

Использование системной трансплантации «кардиомиобластов», полученных из мезенхимальных стволовых клеток аутогенного костного мозга, при комплексной терапии больных с хронической сердечной недостаточностью

А.Ф. Цыб, А.Г. Коноплянников, М.А. Каплан, О.Е. Поповкина, Л.А. Лепехина,
С.Ш. Кальсина, И.В. Семенова, Е.В. Агаева, А.А. Даниленко

ГУ Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск

Use of the systemic transplantation of cardiomyoblasts produced from mesenchymal stem cells of autologous bone marrow during complex therapy of patients with chronic heart failure

A.F. Tsyb, A.G. Konoplyannikov, M.A. Kaplan, O.E. Popovkina, L.A. Lepechina,
S.Sh. Kalsina, I.V. Semenova, E.V. Agaeva, A.A. Danilenko

SI the Medial Radiological Research Center of RAMS, Obninsk

В пилотном клиническом исследовании изучали эффект системной (внутривенной) трансплантации кардиомиобластов, выращиваемых в культуре после обработки мезенхимальных стволовых клеток аутогенного костного мозга специфическим индуктором кардиомиоцитарной дифференцировки — 5-азациитидином, у 46 больных с хронической сердечной недостаточностью, получавших общепринятый курс медикаментозной терапии. Методика получения кардиомиобластов и мезенхимальных стволовых клеток была лицензирована Федеральным Агентством по надзору в области здравоохранения (лицензия ФС-2006/206 от 11 августа 2006 г.). Было показано, что клеточная терапия с использованием аутогенных кардиомиобластов минимально инвазивна, не вызывает каких-либо осложнений (аллергических реакций, жизнеугрожающих аритмий, эмболий, тяжелых гемодинамических расстройств и др.) и не приводит к ухудшению состояния после ее проведения. В первые 3–6 мес. после системной пересадки клеток-предшественниц кардиомиоцитов у пациентов улучшалась сократительная способность и увеличивалась перфузия миокарда, что клинически проявлялось в уменьшении степени выраженности сердечной недостаточности с дальнейшей длительной стабильной компенсацией (до 1–2 лет наблюдения).

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, клеточная терапия, аутогенные мезенхимальные стволовые клетки, кардиомиобласты.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания, по данным медицинской статистики последних лет, являются основной причиной смерти населения и главной проблемой здравоохранения всех экономически развитых стран [1, 2]. При этом до 60% сердечно-сосудистой смертности приходится на инфаркты миокарда и сердечную недостаточность, а смертность в течение одного года наблюдения у больных с клинически выраженной сердечной недостаточностью достигает 26–29%, причем у больных пожилого и старческого возраста она колеблется в интервале от 10 до 50% [1–5]. Считается, что развитие хронической сердечной недостаточности (ХСН) с последующим переходом в стадию декомпенсации, связано с прогрессирующим ремоделированием миокарда [6, 7]. Структурно-функциональные изменения всех отделов сердца при постинфарктном ремоделировании левого желудочка отрицательно влияют на

In the pilot clinical study we investigated the effect of systemic (intravenous) transplantation of cardiomyoblasts which have been received by action of specific inducer of cardiomyogenic differentiations — 5-azacytidine on cultured from autologous bone marrow mesenchymal stem cells at 46 patients with the chronic heart failure received also the standard course of medicamentous therapy. The technique of cardiomyoblasts and mesenchymal stem cells production has been licensed by Federal Agency on Supervision in the Field of Public Health Services (license FA-2006/206 from August, 11th, 2006). It has been shown that the cell therapy with use of autologous cardiomyoblasts has minimal invasiveness, it does not cause any complications (allergic reactions, hazardous to health arrhythmia, embolism, heavy frustration of haemodynamics, etc.) and also does not lead to level of health after cells transplantation. In the first 3–6 months after systemic transplantation of progenitor cells for cardiomyocytes we developed at patients advanced heart contractive activity and increased myocardium perfusion that was clinically shown in reduction of the heart failure level with further long stable health compensation (till 1–2 years of monitoring).

Key words: chronic heart failure, cell therapy, autologous mesenchymal stem cells, cardiomyoblast.

сократимость миокарда, диастолическое расслабление, сердечный выброс и другие показатели при прогрессировании ХСН.

Для лечения ХСН в настоящее время используется широкий спектр лекарственных средств, электрофизиологические, хирургические и механические методы, в том числе аортокоронарное шунтирование, трансплантация сердца и др. [8, 9]. Однако частота развития и распространенность ХСН неуклонно нарастает, что требует разработки новых, доступных и эффективных методов лечения.

