

КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ

Клеточные технологии при гибридных операциях лечения хронической сердечной недостаточности

Ш.Д. Ахмедов, В.Е. Бабокин, М.Л. Дьякова*, И.В. Кистенева, И.Н. Ворожцова, И.Л. Буховец, А.Г. Лавров, В.М. Шипулин

НИИ кардиологии Сибирского отделения РАМН, Томск

Cell Technologies in Hybrid Surgery of Chronic Cardiac Insufficiency

Sh.D. Akhmedov, V.E. Babokin, M.L. D'yakova, I.V. Kisteneva, I.N. Vorozhtsova, I.L. Bukhovets, A. G.Lavrov, V.M. Shypulin

State Research Institute of Cardiology of the Tomsk Scientific Center, SB RAMS

Проведен анализ клинического опыта применения аутогенных мононуклеарных клеток костного мозга (МККМ) и фетальных клеток (ФК) в комбинации с хирургическими методами лечения пациентов с ишемической кардиомиопатией. Через год проспективного наблюдения установлено, что методики введения стволовых клеток безопасны и хорошо переносятся больными. Отмечено положительное влияние проведенного вмешательства на течение коронарной и сердечной недостаточности. Проводимое ультразвуковое исследование показало, что улучшение показателей внутрисердечной гемодинамики отмечалось только у больных после лечения фетальными клетками по сравнению с контрольной группой больных и группой лечения пациентов с помощью МККМ.

Ключевые слова: сердечная недостаточность, клеточные технологии, кардиохирургия.

Сердечная недостаточность является самым распространенным осложнением у больных, перенесших инфаркт миокарда. Использование традиционных методов лечения с применением современных лекарственных препаратов часто носит временный положительный клинический эффект у данной категории пациентов. В научной литературе мало работ, в которых проводится анализ клинического материала использования клеточной терапии [1, 2]. Пока нет окончательного мнения ни об используемом материале, ни об оптимальном способе введения клеток в миокард, ни об их количестве. Часто дискутируется вопрос о том, какие стволовые клетки (СК) лучше использовать в клинической практике: аутогенные, аллогенные, фетальные, либо эмбриональные? Не до конца изученным является вопрос о том, как поведут себя в дальнейшем клетки после их адресной доставки в миокард.

Поэтому целью нашей работы явился анализ клинического опыта применения аутогенных мононуклеарных клеток костного мозга (МККМ) и фетальных клеток (ФК) у тяжелой категории пациентов с ишемической кардиомиопатией.

Материал и методы

В исследование включено 94 больных ИБС, с постинфарктной дисфункцией левого желудочка, прояв-

Analysis of clinical experience of autologous mononuclear bone marrow cells (MBMC) and fetal cells (FC) use in combination with surgical methods of treatment in patients ischemic cardiomyopathy was made. A year of prospective follow-up period showed that methods of stem cells introduction are safe and well-tolerated by patients. Positive effect of the intervention performed on the course of coronary and heart insufficiency was noticed. Ultrasonic examination showed that improved values of intracardiac hemodynamic was noticed only in the patients after treatment with fetal cells in comparison with the control group of patients and with the group of patients treated with MBMC.

Key words: heart insufficiency, cellular technologies, cardiac surgery.

лениями сердечной недостаточности II–III ФК по NYHA. Было сформировано 3 группы больных: 1 группа – 38 пациентов, которым проводилась клеточная терапия с использованием МККМ во время хирургического вмешательства (аортокоронарное шунтирование и/или резекция аневризмы левого желудочка), либо эндоваскулярной реваскуляризации миокарда; 2 группа – 28 больных, которым также проводилась реваскуляризация миокарда в сочетании с клеточной терапией фетальными клетками; 3 группа – контрольная, ее составили 28 пациентов, перенесших реваскуляризацию миокарда без выполнения клеточной терапии. Пациенты всех групп были сопоставимы между собой по клинико-ангиологическим показателям. Срок проспективного наблюдения составил 1 год.

