

КАРДИОХИРУРГИЯ

ПЕРВЫЙ ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ МИОКАРДА

Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онищенко Н.А., Гуреев С.В., Остроумов Е.Н., Честухин В.В., Крашенинников М.Е., Миронков Б.Л., Хубутия А.Ш.

НИИ Трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ, Москва

Резюме

Предшествующие экспериментальные исследования показали, что мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (МСК) имеют способность дифференцироваться в кардиомиоциты in vitro и in vivo, индуцируя ангиогенез и восстанавливая поврежденную миокардиальную функцию. Между тем, возможности клеточных технологий в клинической кардиологии остаются неизученными.

С января 2003г. в клинике института восьми больным с сердечной недостаточностью выполнена трансплантация аутологичных МСК с различными сроками культивации: 6 больным МСК вводили интракоронарно и 2 больным - интрамурально, в зону пост-инфарктного кардиосклероза. В трех случаях МСК непосредственно перед трансплантацией были помечены Таллием-201 с целью определения местонахождения введенных МСК в ближайшие часы после трансплантации. Результаты радиоизотопной сцинтиграфии показали, что через 1,5 часа после интракоронарного введения и через 6,5 часов после интрамиокардиальной инъекции МСК остаются в зоне введения.

Через месяц после трансплантации МСК выявлено улучшение регионарной перфузии и диастолической функции миокарда у всех больных. Отчетливый рост ФИ ЛЖ с 31 до 40% выявлен у больного ИКМП после интрамурального введения МСК. Через 1 месяц после трансплантации МСК отмечено улучшение качества жизни и толерантности к физической нагрузке. МСК, введенные интракоронарно, остаются в бассейне коронарной артерии, через которую осуществлялось введение МСК. Интракоронарное и интрамуральное введение МСК улучшает функциональные показатели сократительной функции миокарда, повышает толерантность к физической нагрузке и качество жизни больных с ХСН.

Ключевые слова: клеточная трансплантация, мезенхимальные стволовые клетки, аутологичный костный мозг, восстановление миокардиальной функции.

Несмотря на успехи медицинской науки последних лет, количество пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) увеличивается с каждым годом, что является одной из главных проблем здравоохранения всех экономически развитых стран мира.

По прогнозам департамента здоровья и человеческих ресурсов США, в стране будет продолжаться неуклонный рост числа больных с ХСН, и к 2050 г. в США уже будет более 16 миллионов таких больных [12].

Увеличение частоты развития ХСН в человеческой популяции заставляет специалистов разрабатывать принципиально новые, доступные и эффективные методы лечения ХСН.

Одним из таких методов является пересадка в миокард малодифференцированных клеток с мощным потенциалом к пролиферации и дифференцировке, с целью улучшения сократительной способности миокарда, регуляции процессов ремоделирования левого желудочка (ЛЖ) после инфаркта миокарда (ИМ), ле-

чения дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) и других патологий [1, 2, 5, 8, 17, 18].

В эксперименте было доказано, что восстановление функции миокарда может быть достигнуто путем повышения функционального резерва кардиомиоцитов реципиента за счет стимуляции в них процессов гиперплазии и неоангиогенеза, а также ингибирования апоптоза [1, 2, 4, 8, 15, 16, 17].

Из различных направлений клеточной трансплантации наиболее перспективным является трансплантация прекультивированных МСК аутологичного костного мозга [1, 2, 16, 17]. Эти клетки, будучи аутологичными для реципиента, снимают с врача этические, юридические и организационные проблемы получения донорских клеток, а также устраняют необходимость иммуносупрессивной терапии, которая обычно требуется после трансплантации эмбриональных и фетальных клеток [10]. Среди МСК костного мозга выделяют две популяции клеток: популяцию гемопоэтических стволовых клеток, которые способны пролиферировать и дифферен-

Таблица 1

Клиническая характеристика больных, отобранных на трансплантацию МСК

Пациенты:	1	2	3	4	5	6	7	8*
Возраст, (лет)	34	46	46	42	32	52	65	29
Диагноз	ИКМП	ИКМП	ИКМП	ИБС	ДКМП	ИКМП	ИКМП	ИБС, ОИМ
Лист ожидания ТС	-	-	+	-	+	+	-	-
ФК СН по NYHA	III-IV	III-IV	III-IV	II	IV	IV	-	II
Кол-во перенесенных инфарктов миокарда	1	2	2	1	0	1	2	1
Блокада ЛНПГ	+	+	+	-	-	-	+	-
Длительность ХСН, (в месяцах)	12	4	12	2	12	6	4	менее 1 мес.
Одышка в покое	-	-	+	-	+	-	-	-
Отеки	+	+	+	-	+	+	-	-
Зависимость от мочегонных средств	+	+	+	-	+	+	-	-
β-блокаторы	+	+	+	+	-	-	+	+
Дигоксин	-	-	+	-	+	+	-	-
Ингибиторы АПФ	+	+	+	+	+	+	+	+
Нитраты	+	+	+	+	+	+	+	+
Коронарная ангиопластика ПМЖВ ЛКА в анамнезе	-	-	-	+	-	+	-	+

Примечание: ТС – трансплантация сердца; ФК – функциональный класс; ОИМ – острый инфаркт миокарда; БЛНПГ – блокада левой ножки пучка Гиса; ПМЖВ – передняя межжелудочковая ветвь; ЛКА – левая коронарная артерия; * больной поступил в клинику института через 14 часов после развития острого ИМ.