Принципиально новый подход к лечению ХСН появился с разработкой концепции так называемой «регенеративной терапии», направленной на восстановление во взрослом организме утраченных и поврежденных кардиомиоцитов путем трансплантации стволовых клеток. Благодаря внедрению в медицинскую практику достижений фундаментальных исследований в области мо-

лекулярной и клеточной биологии, стало возможным разрабатывать новые способы лечения с использованием костномозговых мезенхимальных стволовых клеток и их дифференцированного в определенную клеточную линию потомства [10–12].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были открыты выдающимся отечественным исследователем А.Я. Фриденштейном около 40 лет назад [13] и в настоящее время стали наиболее перспективным агентом для использования в клеточной терапии [11, 14, 15]. Это связано с относительной простотой культивирования этой популяции стволовых клеток и с широтой возможных дифференцировок (феномен «пластичности» МСК). Данный тип стволовых клеток способен дифференцироваться в клетки самых разных типов тканей взрослого организма и, что принципиально важно, в кардиомиоциты [16, 17]. В последние годы началась усиленная экспериментальная разработка и пилотные клинические исследования по применению аутогенных МСК и получаемых из них клеток-предшественниц кардиомиоцитов для улучшения кровоснабжения миокарда, сократимости и, возможно, с целью профилактики сердечной недостаточности у больных с ишемической болезнью сердца [14–22]. На данный момент предложены несколько методов доставки стволовых клеток в миокард: интрамиокардиальный, интракоронарный, трансэндокардиальный, внутривенный (так называемый, системный) [10, 11, 14, 15, 20, 22–24]. Внутривенный путь введения — наиболее простой и наименее инвазивный метод, не требующий хирургических и эндоскопических вмешательств [10]. Концепция эффективности внутривенного метода введения стволовых клеток основана на существовании эффекта «хоуминга» — усиления миграции МСК и дифференцированных в направлении кардиомиоцитов клеток-предшественниц в места поврежденного миокарда [25–29].

Наибольшее число экспериментальных исследований, необходимых для обеспечения безопасности и эффективности клинического применения МСК в начале XXI века касались преимущественно их использования при различных поражениях сердечной мышцы. Было обнаружено, что при воздействии на культивируемые МСК 5-азациитидином в культуре появляются клетки, начинающие дифференцировку в направлении кардиомиоцитов, которые в соответствии с принятой терминологией следует называть кардиомиобластами. В наших предшествующих работах было показано, что они отличаются от исходных МСК, в частности, имеют повышенную радиорезистентность, большее содержание в популяции двуядерных и полиплоидных клеток, специфические проявления эффекта хоуминга и др. [11, 30, 31]. На модели поврежденного адрямицином миокарда [11, 31, 32], а также модели инфаркта миокарда, вызванного перевязкой коронарного сосуда [33], нами и другими авторами было установлено, что в поврежденной ткани повышается локальная концентрация провоспалительных цитокинов, вследствие чего усиливается специфическая адгезия системно трансплантированных кардиомиобластов в капиллярах данной ткани с последующим повышением перехода этих клеток в поврежденные участки и активизацией процессов регенерации, вплоть до восстановления гистоструктуры поврежденного миокарда. Эти материалы послужили экспериментальной основой для подачи заявки на лицензирование метода получения при выращивании аутогенного костного мозга культур МСК и клеток-предшественниц кардиомиоцитов (кардиомиобластов), пригодных для начала

предварительных клинических испытаний при лечении заболеваний, связанных с повреждением сердечной мышцы различного генеза. После рассмотрения представленных материалов применяемый в ГУ МРНЦ РАМН метод получения культур аутогенных МСК и кардиомиобластов был лицензирован Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и соцразвития МЗиСР РФ (лицензия ФС-2006/206 от 11 августа 2006 г.) и разрешен для научных исследований.

Литературные данные немногочисленных пилотных клинических исследований по применению стволовых клеток у пациентов с ХСН неполны и часто противоречивы [12, 15, 19, 20, 22]. Кроме того, у авторов этих работ можно констатировать различия в оценке необходимого для трансплантации клеточного материала, не установлен наиболее адекватный способ введения стволовых клеток и применены различные методы оценки клинической эффективности клеточной терапии заболеваний сердца. В то же время положительные предварительные результаты проводимых в различных странах мира клинических и экспериментальных исследований обосновывают актуальность, перспективность и достаточную безопасность метода трансплантации аутологичных МСК и получаемых из них кардиомиобластов при лечении пациентов с ХСН. Поэтому целью данной работы явилась разработка метода применения аутологичных кардиомиобластов в комплексном лечении пациентов с ХСН. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи: разработать методику внутривенного введения аутогенных кардиомиобластов, выращенных из костномозговых МСК; оценить безопасность и эффективность системного введения аутогенных кардиомиобластов; разработать алгоритм диагностического контроля эффективности лечения и оценить эффект лечения в сроки наблюдения не менее 1–2 лет с возможностью принять решение о повторной трансплантации аутологичных кардиомиобластов (образцы которых сохранялись в созданном в нашем Центре криобанке стволовых клеток) для усиления лечебного эффекта через 1–1,5 года после первой системной клеточной трансплантации.

Материал и методы

Пациенты

В проведенном пилотном исследовании участвовало 46 пациентов (40 мужчин и 6 женщин); в возрасте от 52 лет до 80 лет. Распределение по ФК было следующим: ХСН II ФК (NYHA) — 23 человека (50%), III — 15 человек (32,6%), IV — 8 человек (17,4%). У 8 пациентов в анамнезе проведение хирургического (АКШ) или эндоваскулярного лечения. 4 пациента имели имплантированный водитель ритма (ЭКС, ИКД). Дизайн исследования представлен на рис. 1. Критерием включения пациента в исследование было: наличие подтвержденного заболевания ишемической болезнью сердца с ХСН II–IV ФК (NYHA), неэффективность ранее проводимой терапии и информированное согласие пациента; а критериями исключения — наличие злокачественных новообразований и гематологических заболеваний; наличие положительных реакций на гепатиты В и С, ВИЧ, сифилис; нестабильная стенокардия; инфаркт миокарда в течение последних 6 месяцев. В период участия больного в пилотном исследовании базисная медикаментозная терапия, назначенная в соответствии с существующими рекомендациями ВНОК и ОССН по лечению сердечной недостаточности (редакция 2006 г.), не менялась. Все пациенты получали адекватную лекарственную терапию

в соответствии с тяжестью состояния. У каждого пациента получали информированное согласие, форма которого была одобрена локальным Этическим комитетом.