Следует отметить, что работа с МККМ проводилась в рамках научной темы ГУ НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН «Профилактика и лечение сердечной недостаточности в кардиохирургии. Фундаментальное обоснование современной стратегии», которая утверждена в СО РАМН. Основанием для использования ФК в клинической практике послужила статья Л.А. Бокерия с соавт. [3], а также решения Ученого Совета от 29.10.2004 г. и Этического комитета ГУ НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН от 22.11.2004 г. Все больные, которым в качестве лечения использовались стволовые клетки, подписывали информированное согласие.

e-mail: prima.maria@mail.ru

Выделение клеточного материала из костного мозга

Для выделения аутогенных МКМ получение костного мозга производили в условиях операционного блока из крыла подвздошной кости в количестве 100–120 мл. Из полученной взвеси клеток костного мозга выделяли МКМ методом градиентного центрифугирования [4]. После этого клетки ресуспендировались в концентрации 2×10^6 /мл. По данным Е.Д. Гольдберг [5], в общем составе МКМ содержится до 2% гемопоэтических стволовых клеток, остальную долю составляют клетки-предшественницы мононуклеаров. По данным проведенной проточной цитофлуориметрии суспензия МКМ у отдельных пациентов достигает следующего качественного и количественного состава: $5,4 \times 10^6$ CD34⁺; 1×10^6 CD34⁺/CD38⁻; $1,8 \times 10^6$ CD117⁺; $0,74 \times 10^6$ CD133⁺; $1,35 \times 10^6$ CD90⁺.

Выделение гемопоэтических фетальных клеток из исследуемого материала

Непосредственный забор биологического материала производился в клиниках ГУ НИИ акушерства, гинекологии и перинатологии Томского научного центра СО РАМН. Клетки печени, селезенки, тимуса выделялись из абортивного материала сроком гестации 9–12 нед. механическим способом в стерильных условиях в ламинарном боксе. Гемопоэтические клетки дезинтегрировали, суспензия отмывалась на центрифуге («BЕСКMAN», США) в отмывочной среде. Подсчитывали количество жизнеспособных гемопоэтических клеток с помощью трипанового синего. Проводилось определение жизнеспособности клеток (жизнеспособных клеток должно было быть не менее 85%). Непосредственно перед осуществлением выделения клеточного материала, производилось тестирование тканей на вирусоносительство (ВИЧ, гемоконтактные гепатиты). Затем проводили криоконсервирование гемопоэтических клеток. Общее количество вводимых клеток на одного пациента, как в условиях операционного блока, так и ангиографического кабинета составило $40 \pm 1,8 \times 10^6$. По данным проточной цитофлуориметрии качественный состав ФК перед их введением в сердце состоял: 16,52% CD34⁺; 13,27% CD38⁺; 7,16% CD34⁺/CD38⁻.

Методы введения клеточного материала в миокард

Техническая процедура доставки в сердце клеточного материала осуществлялась: в операционном блоке при выполнении основного этапа операции АКШ и в условиях ангиографического кабинета.

Доставка клеточного материала в сердце во время операции АКШ осуществлялась перед снятием зажима с аорты двумя способами: интрамиокардиального и внутривенного введения взвеси клеток. Интрамиокардиальный способ представлял собой радиальное введение шприцем клеток в миокард ЛЖ в 14–15 точках со стороны эпикарда. Расстояние между точками составляло 1,5–2 см. Глубина введения иглы в миокард до 1 см. В том случае, если операция АКШ сочеталась с резекцией аневризмы, то обкалывание производили со стороны эндокарда после иссечения аневризматического мешка. При этом введение клеток производилось по внутреннему диаметру левого желудочка с общим числом вколов до 10. Количество вводимых клеток на одну инъекционную точку составляло $150\text{--}200 \times 10^3$ клеток в 1 мл. Внутривенный способ включал в себя последовательное введение клеточного материала в коронарные

артерии через вновь сформированные шунты. Количество клеток на один шунт составляло $20\text{--}25 \times 10^6$ с концентрацией $1,5\text{--}2 \times 10^6$ в мл, и $13\text{--}22 \times 10^6$ фетальных клеток с концентрацией $3,8\text{--}4,2 \times 10^6$ в мл.

В условиях ангиографического кабинета МКМ вводились 17 пациентам с ИКМП. В их число вошли 2 пациента, которым ранее проводилось стентирование коронарных артерий, и 3 пациента, у которых спустя год после АКШ стали нарастать признаки сердечной недостаточности.

Результаты

При сравнительном анализе двух способов введения МКМ, внутривенного в условиях ангиоблока и сочетанного (внутривенного и интрамиокардиального) во время АКШ, были выделены 2 подгруппы пациентов, соответственно $n=17$ и $n=21$. У всех больных отмечалось клиническое улучшение, проявлявшееся в понижении степени сердечной недостаточности по классификации NYHA, а также в уменьшении ФК стенокардии.