цироваться в элементы красной и белой крови, и популяцию стромальных пластик-адгезивных клеток, которые при культивировании могут дифференцироваться в клетки тканей мезенхимального происхождения, в том числе — и в кардиомиоциты [1, 2, 13, 16, 17].

Прокультивированные в течение 7 дней в питательной среде, с обработкой в течение 24 часов 5-азациитидином, аутологичные МСК костного мозга, очищенные от эритроидных и тромбоцитарных элементов, после пересадки в зону экспериментального кардиосклероза, полученного путем криоповреждения, вызвали у крыс ограничение экспансии рубца и левожелудочковой дилатации, улучшение коронарной перфузии и насосной функции сердца. Также было показано, что прекультивированные МСК костного мозга после пересадки в миокард дифференцировались в клетки эндотелия, гладкомышечные клетки и в кардиомиоциты, образуя щелевые контакты [9, 10, 15, 16, 17]. Аналогичные и весьма обнадеживающие результаты трансплантации пластик-адгезивных МСК в эксперименте были получены в лаборатории биотехнологии стволовых клеток нашего института [1, 2].

Настоящая работа является первым в России клиническим исследованием, анализирующим первые результаты трансплантации аутологичных МСК больным с ХСН, полученные в рамках клинической программы трансплантации МСК, разработанной и осуществляемой в НИИТ и ИО МЗ РФ с января 2003 г.

В нашем исследовании мы поставили задачу выявить зоны накопления МСК при интракоронарном и интрамуральном способах введения в миокард и оценить влияние этих клеток на показатели миокардиальной перфузии и сократительной функции сердца у больных с ХСН.

Материалы и методы

Общая характеристика больных — реципиентов МСК.

В исследование было включено восемь пациентов с клиническими проявлениями сердечной недостаточности: пять больных с ишемической кардиомиопатией (ИКМП), один больной ИБС, один больной с ДКМП, один пациент с острым трансмуральным инфарктом миокарда передней стенки левого желудочка. Трое из этих больных находятся в листе ожидания трансплантации сердца. Исходные клинические данные этих больных представлены в табл. 1.

Трем больным (пациент 4, 6 и 8) в сроки за 21, 63 и 6 дней до трансплантации МСК была выполнена баллонная ангиопластика передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии (ПМЖВ).

Данные гемодинамики и сократительной функции и размеров полостей сердца у больных перед трансплантацией МСК представлены в табл. 2.

Из таблиц 1 и 2 видно, что все больные имели клинические и функциональные проявления сердечной недостаточности, но степень ее проявления была неодинаковой.

Таблица 2

Состояние внутрисердечной гемодинамики, сократительной функции и размеров полостей сердца у больных перед трансплантацией МСК

Пациенты:	1	2	3	4	5	6	7	8	M±m
ФИ ЛЖ, * в %	32	33	12	53	11	14	45	45	30,6±16,6
ФИ ПЖ, * в %	40	60	33	62	15	21	39	50	40,0±16,6
КДР ЛЖ ² , в см.	5,9	6,6	5,8	4,7	8,1	7,7	6,7	5,6	6,4±1,1
КДО ЛЖ ² , в мл.	178	220	167	100	354	279	234	154	210,7±79,5
КДР ПЖ ² , в см	2,9	2,2	2,6	2,4	3,0	3,2	3,1	2,5	2,7±0,36
ДЛА ¹ сист, мм рт.ст.	65	26	38	38	50	50	41	-	44±11,5
ДЛА ² диаст, мм рт.ст.	30	14	20	16	16	23	19	-	19,7±5,1
КДДЛЖ ¹ , мм рт.ст.	35	11	20	15	20	22	21	19	20±6,5
ЧСС	72	54	90	70	100	94	63	77	77±16

Примечание: ФИ – фракция изгнания, ЛЖ – левый желудочек, ПЖ – правый желудочек, КДР – конечно-диастолический размер; КДД ЛЖ – конечно-диастолическое давление; * – по данным радиоизотопной вентрикулографии, ¹ – по данным зондирования полостей сердца, ² – по данным ЭхоКГ.

Получение трансплантационного материала и способы его введения больным:

Забор аутологичных клеток костного мозга осуществляли под местной анестезией в условиях операционной путем пункции гребня подвздошной кости больных, готовящихся к трансплантации МСК. Аспират в количестве 150-300 мл. помещали в пробирки, содержащие гепарин, затем центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин; полученный осадок клеток ресуспендировали в лизирующем гипотоническом растворе, затем интенсивно перемешивали и вновь центрифугировали в течение 5 мин в том же режиме.

Культивация клеток. Гемолизированный супернатант полностью удаляли отсасыванием, а клеточный осадок, свободный от эритроидных и тромбоцитарных элементов, в количестве $350-1500 \cdot 10^6$ клеток ресуспендировали в ростовой среде Iskov's (Gibco, Grand Island), с добавками. Суспензию клеток затем высевали для культивирования на чашки Петри $d=150$ мм в концентрации $2,5-3,0 \cdot 10^6$ кл/мл при 37°C в CO_2 -инкубаторе — атмосфере с 5% CO_2 и 95% влаж-

ности на 2-е суток. В конце вторых суток в среду внесли 5-азациитидин (Sigma, USA), до конечной концентрации 6 мкМ на 72 часа, для направления дифференцировки стромальных МСК в кардиомиоцитоподобные и для ингибирования спонтанной дифференцировки их по остеобластическому направлению [1, 2]. Через 72 часа инкубации с 5-азациитидином (на шестые сутки культивирования) смешанная культура МСК использовалась либо для введения в коронарное русло, либо для продолжения ее культивирования (рис. 1а).