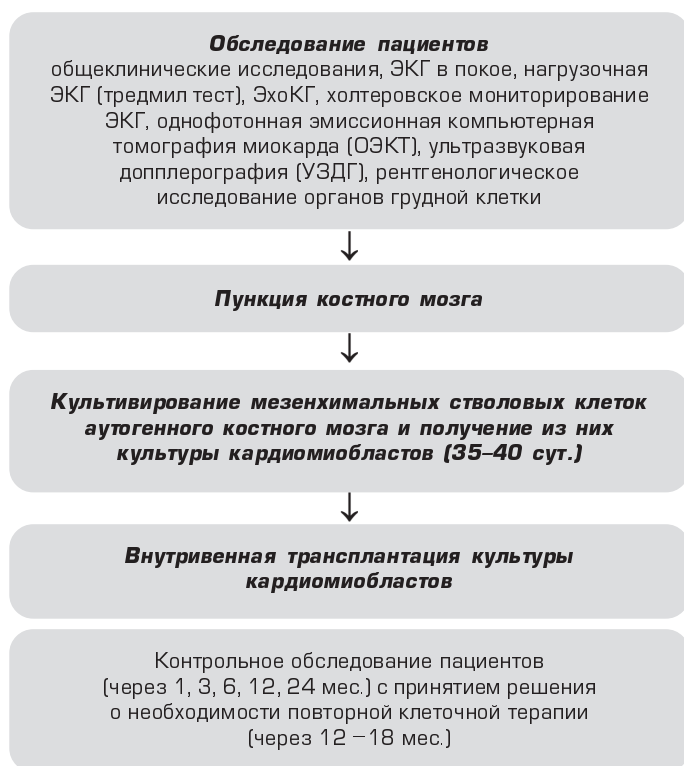


Рис. 1. Дизайн исследования

Получение клеток культуры аутогенных кардиомиобластов

Использованная модификация методики получения культуры кардиомиобластов из МСК аутологичного костного мозга описана нами ранее [11]. Кратко она основана на непродолжительной обработке культуры аутогенных МСК 5-азацитидином на 3-и сут. после высаживания клеток пунктата костного мозга в культуру и последующего размножения клеток в течение 35–40 сут. до получения 200–300 млн клеток, которые используются для системной трансплантации пациенту. Полученные кардиомиобласты имели фенотип $CD10^{low}$, $CD34$, $CD45^{-}$, $CD105^{+}$, $CD117^{-}$, $c-kit^{-}$, который характерен для МСК и их клеточного потомства. При кариотипическом исследовании они представляют смесь диплоидных и полиплоидных клеток, причем сохраняют исходный хромосомный профиль кариотипа человека без повышения спонтанного уровня хромосомных aberrаций. В целях безопасности введения клеток в организм пациента все полученные культуры проходили перед клиническим применением бактериологическое обследование. Одновременно небольшое количество выращенных кардиомиобластов (порядка 4×10^7 клеток) сохранялись в созданном в ГУ МРНЦ РАМН криобанке для возможности рекультивирования при повторной трансплантации и для проведения дополнительных медицинских исследований.

Методика введения кардиомиобластов

Перед трансплантацией клеток пациенту исходную суспензию кардиомиоцитов (200–300 млн клеток) осаждали центрифугированием и добавляли к осадку 200 мл изотонического раствора натрия хлорида с прибавлени-

ем гепарина (10 Ед/мл), до введения пациенту полученную суспензию сохраняли при температуре тающего льда. Трансплантация кардиомиобластов пациентам проводилась путем однократного внутривенного капельного введения в течение 40–60 мин в локтевую вену с помощью инфузомата (Инфузомат Спейс, В Braun) под контролем изменений артериального давления, частоты сердечных сокращений и термометрии. 20 пациентам по материалам наблюдения за динамикой изменения клинических показателей были проведены повторные трансплантации кардиомиобластов через 1–1,5 года для получения более выраженного эффе́кта.

Схема обследования пациентов

Всем пациентам до лечения и в контрольные сроки проводили следующие обследования:

- 1) ЭКГ в 12 стандартных отведениях;
- 2) суточное мониторирование ЭКГ по Холтеру;
- 3) тредмил-тест с дозированной физической нагрузкой;
- 4) эхо-КГ;
- 5) однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОЭКТ) миокарда с $Tc^{99m}MIBI$ в покое.

Всем пациентам также проводились общеклинические лабораторные, рентгеновские и доплерографические исследования. Для исключения онкопатологии проводилось УЗИ и анализы крови на онкомаркеры.

Нагрузочная проба на тредмиле проводилась с использованием диагностической станции CS-200 SHILLER. У больных, которым предстояло введение стволовых клеток, оценивался функциональный класс стенокардии напряжения, определялась исходная толерантность к физической нагрузке. Тредмил-тест проводился также на этапах контроля после введения стволовых клеток с целью оценки эффективности лечения посредством определения изменения толерантности к физической нагрузке и ФК стенокардии напряжения.