Субъективное улучшение качества жизни по данным Миннесотского опросника отмечали все 17 пациентов, которым клеточная терапия проводилась в условиях ангиографического кабинета, а также большинство пациентов второй подгруппы. Толерантность к физической нагрузке при проведении теста 6-минутной ходьбы статистически значимо увеличивалась через 12 мес. после введения МКМ любым способом ($p=0,029$) по сравнению с исходным значением.

При изучении показателей функции левого желудочка у больных обеих групп нами установлена положительная динамика, при этом статистически значимых различий между двумя подгруппами выявлено не было.

Таким образом, в ходе статистического анализа динамики коронарной и сердечной недостаточности, показателей качества жизни, теста 6-минутной ходьбы, ЭхоКГ статистически значимого различия между показателями подгрупп получено не было, что позволило в дальнейшем выполнять межгрупповой сравнительный анализ без разделения на подгруппы по способу введения клеток.

Через 1 год проспективного наблюдения у пациентов всех трех групп отмечена положительная динамика в виде уменьшения выраженности и тяжести симптомов коронарной и сердечной недостаточности. В первой группе у трех пациентов (7%) через 1 год зарегистрированы нарушения ритма: в двух случаях желудочковая экстрасистолия III градации по Lown, у одного пациента — регистрировались пароксизмы фибрилляции предсердий. У одного пациента второй группы (использование фетальных клеток) зарегистрирован эпизод развития нестабильной стенокардии, причем при проведении коронарографии не выявлено прогрессирования атеросклероза в коронарном русле. Нарушения ритма в процессе наблюдения выявлены в 4 случаях (14%). В трех случаях у пациентов при обследовании через 1 год после вмешательства выявлены нарушения ритма — желудочковая экстрасистолия III и IV градации по Lown. В одном случае через 6 мес. после вмешательства регистрировался пароксизм желудочковой тахикардии и пароксизмальная форма фибрилляции предсердий. У двух пациентов с нарушениями ритма проводилась диагностическая коронаро-шунтография, которая выявила окклюзии ранее выполненных шунтов. Таким образом, можно предположить, что появление нарушений ритма у пациентов было вызвано состоянием ишемии миокарда на фоне нарушений проходимости шунтов, а не явилось

последствием клеточной терапии. В одном случае отмечено явное нарастание симптомов ХСН через 1 год — увеличение НК с 1 до 26, ФК по NYHA с II до IV, при проведении коронарографии также отмечено нарушение проходимости шунта, что возможно объясняет ухудшение состояния пациента. В группе контроля у трех пациентов (10,7%) в процессе проспективного наблюдения зарегистрированы нарушения ритма сердца в виде желудочковой экстрасистолы II градации по Lowp, в двух случаях (7%) — установлена постоянная форма фибрилляции предсердий.

В таблице 1 представлены показатели внутрисердечной гемодинамики у пациентов трех групп. Через 1 год после проведенного вмешательства определялась достоверная положительная динамика показателей (фракция выброса левого желудочка, конечный диастолический объем, конечный систолический объем) во всех группах. Необходимо отметить, что через 1 год в группе 2 (с применением фетальных клеток) отмечалось более низ-

кое значение КДО (134,5 мл) по сравнению с группой контроля (165,3 мл) и группой 1-МККМ (167,5 мл) при уровне значимости $p < 0,05$.

Согласно рекомендациям Американской ассоциации эхокардиографии оценивали сократимость 16 сегментов миокарда ЛЖ. Сократимость каждого сегмента оценивали в баллах: нормальная сократимость — 1 балл, гипокинезия — 2 балла, акинезия — 3 балла, дискинезия — 4 балла, гиперкинезия — 0 баллов. Сумму баллов делили на общее число исследованных сегментов. Недостаточно четко визуализированные сегменты не учитывали. Критериям жизнеспособности соответствовало улучшение регионарной сократимости миокарда на 1 балл и более в двух соседних сегментах. Динамика показателей локальной сократимости во всех группах имела одинаковую направленность: уменьшение количества гипокинетичных, акинетичных и дискинетичных сегментов и увеличение количества сегментов с нормальной сократимостью (табл. 2).