Продолжение культивирования имело целью получение культуры МСК, обогащенной стромальными стволовыми клетками, имеющими кардиомиоцитарное направление дифференцировки. Для этого культуральную среду полностью заменяли ростовой с добавлением к ней инсулиноподобного фактора роста II, основного фактора роста фибробластов, тироксина и трийодтиронина. Среду заменяли через каждые три дня в течение 2-3 месяцев для наращивания значительной клеточной массы (рис. 1б) до $15-50 \cdot 10^6$ клеток, в зависимости от исходного пула стволовых клеток в аспирате больного. Перед интрамуральным введением этих клеток во время кардиохирургической операции, пластик-адгезивные клетки снимались методом трипсинизации, и отмывались центрифугированием; образовавшийся осадок ресуспендировался в растворе Хэнкса с добавками до конечной концентрации $10 \cdot 10^6$ кл/мл и хранился на льду до введения больному не более 8 часов. Жизнеспособность клеток при краткосрочном культивировании составила $95+2\%$ по окрашиванию трипановым синим.

Было применено два способа введения МСК в миокард: интракоронарное введение и интрамуральное введение — в зону постинфарктного кардиосклероза.

Интракоронарное введение МСК осуществ-

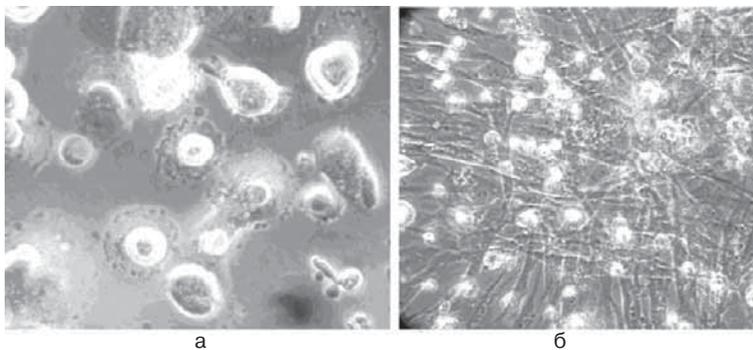


Рис. 1. МСК в процессе культивирования: **а**-через 1 неделю культивирования, 3-и сутки после обработки МСК 5-азациитидином; в поле зрения — прикрепляющиеся клетки костного мозга; увеличение $\times 600$, фазовый контраст; **б**-через 8 недель культивирования; в поле зрения — образовавшийся монослой прикрепившихся распластаных (пластик-адгезивных) клеток и делящиеся ошаренные клетки; увеличение $\times 400$, фазовый контраст.

Таблица 3

Длительность культивирования и способы введения МСК

Пациенты	1	2	3	4	5	6	7 *	8
Дата забора клеток	18.01.03	24.01.03	21.02.03	13.03.03	27.03.03	4.04.03	4.04.03	4.04.03
Срок культивации, в сутках	61	55	5	7	6	5	12	4
Дата введения клеток	20.03.03	20.03.03	26.02.03	20.03.03	02.04.03	09.04.03	16.04.03	8.04.03
Метод введения	Интракоронарное	Интрамуральное	Интракоронарное	Интракоронарное	Интракоронарное	Интракоронарное	Интрамуральное *	Интракоронарное
Количество клеток, млн.	125	52	63	583	400	160	30	300

Примечание: * интрамуральное введение МСК в область постинфарктного кардиосклероза во время операции: аорто-коронарное шунтирование передней межжелудочковой ветви, ветви тупого края и правой коронарной артерии в сочетании с пластикой митрального клапана.

лялось селективно, через катетер, введенный в инфаркт-зависимую коронарную артерию. После точного позиционирования катетера в коронарной артерии под контролем ангиографии, взвесь клеток (3 мл), содержащая от 63 до 500 млн. МСК разводилась физиологическим раствором до объема 50 мл и вводилась порциями по 20 мл.

Интрамуральное введение МСК осуществлялось путем инъекции в миокард взвеси клеток, содержащей от 30 до 52 млн. МСК в 2,5 мл физиологического раствора; МСК культивировались в течение 55–61 дней. Сроки культивации МСК и способы их доставки в миокард представлены в табл. 3.

Методы оценки эффективности трансплантации МСК.

Оценку эффективности трансплантации МСК больным с ХСН проводили с помощью клинических и сцинтиграфических методов исследования.

Оценка клинического состояния больных проводилась путем определения функционального класса ХСН по NYHA, объективного 6-минутного теста и методики субъективной оценки состояния больного с вычислением индекса активности (The Duke Activity Status Index -индекс DASI) [4, 20]. По этой методике более высоким значениям индекса соответствует более высокая физическая активность больных.

Оценку качества жизни больных проводили с помощью валидизированной методики изучения индекса качества жизни больных с ХСН — согласно Миннесотскому опроснику проводился расчет индекса MLHFQ (Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire — индекс MLHFQ), где более высокий показатель индекса соответствует менее высокому качеству жизни больных с ХСН [4, 19].

Сцинтиграфическое обследование больных проводилось всем больным непосредственно перед трансплантацией МСК и 4-м больным через один месяц после трансплантации МСК была выполнена перфузионная сцинтиграфия миокарда и радионуклидная вентрикулография. Исследования проводили по методикам, принятым в НИИТ и ИО МЗ РФ на гам-

ма-камере BASICAM фирмы SIEMENS с использованием отечественной системы сбора и обработки радионуклидной информации ГОЛД-РАДА.