Эхокардиографическое исследование проводилось на аппарате ACUSON CV-70, с использованием секторного датчика 2–4 МГц. Исследование проводилось из парастерального доступа по длинной и короткой оси левого желудочка (ЛЖ), а также верхушечного доступа в четырех- и двухкамерной позиции. Состояние сердечной мышцы оценивали по наличию гипертрофии миокарда, наличию или отсутствию зон нарушения локальной сократимости. Состояние клапанного аппарата оценивалось по скоростным показателям, измерения которых проводились с использованием импульсно-волнового (PW) и постоянно-волнового (CW) доплера. Для исследования систолической функции ЛЖ измеряли конечные диастолический и систолический размеры. Рассчитывались показатели конечного диастолического и систолического объемов (КСО, КДО), а также ударного объема, фракции выброса и функции укорочения ЛЖ. Для исследования диастолической функции проводилось измерение скоростных показателей трансмитрального кровотока. Оценивали скорости раннего (Е) и позднего (А) наполнения ЛЖ и соотношении данных скоростей (Е/А).

Исследование перфузии миокарда и определение его сократительной способности проводилось с помощью перфузионной сцинтиграфии миокарда с ЭКГ-синхронизацией. Использовали двухголовочный эмиссионный компьютерный томограф E.cam (фирмы Siemens) и одноголовочный компьютерный томограф Sophy.camera (Франция). Для проведения исследования вводился радиофармпрепарат Tc^{99m} -технетрил — аналог метокси-

изобутилизомета (MIBI). Лучевая нагрузка на все тело составляла 2,5 мЗв, что позволяло проводить контрольные обследования пациентов в течение года, не превышая допустимой лучевой нагрузки (16 мЗв). Данный метод позволяет определить локализацию, распространенность коронарной ишемии, оценить сократительную способность миокарда ЛЖ. Обработка полученных томографических срезов проводилась методом полярного картирования. Для обработки полученных результатов в необходимых случаях применяли стандартные методы вариационной статистики [34], применяя пакет программ статистической обработки данных «STATISTICA 5.0» (Statistica for Windows, Release 5.0, Stat Soft Inc., USA).

Результаты и обсуждение

Как было отмечено выше, перед началом пилотных клинических исследований были проведены экспериментальные исследования лечебного эффекта получаемых из аутогенных МСК кардиомиобластов крыс линии Вистар и человека, которые послужили научной базой для получения лицензии Росздравнадзора на приготовление клеточных культур для научных исследований, а также для разработки дизайна предпринятого исследования, проводимого по утвержденному протоколу, разработанному в рамках участия нашего Центра в отраслевой программе РАМН «Новые клеточные технологии — медицине» [11]. При этом главной задачей на начальном этапе работы было безусловное обеспечение безопасности трансплантации аутогенных кардиомиобластов, для чего ряд авторов этой статьи добровольно делали такие трансплантации себе, а также соглашались на дополнительное изучение получаемых культур и их переносимости (изучение кариотипа, хромосомных aberrаций, маркеров, особенностей роста клеток в культуре и при трансплантации облученным и необлученным животным в диффузионных камерах, переносимость при аутогенном и аллогенном внутрикожном введении и др.). Описанное ниже пилотное исследование началось только после того как удалось убедиться в безопасности трансплантации получаемых культур аутогенных клеток.

В проведенной работе при использовании для оценки состояния здоровья пациентов таких показателей, как диаметр аорты, степень раскрытия аортального клапана, размеры левого предсердия, толщина межжелудочковой перегородки и толщина задней стенки левого желудочка, статистически значимых изменений у пациентов на протяжении всего периода наблюдения за ними не отмечалось. Размеры правого предсердия изменялись следующим образом: через 1 и 3 мес. после системной трансплантации аутологичных кардиомиобластов статистически значимых различий с исходным уровнем не отмечалось; через 6 мес. эти различия были значимыми ($Z=1,826$ $p<0,05$), причем данный показатель снизился в 57% случаев и в остальных 43% пациентов — не повысился. Если то, что данный показатель не увеличивался тоже принять за положительный эффект (с учетом тяжести сердечной недостаточности), то через полгода после проведения клеточной терапии улучшение наблюдается у 100% пациентов. Изменения размеров правого желудочка также были статистически значимыми через 6 мес. после клеточной терапии — показатель снизился в 78% случаев и в 11% остался прежним, т.е., положительный эффект наблюдался в 89% случаев ($Z=1,82$ $p<0,05$); снижение этого показателя в процентах от исходного уровня составило 12,4%. Однако уже через 3 мес. имелась тенденция к снижению данного показателя ($Z=1,268$ $p<0,2$) в 56%

