англия). Полученная клеточная взвесь для трансплантации помещалась в 8 мл раствора натрия хлорида концентрацией 0,9 %.

Перед отправкой в операционную в клеточных трансплантатах определяли содержание мононуклеаров при помощи световой микроскопии в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определялась по стандартной методике окраской клеточной взвеси раствором трепанового синего в концентрации 0,4 %.

Для построения электромеханических карт и определения зон гибернированного миокарда

ЛЖ при помощи навигационной системы NOGA.XP Navigation System использовался катетер MyoStar. В качестве дополнительных методов визуализации катетера в полости ЛЖ использовалось внутрисердечное УЗИ.

Для оценки эффективности и безопасности процедуры имплантации через 1, 3, 6 и 12 месяцев после операции участники исследования проходили клиническое обследование. Оно включало в себя: общеклинические тесты, ЭхоКС, ЭКГ, толерантность к физическим нагрузкам. Для оценки морфофункциональных характеристик миокарда левого желудочка учитывали ФВ и КДО по данным ЭхоКС и данные электромеханического картирования миокарда ЛЖ через 12 мес.

**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе, при мобилизации МКПК из костного мозга в периферическую кровь, наиболее частыми жалобами больных были: гриппоподобные симптомы, усиление одышки, усиление жалоб на стенокардию. Угрожающих жизни по-

бочных явлений ни в одном из случаев не отмечалось.

Во время лейкафереза 3 пациентов беспокоили характерные явления «цитратной» интоксикации, которые купировали внутривенным введением раствора кальция глюконата в концентрации 0,9 %.

Клеточные трансплантаты после процессинга были стерильны по результатам бактериологических исследований и содержали от 100 млн до 200 млн моноклеарных клеток в 1 мл, жизнеспособность которых составляла 92-98 %.

Процедуру картирования и интрамиокардиальной трансплантации все пациенты перенесли удовлетворительно. Во время и после операции не отмечалось появления угрожающих жизни аритмий.

При наблюдении за пациентами первой группы отмечалось постепенное, в течение года, улучшение морфофункциональных характеристик (МФХ) миокарда ЛЖ.

**Таблица 1.** Динамика показателей фракции выброса (ФВ) (%) ЛЖ

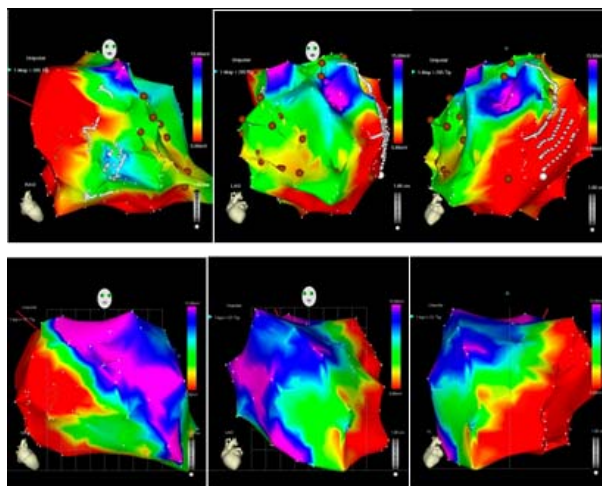
Время наблюдения / Показатели	До имплантации МКПК	30 дней после имплантации МКПК	3 мес. после имплантации МКПК	6 мес. после имплантации МКПК	12 мес. после имплантации МКПК
Группа 1	23.7±0,4	24.7±0.2	28.0±0.2*	32.0±0.1*	33.0±0.1*
Группа 2	23.7±0.2	23.3±0.1	23.2±0.2	23.0±0.1	23.9±0.1

«\*» - отмечены достоверно значимые результаты

**Таблица 2.** Динамика показателей конечно-диастолического объема (КДО) (мл) ЛЖ

Время наблюдения / Показатели	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	249.5±1.6	250.4±0.4	243.0±0.1*	211.0±0.1*	208.1±0.1*
Группа 2	248.9±1.0	250.5±0.2	249.1±0.2	251.0±0.1	249.3±0.1

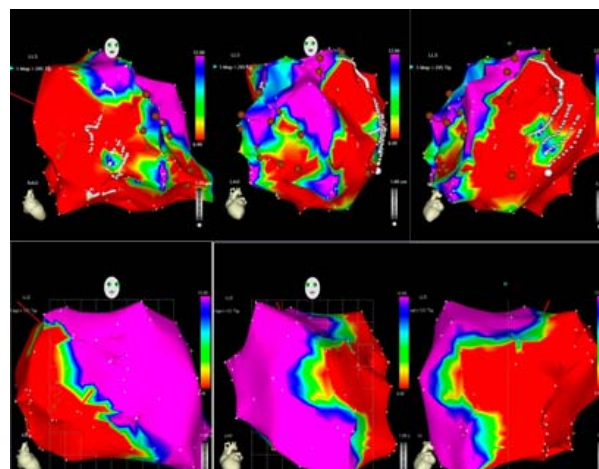
«\*» - отмечены достоверно значимые результаты



**Рисунок 1.** Сравнение униполярных вольтажных карт ЛЖ.

Достоверное улучшение МФХ миокарда ЛЖ наступило через 3 месяца после имплантации. Наиболее выраженный эффект наблюдался через 6 месяцев. При контрольном картиро-

вании желудочка отмечено существенное улучшение проводимости и сократительной активности миокарда ЛЖ.