Для визуализации месторасположения МСК в сердце после введения их большим клетки метили in vitro таллием-201, имеющим период полураспада 48 часов. Для этого за 24 часа до трансплантации МСК в миокард, в культуральную среду с клетками вносили радиоактивный хлорид таллия, из расчета 0,5 МБк/мл. Непосредственно перед трансплантацией клеточная культура отмывалась от среды с остаточной радиоактивностью раствором Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} и затем вводилась больному либо интракоронарно, либо интрамиокардиально, во время операции на открытом сердце. После регистрации изображений МСК, меченных таллием-201, через 1,5 часа после интракоронарного введения и спустя 6,5 часов после интрамурального введения проводили обязательное сравнение среднего счета радиоактивности вне тела, в области печени и в области сердца, куда ствольные клетки не вводили, а также и в зоне накопления радиоактивного индикатора.

Для уточненной оценки месторасположения МСК в сердце после регистрации их изображений с помощью таллия-201, не изменяя положения больного по отношению к гамма-камере, внутривенно вводили другой перфузионный радиоактивный агент — тетрофосмин — Тс-99м. По перфузионному изображению миокарда с тетрофосмином —Тс-99м обводили область левого желудочка, и полученный контур накладывали на изображение МСК, меченных таллием-201. Таким образом, используя метод двойной метки, мы оценивали точное местоположение введенных МСК.

Для оценки общего изменения перфузии миокарда при обработке результатов статического изображения миокарда, кроме стандартной оценки распределения перфузии по 10 сегментам, в каждом изображении рассчитывали величину захвата миокардом тетрофосмина —Тс 99м (в % от введенной дозы). Этот показатель служил аналогом миокардиальной фракции сердечного выброса и отражал в процентах долю сердечного выброса, приходящуюся на весь миокард.



Контуры наложены с изображений миокарда с тетрофосмином Тс-99м, выполненных вслед за введением стволовых клеток

Рис. 2. Выявление местонахождения МСК после их введения в миокард.

Сцинтиграммы пациентов 2 и 4; см. табл. 1-5. 1- изображение МСК, меченных таллием -201 в культуре; 2-уточненная диагностика местонахождения МСК после наложения сцинтиграфического изображения левого желудочка, полученного с помощью тетрофосмина-Тс-99м; а — введение МСК интракоронарно в средний сегмент ПМЖВ ЛКА, МСК идентифицируются в области верхушки левого желудочка, (пациент 4); б – введение МСК интрамурально, в зону постинфарктного фиброза, (пациент 2).

Для раздельной оценки распределения перфузии в миокарде в систолу и диастолу, выполняли синхронизированную с ЭКГ регистрацию изображений перфузии миокарда с формированием в репрезентативном цикле 16 изображений. Затем, с помощью анализа Фурье, были сформированы параметрические изображения амплитуды сокращения, ударного объема, парадоксального движения стенки и фазового изображения начала изгнания. При региональной оценке этих изображений по 10 сегментам оценивали распределение перфузии в миокарде в систолу и диастолу раздельно.

Результаты

Идентификация МСК, введенных в миокард.

Изучение терапевтических эффектов МСК на функцию сердца требовало, прежде всего, определения их местонахождения после интракоронарного и интрамиокардиального введения МСК. Если после интрамурального введения МСК в постинфарктную зону кардиосклероза логично было предположить, что введенные стволовые клетки будут находиться в области инъекции, то где окажутся МСК после интракоронарного введения — следовало установить. Для решения этого вопроса был выбран безопасный метод сцинтиграфической диагностики, основанный на последовательном применении двух радиоизотопных меток: Таллия-201 для МСК в культуре и тетрофосмина –Тс- 99м для внутривенного введения больному. Исследование было проведено на 3-х больных: у 2-х больных — с интракоронарным введением МСК и у 1 больного — с интрамуральным введением клеток

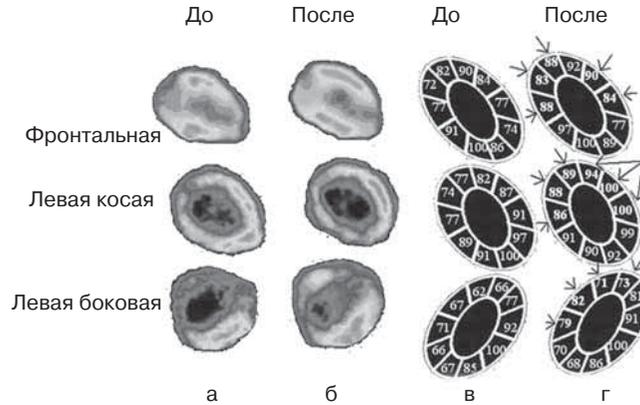


Рис. 3. Количественная оценка региональных изменений перфузии по стандартным проекциям статической сцинтиграфии миокарда с тетрофосмином-Тс-99м у больного ИКМП (пациент 3; см. табл. 1-5) до и через 1 мес. после введения МСК в ПМЖВ ЛКА.

а-перфузия миокарда до введения МСК; б-через один месяц после введения МСК; в-исходные данные перфузии миокарда в % по сегментам левого желудочка; г-данные перфузии миокарда левого желудочка по сегментам в % через месяц после интракоронарного введения МСК. Стрелками указаны сегменты с приростом перфузии миокарда более чем на 5%.

в зону постинфарктного рубца. Результаты радиоизотопных исследований представлены на рис. 2 а и б.

Из рисунков видно, что, как при интрамуральном, так и при интракоронарном введении, МСК остаются в зоне введения.