Таблица 1. Показатели внутрисердечной гемодинамики

Показатель	Группа контроль (N=28)	Группа 1 – МККМ (N=38)	Группа 2 – ФК (N=28)
Исходно:			
Конечный диастолический объем, мл	198,3 ± 28,7	187,6 ± 30,3	196,2 ± 36,2
Конечный систолический объем, мл	114,7 ± 41,4	110,2 ± 29,8	115,0 ± 35,9
Фракция выброса, %	44,0 ± 11,0	42,1 ± 8,0	42,3 ± 10,4
Через 1 год:			
Конечный диастолический объем, мл	165,3 ± 16,2*	167,5 ± 12,6*	134,2 ± 21,7*#
Конечный систолический объем, мл	86,3 ± 10,8*	83,5 ± 16,3*	67,2 ± 10,6*#
Фракция выброса, %	48,1 ± 2,0*	50,3 ± 3,2*	52,9 ± 2,2*#

Примечание: * — статистически значимые различия по сравнению с исходным состоянием ($p < 0,05$); # — статистически значимые различия по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$); \$ — статистически значимые различия по сравнению с группой 1 (МККМ) ($p < 0,05$).

Таблица 2. Динамика локальной сократимости по данным ЭхоКГ

Показатель	Срок	Абсолютное значение (%)		
		Контроль (N=28)	МККМ (N=38)	ФК (N=28)
Дискинез	Исход Через 1 год	30 (6,7%) 1 (0,6%)*	27 (9,9%) —	28 (7,6%) —
Акинез	Исход Через 1 год	64 (14,3%) 3 (1,9%)*	48 (17,6%) 1 (0,9%)*	57 (15,5%) 1 (0,2%)*
Гипокинез	Исход Через 1 год	138 (30,8%) 16 (10%)*	81 (29,8%) 10 (8,9%)*	117 (31,8%) 12 (5,8%)*
Асинергия	Исход Через 1 год	232 (51,8%) 20 (12,5%)*	156 (57,3%) 11 (9,8%)*	202 (54,9%) 13 (6,0%)*#
Нормокинез	Исход Через 1 год	216 (48,2%) 140 (87,5%)*	116 (42,7%) 101 (90,2%)*	166 (45,1%) 195 (93,75%)*#

Примечание: * — статистически значимые различия по сравнению с исходным состоянием ($p < 0,05$); # — статистически значимые различия по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

Через 1 год после операции в группе 2 (с применением фетальных клеток) наблюдались более выраженные изменения по сравнению с группой контроля. Количество асинергичных сегментов в группе 2 через 1 год составило 13 (6,0%) против 20 (12,5%) в группе контроля, а количество нормокинетичных сегментов — 195 (93,75%) и 140 (87,5%), соответственно (все при $p < 0,05$). Между группой 1 (с применением мононуклеарных клеток костного мозга) и группой контроля статистически значимых различий не выявлено.

Из параметров, характеризующих геометрию левого желудочка, через 1 год после лечения отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) уменьшение по сравнению с дооперационным состоянием продольных и поперечных размеров ЛЖ как в систолу, так и в диастолу во всех обследованных группах.

Обсуждение

Теоретически, в основе ожидаемого эффекта от воздействия клеточной терапии лежит теория асимметричного деления стволовой клетки, а именно когда стволовая клетка, попадая в новую для себя среду, в нашем случае миокард, начинает делиться на две клетки: себе подобную клетку и кардиомиоцит. Считается, что этот процесс кардиомиогенеза лежит в основе предотвращения дальнейшего ремоделирования миокарда после перенесенного острого инфаркта миокарда [2, 6]. Однако до настоящего времени неизвестно, какой фенотип клеток все-таки лучше использовать для решения этой важной задачи. Общеизвестно, что взвесь МККМ, которую мы использовали в своей работе, состоит из стволовых клеток (1,5–2%), а также мезенхимальных, гемопоэтических и эндотелиальных клеток-предшественниц [5]. Все эти клетки содержат большое количество различных биологически активных веществ, ростовых факторов, способных обеспечивать им не только их выживание в новой среде, но и вызывать стимуляцию регенерации поврежденных тканей реципиента. Особая роль при этом уделяется такому не менее значимому фактору как неогенез [7, 6].