**Рисунок 2.** Сравнение карт сократимости ЛЖ.

Данные эффекты, очевидно, обусловлены паракринным влиянием МКПК, непосредственной дифференцировкой МКПК в кардиомио-

циты и стимуляцией кардиомиобластов – собственных стволовых клеток сердца [10-11].

Приостановка процессов ремоделирования миокарда ЛЖ является чрезвычайно важным эффектом клеточной терапии, т.к. при этом существенно улучшается качество и продолжительность жизни больных ИКМП.

Верхний ряд составляют карты ЛЖ при трансплантации, нижний – повторное картирование через 12 месяцев. Красный цвет соответствует отсутствию электрического потенциала, фиолетовый – максимальному потенциалу. Отмечается значительное улучшение проводимости в зонах инъекций.

Верхний ряд составляют карты ЛЖ при трансплантации, нижний – повторное картирование через 12 месяцев. Красный цвет соответствует отсутствию сократимости, фиолетовый – максимальной сократимости. Отмечается значительное улучшение сократимости в зонах инъекций.

**Выводы:** Интрамиокардиальная трансплантация мононуклеарных клеток периферической крови при ишемической кардиомиопатии препятствует процессам ремоделирования и дилатации миокарда левого желудочка, улучшая его морфофункциональные характеристики. Данную процедуру рекомендовано применять у пациентов с низкой фракцией выброса левого желудочка с выраженными процессами ремоделирования и дилатации, которые резистентны к оптимальной медикаментозной терапии.

#### **Перспективы дальнейших исследований.**

Целесообразно изучение влияния интрамиокардиальной трансплантации мезенхимальной фракции клеток костного мозга и жировой ткани на процессы ремоделирования миокарда левого желудочка.

### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:**

1. Life and Death of Cardiac Stem Cells A Paradigm Shift in Cardiac Biology / P. Anversa, J. Kajstura, A. Leri, [et al.] // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113. – P. 1451-1463;
2. Ong H. T. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors (ACEIs) and Angiotensin-Receptor Blockers (ARBs) in Patients at High Risk of Cardiovascular Events: A Meta-Analysis of 10 Randomised Placebo-Controlled Trials / H. T. Ong, L. M. Ong, J. J. Ho // *SRN Cardiol*. – 2013. – Vol. 6.- P. 478597;
3. Annarosa L. Cardiovascular regeneration and Stem cell Therapy / L. Annarosa, A. Piero, W. H. Frisman // *Blackwell future*. – 2007. – P. 37-38;
4. Intramyocardial Transplantation of Autologous CD34+ Stem Cells for Intractable Angina / W. Losordo, R. A. Schatz, C. J. White [et al.] // *Circulation*. – 2007. – Vol. 115. – P 3165-3172;
5. Daisy A. In vivo generation of B-cell-like cells from CD34+ cells differentiated from human embryonic stem cells / A. Daisy, A. Ersek, N. M. Varain // *Experimental Hematology*. – 2010. – Vol. 38. – P 516-525;
6. Куртова А.В. Методы банкирования пуповинной крови. / А. В. Куртова, Е. Е. Зуева, Л. М. Фрегатова // *Иммунология*. – 2005. – Т.6. – С. 25-31;
7. Perin E.C. Methods of stem cell delivery in cardiac diseases. / E. C. Perin, J. López // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. – 2006. – Vol. 3(1). – P. 110-113;
8. Roncalli J. Autologous bone marrow cells and ischemic cardiomyopathy. / J. Roncalli, P. Lemarchand // *Future Cardiology*. – 2011. – Vol. 7(5). – P. 603-607;
9. Imaging Long-Term Fate of Intramyocardially Implanted Mesenchymal Stem Cells in a Porcine Myocardial Infarction Model / C. Emerson, M. Tian, C. Frank [et al.] // *Plos one*. – 2011. – Vol. 6(9). – P. 30 – 35;
10. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? / M. Ratajczak, M. Kucia, T. Jadczyk [et al.] // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26(6). – P. 1166-73;
11. Crisostomo P. R. Stem cell mechanisms and paracrine effects: potential in cardiac surgery / P. R. Crisostomo, M. Wang, T. A. Markel // *Shock*. – 2007. – Vol. 28(4). – P. 375-83.

*Надійшла 18.12.2013 р.  
Рецензент: проф. С.А.Кашенко*