Важно, что МСК после интракоронарного введения остались в бассейне введения, несмотря на то, что это был бассейн перенесенного инфаркта. Накопление препарата в задней стенке — миокарде, нормально перфузируемом правой коронарной артерией, не отмечено.

Всем больным в первые сутки после трансплантации МСК было выполнено Холтеровское мониторирование ЭКГ с целью диагностики возможных нарушений ритма. Из восьми больных только у одного были зарегистрированы нарушения ритма: частая желудочковая экстрасистолия с двумя короткими пробежками желудочковой тахикардии. При повторном Холтеровском мониторировании ЭКГ нарушений ритма у этого больного не было выявлено.

Изменение перфузии и сократительной функции миокарда через 1 месяц после трансплантации МСК.

Через один месяц после трансплантации МСК было обследовано четыре пациента: трое после интракоронарного введения МСК (пациенты 1, 3, 4) и один больной — после интрамурального введения дифференцированных МСК в виде кардиомиоцитоподобных клеток (пациент 2) с длительным сроком культивации (55 суток), в зону постинфарктного кардиосклероза. Сводные данные изменения перфу-

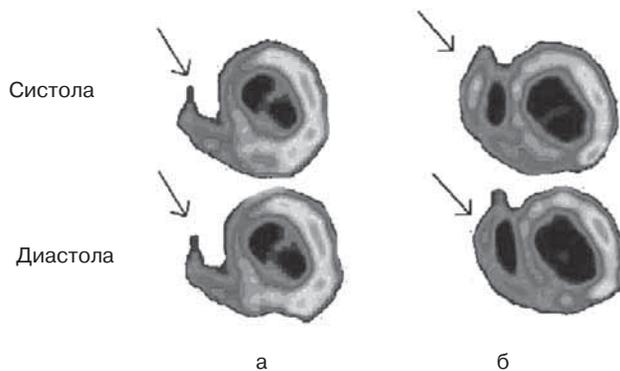


Рис. 4. Синхронизированная с ЭКГ перфузионная скinti-графия больного ИКМП (пациент 3; см. табл. 1-5): **а**-до введения МСК; **б**-через месяц после интракоронарного введения МСК. Стрелками указана свободная стенка правого желудочка.

зии, размеров и сократительной функции миокарда представлены в табл. 4. Из таблицы видно, что количественные показатели исходного состояния перфузии и функции левого желудочка у обследованных нами больных свидетельствуют о различной тяжести клинического состояния и о возможности различной реакции этих больных на введенные МСК. Из таблицы видно также, что в ответ на введение МСК каждый больной отреагировал значимым положительным изменением нескольких анализируемых показателей: 1-й больной — изменением 2-х; 2-й — 5-и; 3-й — 2-х; 4-й — 3-х параметров. Положительная тенденция среднего прироста (Δ) в изменении таких показателей, как конечно-диастолический объем левого желудочка, скорость наполнения ЛЖ, соотношение перфузии легкое/миокард и количество перфузируемых сегментов, рассматривалось нами как знак положительного воздействия МСК на пер-

фузию и сократительные свойства миокарда исследуемых больных.

На рис. 3 представлены скintiграммы больного ИКМП (пациент 3; см. табл. 1-5) после интракоронарного введения стволовых клеток в проксимальные отделы ПМЖВ ЛКА.

При количественной оценке статических перфузионных скintiграмм миокарда в 3 стандартных проекциях после введения МСК в проксимальные отделы ПМЖВ ЛКА отмечено увеличение перфузии базальных отделов и переднеперегородочной стенки — области введения стволовых клеток (рис. 3). При количественной оценке изменений общей перфузии миокарда всего левого желудочка сердца отмечено увеличение миокардиальной фракции сердечного выброса с 3,3% до 3,85%. При оценке перфузионных скintiграмм и в систолу, и в диастолу в левой передней косой проекции 45° установлено увеличение перфузии свободной стенки ПЖ, при оценке амплитудных изображений отмечен рост региональной кинематики свободной стенки ПЖ (рис. 4), что, по нашим данным, отражает у больных ИКМП снижение давления в легочной артерии и конечно-диастолического давления в левом желудочке [3].

Примечательно, что на ЭКГ, выполненных с интервалом 3 и 7 дней в срок через один месяц после трансплантации МСК у этого больного, в сравнении с исходной ЭКГ, не регистрируется полная блокада левой ножки пучка Гиса, что было также подтверждено и холтеровским мониторингом ЭКГ.

Особый интерес для оценки влияния трансплантации МСК на миокард представляет больной 3., 46 лет, история болезни № 108/2003, с диагнозом: ИБС, атеросклеротический и постинфарктный кардиосклероз. Полная блокада левой ножки пучка Гиса. Безболевая ишемия. НК 2Б ст., ИКМП, (пациент 2; см. табл. 1-5),

Таблица 4

Изменения (Δ) перфузии, размеров и сократительной функции миокарда ЛЖ через 1 месяц после трансплантации МСК (по результатам радиоизотопных исследований)

Пациенты	ФВ ЛЖ %		КДО ЛЖ мл		Скорость наполнения ($\Delta V/\Delta t$)		Легкие/миокард		МФСВ %		Перф сегм. (n=30)
	до	1 мес	до	1 мес	до	1 мес	до	1 мес	до	1 мес	
1	33	34	246	182	402	335	,62	,54	2,3	1,75	0
		+1		- 64		-67		-0,08		-0,55	
2	31	40	318	295	270	350	,63	,59	1,5	1,88	+2
		+9		-23		+80		-0,04		+0,38	
3	13	12	346	347	551	835	,64	,63	3,3	3,85	+10
		-1		+1		+224		-0,01		+0,55	
4	63	62	122	110	445	481	,47	,40	2,3	1,66	+14
		-1		-12		+36		-0,07		-0,64	
Сред. знач. изменен. Δ	+ 2 %		-24,5 мл		+82		-0,05		-0,08		+6,5

Примечание: ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, КДО – конечно-диастолический объем ; МФСВ – миокардиальная фракция сердечного выброса. Шрифтом выделено значимое изменение показателя.