случаев, а в 22% случаев — он не изменился, т.е., положительный эффект клеточной терапии можно констатировать в 78% случаев. Процент снижения данного показателя от исходного значения составил 7,14%. Через 1 год значимых различий с исходными показателями у данных пациентов не было выявлено. Отмечалась тенденция к снижению конечного диастолического размера через 1 мес. после проведения клеточной терапии — у 75% пациентов ($Z=1,54$ $p<0,15$), а через 3 мес. — у 60% пациентов, через 6 мес. и 1 год значимых различий не было выявлено. При оценке конечного систолического размера тенденция к снижению показателя отмечалась через 1 мес. у 75% пациентов ($Z=1,26$ $p<0,2$) — показатель снизился на 5,4%; через 3 мес. снижение было уже значимым ($Z=1,93$ $p<0,05$) — показатель снизился у 80% пациентов на 14 % от исходного уровня; через 6 мес. положительный эффект наблюдался в 73% случаев, показатель снизился на 13,5 %; через 1 год сохранялось достоверное снижение показателя ($Z=1,68$ $p<0,05$) в 87,5% случаев, снижение показателя в процентах от исходного уровня составило 2,2%. Конечный диастолический объем статистически значимо снижался через 1 мес. на 23,7% в 85,7% случаев ($Z=1,69$ $p<0,05$); через 3 мес. снижение сохранялось значимым ($Z=2,103$ $p<0,025$) в 80% случаев, показатель снизился на 20,7% от исходного; через 6 и 12 мес. значимого различия с исходными значениями не выявили. При оценке конечного систолического объема отмечалась тенденция к снижению через 1 мес. ($Z=1,352$ $p<0,1$) — в 71,4% случаев показатель снизился на 28,3%; через 3 мес. нарастала тенденция к снижению ($Z=1,53$ $p<0,07$) — в 80% случаев показатель снизился на 26,9% от исходного; через 6 и 12 мес. достоверных отличий не было выявлено. Достоверное увеличение ударного объема отмечалось через 1 мес. после клеточной терапии ($Z=1,85$ $p<0,05$) в 28,6% случаев; через 3,6, 12 мес. достоверных отличий не было выявлено. Фракция выброса левого желудочка достоверно возрастала к 3-му мес. после трансплантации клеток — в 75% случаев показатель повысился на 17% ($Z=2,441$ $p<0,01$); через 1, 6 и 12 мес. достоверные различия не были выявлены. Показатель функции укорочения передне-заднего размера достоверно увеличивался через 3 мес. после клеточной терапии на 15,7% в 71,4% случаев ($Z=1,789$ $p<0,05$); тенденция к росту сохранялась и через 6 мес. — у 67% пациентов ($Z=1,067$ $p<0,2$), причем этот показатель увеличился на 17% от исходного значения; через 12 мес. достоверных различий не было выявлено. Таким образом, по большинству этой группы использованных тестов наблюдалось значимое улучшение на протяжении первого полугодия, а к концу первого года не наблюдалось значимых различий с этими показателями, т.е., имелась стабилизация исходного состояния без прогрессирования заболевания.

В качестве среднегрупповой характеристики временного тренда по данным эхокардиографии были использованы значения их медиан (рис. 2). Через 3 мес. после введения кардиомиобластов отмечалось достоверное уменьшение объемов ЛЖ (КСО, КДО) и увеличение сократимости миокарда (ФВ). Положительная динамика изменения КСО наблюдалась через 6 и 12 мес. Тенденция к снижению КДО отмечалась через 6 мес., через 12 мес. дальнейшей положительной динамики обычно не наблюдалось. Показатель сократимости миокарда достоверно увеличивался через 3 мес. после введения клеток, тенденция к увеличению отмечалась до года.

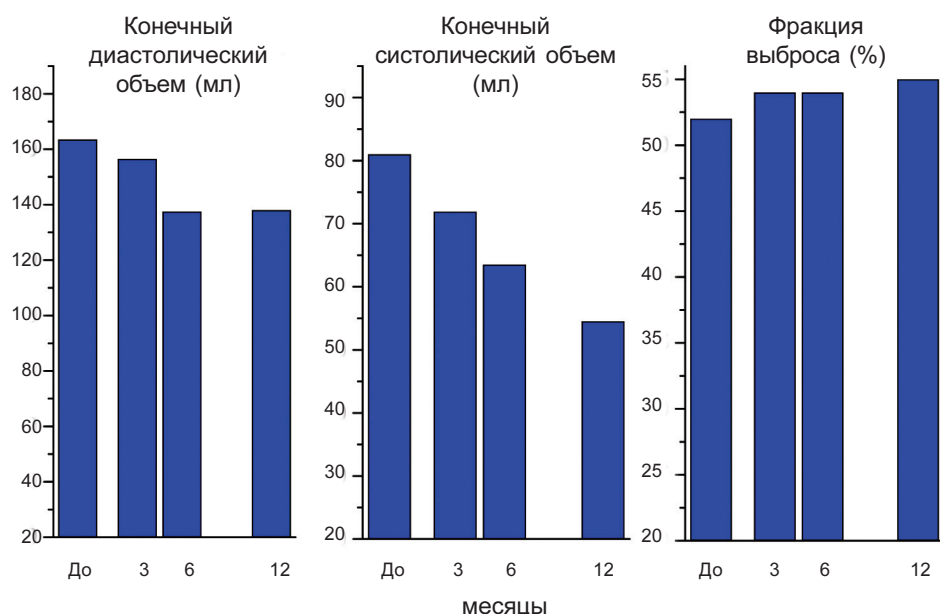


Рис. 2.
Динамика показателей ЭхоКГ у пациентов в течение первого года после системной трансплантации аутологичных кардиомиобластов. Изменения КДО, КСО и ФВ через 3, 6 и 12 мес. по сравнению с исходным уровнем статистически значимы ($p < 0,05$)