На основании клинического материала мы с уверенностью говорим только о том, что искусственным путем создаем в отдельных местах миокарда высокую концентрацию стволовых клеток. Существует несколько способов введения клеток в миокард: во время открытой операции на сердце, когда клетки вводят непосредственно в коронарные артерии и методом обкалывания в толщу стенки левого желудочка, а также в условиях ангиографического кабинета, где клетки могут доставляться в сердце

через коронарные артерии, либо со стороны полости левого желудочка, используя специальный катетер с иглой. В предыдущей нашей работе одной из главных задач была попытка проследить у пациентов с ишемической кардиомиопатией пути миграции меченых радиоизотопной меткой МККМ, после их адресной доставки в миокард через коронарные артерии [7, 8]. Было показано, что при таком способе введения в миокарде, спустя 24 час., может фиксироваться только до 2% МККМ. Остальной, большой объем клеток в основном уходил в печень и селезенку. После чего мы сделали предположение, что способ введения МККМ в сердце может и не играть решающей роли в изменении клинической картины течения сердечной недостаточности у больных с ишемической КМП. В настоящей работе это нашло подтверждение, а именно показатели внутрисердечной гемодинамики в проспективном наблюдении у больных I группы достоверно не изменились по сравнению с пациентами контрольной группы.

Клиническое применение криоконсервированных фетальных клеток печени является актуальным [9] и перспективным направлением в трансплантологии [10]. По данным Ю.А. Петренко [11] содержание CD 45⁺ клеток в печени 6–12 нед. гестации составляет более 23%. По данным А.И. Тарасов с соавт. [9] содержание СК по маркерам CD34⁺ и CD 133⁺ составляет 0,9±0,1% и 0,4±0,1% соответственно. Аналогичные результаты получены и нами. Нам пока трудно объяснить клиническую эффективность, проявляющуюся в достоверных улучшениях показателей внутрисердечной гемодинамики у пациентов II группы в проспективном наблюдении. Либо это обусловлено изначально высоким содержанием СК в фетальной клеточной взвеси, либо имеет место особенность фенотипического взаимодействия между ФК и миокардом пациентов. Об этом свидетельствует и работа V.I. Grisichenko с соавт. [12], которые показали, что колониеобразующая способность фетальных клеток значительно выше, чем у клеток костного мозга человека.

Таким образом, наши предварительные клинические результаты по оценке нового гибридного способа лечения больных с ишемической кардиомиопатией с использованием клеточной терапии показали следующее:

- методики введения стволовых клеток безопасны и хорошо переносятся больными;
- улучшение показателей внутрисердечной гемодинамики отмечалось только у больных после лечения фетальными клетками по сравнению с контрольной группой больных и группой лечения пациентов с помощью МККМ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Беленков Ю.Н., Агеев Ф.Т., Мареев В.Ю., Сычев А.В., Саидова М.О. Стволовые клетки и их применение для регенерации миокарда. Сердечная недостаточность 2003; 4(4): 168–73.
2. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001; 410: 701–5.
3. Бокерия Л.А., Георгиев Г.П., Голухова Е.З. и др. Клеточные и интерактивные технологии в лечении врожденных и приобретенных пороков сердца и ишемической болезни сердца. Вестник РАМН 2004; 9: 48–55.
4. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scandinavian J of clinical and laboratory investigation 1968; 21, suppl. 97: 91–106.
5. Гольдберг Е.Д. Справочник по гематологии. Изд-во Томского государственного университета; 1989: 370.
6. Tomita S., Mickle D.A., Weisel R.V. et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine marrow stromal cell transplantation. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2002; 123: 1132–5.
7. Ахмедов Ш.Д., Бабокин В.Е., Рябов В.В. с др. Клинический опыт применения аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга

в лечении больных с ишемической болезнью сердца и дилатационной кардиомиопатией. Кардиология 2006; 7: 10–4.

8. Lishmanov Y.B., Sazonova S.I., Chernov V.I. et al. Tracking of autologous mononuclear bone marrow cells after intracoronary infusion by direct labeling with 99mTc-HMPAO in patients with cardiac disease. Abstract. Europ. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2004; 31, Suppl. 2: S321.

9. Tarasov A.I., Petrenko A.Y., Jones D.R., Grisichenko V.I. Phenotypic analysis colony-forming activity of cryopreserved hemopoietic cells in human fetal liver. Exp. Oncol. 2002; 24: 180–3.

10. Абдулкадыров К.М., Балашова В.А. Клеточный состав печени и селезенки в фетальном периоде. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2008; 3(1): 46–8.

11. Петренко Ю.А. Иммунорегуляторные свойства клеток фетальной печени человека. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; 2(3): 57–61.

12. Grisichenko V.I., Tarasov A.I., Rudenko S.V., Petrenko A.Y. The sensitivity of human fetal liver cells of 7–12 weeks of gestation to programmed freezing and cyclic freeze-thawing. Probl. Cryobiol. 2000; 4: 37–44.

Поступила 21.12.2008