которому МСК вводились интрамурально, в зону постинфарктного кардиосклероза. Этому больному, помимо трансплантации МСК, не выполнялось никаких других вмешательств, поэтому все изменения его клинического состояния, общей и локальной функции миокарда можно считать результатом трансплантации МСК.

До трансплантации МСК этот больной ИКМП находился на терапии, включающей в себя фуросемид в дозе 20 мг два раза в неделю, а также верошпирон, β-блокаторы и ингибиторы АПФ. 24 января с помощью пункции гребня подвздошной кости у больного взят костный мозг в количестве 250 мл; 20 марта 2003 г., т.е. через 55 суток культивирования, МСК были интрамурально введены больному (протокол операции № 44). Через неделю после трансплантации МСК отмена фуросемида, под контролем давления в правом предсердии, не привела к появлению отеков, как это происходило в дооперационном периоде. По данным ЭхоКГ уже через 10 дней после трансплантации МСК отмечалось увеличение ФИ ЛЖ с 30 до 40%. При количественной оценке статических перфузионных сцинтиграмм миокарда в 3 стандартных проекциях через 1 месяц после трансплантации МСК отмечено увеличение перфузии переднеперегородочной и заднебоковой стенок – области введения стволовых клеток. Также установлено увеличение миокардиальной фракции сердечного выброса с 1,5% до 1,88%. Вместе с тем, отмечая выраженное перераспределение перфузии на изображениях миокарда, увеличение количества нормально перфузируемых сегментов мы не отметили. При оценке перфузионных сцинтиграмм в левой боковой проекции и в систолу, и в диастолу показано увеличение перфузии в передне-перегородочной стенке.

При оценке перфузионных сцинтиграмм в левой косо́й проекции 450 показано увеличение перфузии боковой стенки ЛЖ и МЖП и в систолу, и в диастолу, при оценке амплитудных изображений отмечен рост региональной кинематики свободной стенки ЛЖ. Также отмечено значительное уменьшение размеров полости ЛЖ по длинной (с 8,5 см до 6,5 см) и короткой (с 6,0 до 4,5 см) осям, рис. 5.

На сцинтиграммах отчетливо видно уменьшение

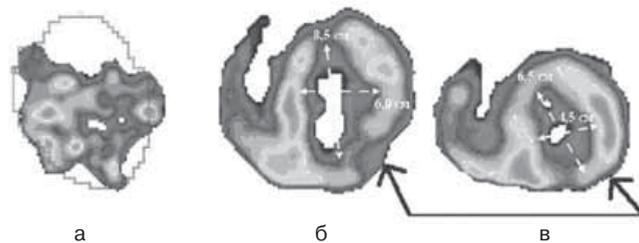


Рис. 5. Изменение размеров ЛЖ и регионарной перфузии миокарда ЛЖ больного ИКМП (пациент 2; см. табл. 1-5): **а**-изображение меченных Таллием -201 МСК через 6,5 часов после интрамурального введения в область постинфарктного кардиосклероза; **б** -амплитудное изображение миокарда ЛЖ до введения МСК; **в** -амплитудное изображение миокарда ЛЖ через 1 месяц после введения МСК. Стрелками указана зона улучшения локальной контрактильности левого желудочка, соответствующая области введения МСК.

размеров полости ЛЖ и увеличение перфузии нижней-боковой стенки в области постинфарктного рубца.

22 апреля 2003г. больной З. выписан из клиники с улучшением состояния (см. табл. 4 и 5).

Изменение клинического состояния пациентов через один месяц после трансплантации МСК.

Оценка функционального состояния пациентов по классификации NYHA выявила тенденцию к снижению функционального класса СН у больных, перенесших трансплантацию стволовых клеток. Аналогичные результаты были получены при изучении индекса активности (индекса DASI) [20]. По данным объективного 6-минутного теста толерантность к физической нагрузке возрастала (увеличилось расстояние, проходимое пациентами за 6 минут), табл. 5.

Отмечено также значительное улучшение психологического состояния пациентов, особенно больных, находящихся в листе ожидания трансплантации сердца.

Обсуждение

Важным результатом данного исследования является констатация того факта, что МСК, введенные интракоронарно, остаются в бассейне коронарной артерии, через которую осуществлялось их введение: вне

Таблица 5

Изменение показателей комплексной клинической оценки состояния больных через 1 месяц после трансплантации МСК

Пациенты:	1		2		3		4		Среднее значение	
	До	1 мес	До	1 мес	До	1 мес	До	1 мес	До	1 мес
Время исследования	До	1 мес	До	1 мес	До	1 мес	До	1 мес	До	1 мес
ФК NYHA	III-IV	II-III	III-IV	II-III	III-IV	II-III	II	I-0	2,3	1,5
Индекс DASI	15,2	23,5	36,7	44,7	7,2	18,95	39,9	50,7	24,7	34,5
6-минутный тест	30м	425	400	450	200	300	500м	Более 550м	-	-
Индекс MLHFQ	12	4	9	6	19	6	3	0	10,75	4

Примечание: индекс DASI – более высокие показатели соответствуют более высокой физической активности; индекс MLHFQ – более высокие показатели соответствуют менее высокому качеству жизни.