Учитывая тяжесть состояния пациентов и наличие противопоказаний к проведению нагрузочных проб, тредмил-тест не был проведен у всех пациентов, поэтому статистический анализ по этому показателю затруднен. В группе пациентов, которым возможно было провести это исследование, отмечалась положительная динамика в виде увеличения толерантности к физической нагрузке, снижения ФК стенокардии напряжения. Остальным 20 пациентам в сроки 1–1,5 года после первой клеточной провели вторую трансплантацию используя для выращивания клетки, хранившиеся в криобанке. Через 2 года удалось провести этот тест и у этих пациентов и он также позволил выявить во всех случаях положительную динамику. Это позволяет сделать важное заключение о возможности проведения у кардиологических пациентов повторных трансплантаций аутологичных кардиомиобластов, полученных из МСК, а также об эффективности культур, выращиваемых из хранившегося в криобанке материала.

При проведении холтеровского мониторингирования ЭКГ в динамике у всех пациентов наблюдалось уменьшение эпизодов нарушения ритма за сутки или отсутствие значимых нарушений без увеличения количества принимаемых пациентами антиаритмических средств. Ни в ранние, ни в более поздние сроки наблюдения за пациентами, получившими системную трансплантацию аутологичных кардиомиобластов, жизнеугрожающих нарушений ритма и проводимости не было зафиксировано.

Каких-либо существенных изменений большинства лабораторных данных у всех участников пилотного исследования в процессе наблюдения не было отмечено. Динамика изменений показателей свертывающей системы крови, липидного и углеводного обмена, в виде некоторого снижения их, требует дальнейшего наблюдения и углубленного анализа.

По динамике изменений клинического состояния пациентов (рис. 3) отмечено отчетливое улучшение, выражавшееся в уменьшении признаков сердечной недостаточности (одышки, отеков, снижении работоспособности, нарушения ритма, частоты приступов стенокардии и потребности в приеме нитратов, гликозидов, мочегонных средств), которое наблюдалось уже начиная с 1 мес. после трансплантации аутогенных кардиомио-

цитов клеток у 54,3% пациентов. В 45,7% случаев была достигнута клиническая компенсация и состояние больных оставалось стабильным на протяжении всего срока наблюдения, что применительно к таким тяжелым пациентам также оценивается позитивно. О клиническом улучшении свидетельствует также отсутствие потребности у пациентов в повторной госпитализации и стационарном лечении в течение первого года наблюдения, а также отсутствие летальных исходов.



Рис. 3. Характер изменений клинического состояния пациентов в течение 12 мес. наблюдения результатов клеточной терапии

По данным перфузионной сцинтиграфии миокарда с Tc^{99m} MIBI в покое у пациентов отмечалось уменьшение площади дефектов перфузии, увеличение областей нормально перфузируемого миокарда (рис. 4). Эти положительные изменения были значимыми с 3 мес. после трансплантации аутогенных кардиомиобластов и их выраженность нарастала до 12 мес. наблюдений, в последующем выраженного нарастания эффекта не было, исключая пациентов, которым проводилось повторное введение кардиомиобластов. Ни в одном случае проведения клеточной терапии аутогенными кардиомиобластами не отметили ухудшения перфузии миокарда.

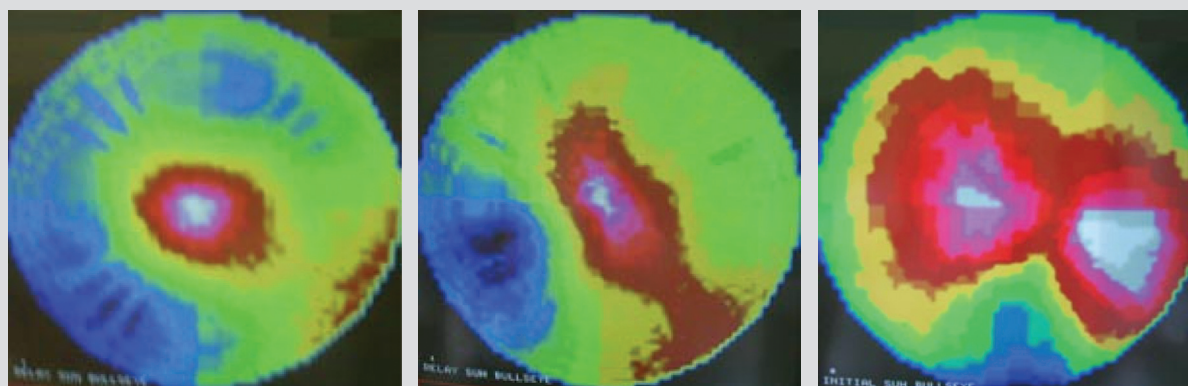


Рис. 4. Пациент Е. Динамика однофотонной эмиссионной КТ миокарда (радиофармпрепарат Tc^{99m} MIBI)

Переносимость введений культуры аутогенных кардиомиобластов была удовлетворительной. Из побочных эффектов можно отметить небольшую гемодинамическую гипотонию во время инфузии клеток и в течение 1–2 час. после введения, не требовавшую медикаментозной коррекции, а так же субфебрильную температуру в течение 12–24 час. после трансплантации клеток у некоторых пациентов (примерно у 4%).

Что касается механизмов лечебного эффекта аутологических кардиомиобластов, то на основании проведенных нами предклинических исследований, а также анализа литературы по этому вопросу [6–7, 9–12, 15, 19, 21, 25–28, 32–33] можно считать, что системно введенные аутологичные клетки способны к поступлению в поврежденную сердечную мышцу и могут разными путями тормозить процессы ремоделирования поврежденной ткани (ослабляя поток окислительных радикалов, процессы апоптоза, аутоиммунные процессы и др.) и инициировать репаративные процессы, которые касаются как кардиомиоцитов (своеобразный «кардиомиогенез»), так и сосудов сердца. Конечно, для более полного понимания механизмов лечебного действия клеточных трансплантаций необходимо дальнейшее проведение, в первую очередь, экспериментальных работ [14].

Для демонстрации типичной картины реализации лечебного эффекта системной трансплантации аутологических кардиомиобластов приводится клинический пример одного из наших пациентов.

Пациент Е.В.Г., 1939 г.р.

Основной диагноз: ИБС. Постинфарктный кардиосклероз (2001 г. инфаркт миокарда передней распространенной локализации с рецидивом через 1 мес.). Атеросклероз аорты, коронарных артерий. Стенокардия напряжения II ФК. Состояние после АКШ, МКШ в 2002 г. ХСН III ФК (NYHA). Гиперлипидемия. Артериальная гипертензия II ст., риск IV.

Анамнез заболевания: ИБС в течение 20 лет, в мае 2001 г. — ОИМ передней распространенной локализации, рецидив — в июне 2001 г. В феврале 2002 г. — АКШ, МКШ. Сохранились приступы стенокардии при физических нагрузках, нарастала сердечная недостаточность — одышка даже при незначительной нагрузке, отеки, требующие постоянного приема больших доз диуретиков.

Исходное состояние: Стенокардия напряжения II ФК, выраженный акроцианоз, пастозность нижних конечностей, одышка при спокойной ходьбе. По данным ЭхоКГ снижена глобальная сократимость миокарда ЛЖ (ФВ 42%, ФУ 20,02%), начальные признаки легочной ги-

пертензии, недостаточность митрального и трикуспидального клапанов. По данным сцинтиграфии миокарда: выраженное диффузное снижение перфузии по передней, перегородочной, задней стенкам ЛЖ, снижение сократительной способности миокарда.

Проведена трансплантация аутогенных кардиомиобластов $3,1 \times 10^8$ клеток — в 200 мл физиологического раствора, внутривенно капельно в течение 60 мин.

Побочные эффекты — отсутствуют. АД, ЧСС, t° — не изменялись.

Контрольное обследование: через 1 мес. — приступы стенокардии — редкие, одышка не беспокоит, отеков нет, увеличилась толерантность к физическим нагрузкам по данным тредмил-теста, по ЭхоКГ — нет признаков легочной гипертензии и регургитации на клапанах, сократительная функция улучшилась (ФВ 54,4%, ФУ 28%). При проведении сцинтиграфии миокарда: уменьшился дефект перфузии в передне-перегородочной области, увеличилось накопление РФП в области верхушки и боковой стенки ЛЖ.

Через 6 и 12 мес. — дальнейшая положительная динамика в виде увеличения толерантности к физическим нагрузкам, урежения приступов стенокардии. По данным ЭхоКГ нормализовалась сократительная функция миокарда, по данным сцинтиграфии: значительное улучшение перфузии миокарда, сократительная способность в норме (рис. 4).

По результатам проведенного исследования возможно сделать следующие выводы.

1. Методика внутривенной трансплантации аутогенных кардиомиобластов, полученных из костного мозга человека, минимально инвазивна, безопасна, поскольку не вызывает каких-либо осложнений (аллергических реакций, жизнеугрожающих аритмий, эмболий, тяжелых гемодинамических расстройств и др.), не приводит к ухудшению состояния пациентов с клинически выраженной ХСН во время трансплантации клеток и в более отдаленные сроки наблюдения. При повторной трансплантации кардиомиобластов, выращенных из хранившихся в криобанке первичных культур, через 1–1,5 года после первой трансплантации также не выявлено каких-либо неблагоприятных реакций.

2. В результате проведенного комплексного лечения (сочетание клеточной терапии с адекватной лекарственной терапией хронической сердечной недостаточности в соответствии с тяжестью состояния) у пациентов улучшалась сократительная способность и увеличивалась

перфузия миокарда, что наиболее показательно выявлялось при проведении ЭхоКГ и перфузионной сцинтиграфии миокарда.