этой зоны очагового накопления индикатора не было обнаружено, а бассейн накопления клеток соответствовал области перенесенного инфаркта миокарда.

Для всех 4-х больных, наблюдавшихся нами в течение 1 месяца после трансплантации МСК, установлена положительная тенденция изменения показателей клинического состояния, как объективных, так и субъективных (табл. 5).

При сцинтиграфических исследованиях уже через 3 недели у всех больных было отмечено увеличение перфузии регионов перинфарктной зоны миокарда. Кроме этого, нами было отмечено восстановление региональной кинетики в этих зонах, а также перфузии и функции свободной стенки правого желудочка. Однако, полученные результаты не были в одинаковой степени выраженными у разных больных (табл. 1-5).

Во-первых, отчетливый рост фракции выброса ЛЖ был отмечен нами лишь у одного пациента (пациент 2; см. табл. 1-5), которому была выполнена трансплантация дифференцированных МСК (срок культивации — 55 суток) аутологичного костного мозга интрамурально, в зону постинфарктного кардиосклероза. Уменьшение размеров полости ЛЖ было отмечено у 3 из 4 пациентов; увеличение скорости наполнения ЛЖ — у двух больных; снижение соотношения перфузии легкие/миокард — у 4-х больных. Важно подчеркнуть, что этот показатель уже давно используется радиологами, работающими в области ядерной кардиологии, для прогноза левожелудочковой недостаточности, особенно при ишемической болезни сердца. Снижение перфузионного соотношения легкие/миокард в первую очередь свидетельствует об увеличении емкости коронарного русла, по сравнению с объемом сосудистого русла легких, и поэтому снижение этого показателя у больных после введения МСК мы рассматриваем как знак положительного воздействия МСК на миокард.

Другой показатель общей перфузии сердца — количество экстрагированного миокардом перфузионного индикатора в % от введенной дозы — миокардиальная фракция сердечного выброса (МФСВ) используется реже, однако мы обладаем значительным опытом его использования. Увеличение МФСВ после введения стволовых клеток показывает, насколько увеличилась емкость коронарного русла по отношению ко всему сердечному выбросу. Этот показатель значимо возрос у пациентов 2 и 3, тогда как у больных 1 и 4 он значительно снизился.

Известно, что локальные нарушения перфузии и функции миокарда являются наиболее типичными проявлениями ишемической болезни сердца. Однако, эти нарушения гетерогенны, а методы их оценки построены на сравнении зон с максимальной и минимальной величиной изучаемого показателя. В нашем исследовании значимое увеличение перфузии сегментов миокарда ЛЖ (визуально мы отметили рост региональной

перфузии у всех 4 больных) мы отметили только у 2 больных (пациенты 3 и 4, см. табл. 1-5), которым вводили МСК после короткого срока культивации, т.е. вводили смешанную культуру клеток мезенхимного и стромального рядов. У двух других пациентов, которым вводили преддифференцированные МСК в виде кардиомиоцитоподобных клеток (пациенты 1 и 2, см. табл. 1-5), значимых изменений региональной перфузии мы не отметили. Мы полагаем, что улучшение коронарной перфузии миокарда у больных ИММП после интракоронарного введения МСК может быть связано со стимуляцией ангиогенеза, следствием которой явилось увеличение региональной кинематики свободной стенки ПЖ и улучшение диастолических показателей левого желудочка — таких, как максимальная скорость наполнения ЛЖ, КДО ЛЖ, и КДД ЛЖ [3].

Значительное повышение ФИ ЛЖ с отчетливым локальным улучшением контрактильности миокарда в области постинфарктного кардиосклероза после интрамурального введения МСК в эту область (пациент 2, см. табл. 1-5) вселяет надежду на успех лечения больных ИММП путем сочетания интрамурального введения МСК с хирургической реваскуляризацией миокарда, а также в комбинации с другими методами хирургического лечения ХСН [12, 15, 18].

Полученные результаты позволяют предложить трансплантацию аутологических МСК костного мозга как биологический мост к трансплантации сердца — например, у больных, включенных в лист ожидания ТС. Говорить о влиянии трансплантации МСК на апоптоз кардиомиоцитов человека на основании полученных результатов пока рано, но хочется верить, что ближайшие исследования прольют свет и на этот аспект влияния МСК на течение и прогноз ХСН.

Безусловно, изложенные в настоящей статье результаты можно назвать пока предварительными, они требуют обсуждения, дальнейшего накопления и изучения, но они вселяют оптимизм и поэтому исследование влияния трансплантированных МСК на функцию сердца у больных ХСН должно быть продолжено. Вместе с тем, несмотря на небольшой объем тщательно выполненных наблюдений, они соответствуют “пилотному” характеру исследовательских работ, назначение которых — указать на новые перспективные направления в терапии ИБС.

Заключение

Трансплантация МСК является безопасным и эффективным методом лечения и может использоваться как вспомогательный метод лечения, например, у больных, ожидающих трансплантацию сердца, и/или как подготовка больного с ХСН к реконструктивной операции на собственном сердце, а также как способ замещения постинфарктного фиброзного поля жизнеспособными кардиомиоцитоподобными клетками.

Не менее перспективным является направление интракоронарного введения МСК в сочетании с ангиопластикой инфаркт-зависимой артерии в первые часы после развития острого инфаркта миокарда для ограничения зоны инфаркта, апоптотического повреждения миокарда и последующего замещения погибших кардиомиоцитов [15].