3. Результаты проведенной терапии клинически проявлялись в уменьшении степени выраженности сердечной недостаточности и длительной стабильной компенсации (до 1–2 лет наблюдения). При этом улучшилось качество жизни пациентов, уменьшилась потребность в усилении лекарственной терапии и повторных госпитализациях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оганов Р.Г., Поздняков Ю.М., Карпов Ю.А. Новые подходы к лечению больных стабильной ишемической болезнью сердца. Кардиология 2004; 144(10): 95–102.
2. Alexander K.P., Newby L.K., Cannon C.P. et al. Acute coronary care in the elderly, part I: Non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology: in collaboration with the Society of Geriatric Cardiology. Circulation 2007; 115(19): 2549–69.
3. Eagle K.A., Lim M.J., Dabbous O.H. et al. GRACE Investigators. A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month postdischarge death in an international registry. JAMA 2004; 291(22): 2727–33.
4. Kannel W.B., Kannel G., Paffenbarger R.S. Heart rate and cardiovascular mortality: The Framingham Study. Am. Heart J. 1987; 113(6): 1489–594.
5. Оганов Р.Г., Поздняков Ю.М., Волков В.С. Ишемическая болезнь сердца. М.: Изд. дом «Синергия» 2004: 320.
6. Spinale F.G., Gunasinghe H., Sprunger P.D. et al. Extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and progression to heart failure. J. Card. Fail. 2002; 8, 6 Suppl: 332–8.
7. Fedak P.W., Verma S., Weisel R.D., Li R.K. Cardiac remodeling and failure. From molecules to man (Part II). Cardiovasc. Pathol.; 2005; 14(2): 49–60.
8. Fihn S.D., Williams S.V., Daley J., Gibbons R.J. Guidelines for the management of patients with chronic stable angina: treatment. Ann. Intern. Med. 2001; 135(8, Pt. 1): 616–32.
9. API expert consensus document on management of ischemic heart disease. J. Assoc. Physicians India 2006; 54: 469–80.
10. Barbash J.M., Chouraqui P., Baron J. et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. Circul. 2003; 108(7): 863–8.
11. Цыб А.Ф., Конопляников А.Г., Колесникова А.И., Павлов В.В. Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека. Вестник Российской Академии медицинских наук 2004, 59(9): 71–6.
12. Mimeault M., Batra S.K. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. Stem Cells 2006; 24(11): 2319–45.
13. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. 1970; 3(4): 393–403.
14. Dimaraki I., Habib N.A., Gordon M. Y. Adult bone marrow-derived stem cells and the injured heart: just the beginning? Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2005; 28(5): 665–76.
15. Minguell J.J., Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. Exp. Biol. Med. 2006; 231(1): 39–49.
16. Xu W., Zhang X., Qian H. et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp. Biol. Med. (Maywood) 2004; 229(7): 623–31.
17. Shim W.S., Jiang S., Wong P. et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.; 2004; 324(2): 481–8.

Таким образом, результаты проведенного в нашей стране первого пилотного исследования с использованием лицензированных Росздравнадзором аутологических кардиомиобластов, выращиваемых из МСК костного мозга пациентов, показали достаточную эффективность применения данного метода при лечении больных с хронической сердечной недостаточностью различного генеза, что согласуется с данными пока немногочисленных исследований, проведенных за рубежом [12, 15, 19, 20, 22].

18. Moscoso I., Centeno A., Lypetz E. et al. Differentiation «in vitro» of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. Transplant. Proc. 2005; 37(1): 481–2.
19. Haider H.K., Ashraf M. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005; 288(6): 2557–67.
20. Wang C.C., Chen C.H., Lin W.W. et al. Direct intramyocardial injection of mesenchymal stem cell sheet fragments improves cardiac functions after infarction. Cardiovasc. Res. 2008; 77(3): 515–24.
21. Mimeault M., Hauke R., Batra S.K. Stem cells: a revolution in therapeutics—recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. Clin. Pharmacol. Ther. 2007; 82(3): 252–64.
22. Wollert K.C., Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. Circul. Res. 2005; 96(2): 151–63.
23. Molina E.J., Palma J., Gupta D. et al. Improvement in hemodynamic performance, exercise capacity, inflammatory profile, and left ventricular reverse remodeling after intracoronary delivery of mesenchymal stem cells in an experimental model of pressure overload hypertrophy. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2008; 135(2): 292–9.
24. Perin E.C., Silva G.V., Assad J.A. et al. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. J. Mol. Cell Cardiol. 2008; 44(3): 486–95.
25. Penna C., Raimondo S., Ronchi G. et al. Early homing of adult mesenchymal stem cells in normal and infarcted isolated beating hearts. J. Cell Mol. Med. 2008; 12(2): 507–21.
26. Dawn B., Stein A.B., Urbanek K. et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. PNAS USA 2005; 102(10): 3766–71.
27. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Murry C.E. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. Circul. 1999; 100(2): 193–202.
28. Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. Cells Tissues Organs 2001; 169(1): 12–20.
29. Gregory C.A., Ylostalo J., Prockop D.J. Adult bone marrow stem / progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental «niches» in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. Science's STKE 2005; 294: 37.
30. Семенкова И.В., Колесникова А.И., Лепехина Л.А. и др. Различия в радиочувствительности мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс и человека и полученных из них кардиомиобластов. Цитокины и воспаление 2005; 4(2): 112.
31. Семенкова И.И. Радиочувствительность мезенхимальных стволовых клеток и получаемых из них для целей клеточной терапии клеток-предшественников кардиомиоцитов. Автореф. дисс. ...канд. биол. наук. Обнинск, ГВ МРНЦ ПАМН; 2008: 18.
32. Khan M., Varadharaj S., Shobha J.C. et al. C-phycocyanin ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat cardiomyocytes. J. Cardiovasc. Pharmacol. 2006; 47(1): 9–20.
33. Hou M., Yang K.M., Zhang H. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. Int. J. Cardiol. 2007; 115(2): 220–8.

Урбах В.Ю. Биометрические методы. М.: Наука; 1964: 320.

Поступила 21.11.2008