Поскольку стволовые клетки костного мозга могут быть получены в достаточном количестве путем по-

вторной аспирации костного мозга, а их количество возможно увеличивать *in vitro* и при этом не требуется иммуносупрессии после их трансплантации, данный подход к лечению хронической сердечной недостаточности имеет большие перспективы для клинического использования. Но, несмотря на то, что трансплантация МСК сулит большие обещания, ее будущее целиком зависит от проведения надежно контролируемых, рандомизированных клинических исследований.

Литература

1. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. и др. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов// Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2002, 4, 3-6.
2. Потапов И.В., Башкина Л.В., Зайденов В.А., и др. Влияние пересадки эмбриональных кардиомиоцитов и мезенхимальных клеток костного мозга на сократительную функцию сердца при экспериментальном инфаркте миокарда// Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2002, 3, стр.88-89.
3. Остроумов Е.Н., Ермоленко А.Е., Гуреев С.В., и др. Фракция выброса правого желудочка как показатель эффективности реваскуляризации миокарда у больных ишемической болезнью сердца с застойной недостаточностью кровообращения// Кардиология 1996; 4: 57-61.
4. Гендлин Г.Е., Самсонова Е.В., Бухало О.В. Методики исследования качества жизни у больных хронической сердечной недостаточностью// Сердечная недостаточность, Том 1, 2, 2000.
5. Shmji Tomita, Ren-Ke Li; Richard D. et al. Autologous Transplantation of Bone Marrow Cells Improves Damaged Heart Function// Circulation, November, 9, 1999: 856-861.
6. Kocher AA, Schuster, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function// Nat. Med. 2001;7:430-436.
7. Hiroshi Kamihata, Hiroaki Matsubara, Takashi Nishiue et al. Implantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Into Ischemic Myocardium Enhances Collateral Perfusion and Regional Function via Side Supply of Angioblasts, Angiogenic Ligands, and Cytokines// Circulation. 2001;104:1046-1052.
8. Jih-Shiuan Wang, Dominique Shum-Tim, Jacques Galipeau et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages: //J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 2000;120:999-1006.
9. Ohno N, Fedak PW, Weisel RD et al. Cell transplantation in non-ischemic dilated cardiomyopathy. A novel biological approach for ventricular restoration// Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg, 2002 Nov;50(11):457-60.
10. Jih-Shiuan Wang, Dominique Shum-Tim, Edgar Chedrawy et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications// J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 2001;122:699-705
11. Shinji Tomita, Donald A. G. Mickle, Richard D. Weisel et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation// J. Thorac. Cardiovasc. Surgery, June 2002; Volume 123, Number 6.
12. Yutaka Sakakibara; Keiichi Tambara; Fanglin Lu et al. Combined Procedure of Surgical Repair and Cell Transplantation for Left Ventricular Aneurysm: An Experimental Study// Circulation, 2002; 106:1-193.
13. Mark A. Robbins :Management of end-stage heart failure, Eric A. Rose (editor), 1998 ISBN 0-316-75697-0, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
14. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells// Science, 1999; 284:143-147.
15. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans// Nat. Med., 2001 Apr; 7(4):430-6.
16. Kocher AA, Schuster, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function// Nat. Med. 2001 Apr; 7 (4): 412-3.
17. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium// Nature, 2001, 410, 701 - 705.
18. Menasche P, Hagege A, Scorsin M, et al.: Myoblast transplantation for heart failure// Lancet, 2001, 357: 279-280.
19. Rector TS, Tschumperlin LK, Kubo SH, et al. Use of the Living With Heart Failure questionnaire to ascertain patients' perspectives on improvement in quality of life versus risk of drug-induced death// J. Card. Fail., 1995,Jun;1(3):201-6.
20. Hlatky MA, Boineau RE, Higginbotham MB et al. A brief self-administered questionnaire to determine functional capacity (the Duke Activity Status Index) // Am. J. Cardiol., 1989 Sep 15;64(10):651-4.

Abstract

The previous experimental studies revealed that mesenchymal bone marrow stem cells (MSC) have the ability of differentiating into cardiomyocytes in vitro and in vivo inducing angiogenesis and restoring the impaired myocardial function. At that, the cell technology capacities in clinical cardiology remain unstudied.

Starting from January 2003 8 patients suffering from heart failure underwent the transplantation of autologous MSC with different stages of cultivation: MSC was administered intracoronary to 6 and intramurally to the post-infarction atherosclerosis zone.

In three cases the MSC were marked with thallium-201 directly before transplantation in order to define the location of MSC during the hours after transplantation. The results of radionuclide scintigraphy demonstrated that in 1,5 hours after intracoronary administration and in 6,5 hours after intramyocardial injection MSC remain in the zone of administration.

In 1 month after the transplantation the improvement of regional perfusion and diastolic function was observed in old patients.

Significant growth of functional ischemia of the left ventricle from 31 to 40% was observed in patient suffering from ИКМП after intramural administration of MSC. In 1 month after MSC transplantation quality of life and physical stress tolerance improvement was observed. Intracoronary administered MSC remain in coronary artery, through which MSC was administered. Intracoronary and intramural administration of MSC improves functional indices of retractive myocardial function, increases physical stress tolerance and life quality of patients suffering from chronic heart failure.

Keywords: cell transplantation, mesenchymal stem cells, autologous bone marrow, rehabilitation of myocardial function.

Поступила 08/05-2003