

© Коллектив авторов, 2006  
УДК 616.12-005.4-08-032:611.018.46

В.М.Седов, А.С.Немков, Б.В.Афанасьев, О.Г.Зверев, А.О. Нестерко,  
Л.М.Фрегатова, С.А.Белый, Е.А.Шлойдо, О.В.Юдина, Д.В.Рыжкова, Е.Е.Зуева,  
Н.В.Петров, О.Ф.Стовпюк, С.П.Цурупа

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРОВ КОСТНОГО МОЗГА В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова (ректор — акад. РАМН проф. Н.А.Яицкий), Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт (дир. — чл.-кор. РАМН проф. А.М.Гранов), городская многопрофильная больница № 2

**Ключевые слова:** клеточная терапия, ишемическая болезнь сердца, стволовые клетки.

**Введение.** Идея лечения сердечной недостаточности с помощью тех или иных стволовых клеток развивалась в течение последних 5 лет чрезвычайно интенсивно [1]. Применение стволовых клеток в острой фазе инфаркта миокарда (ИМ) обеспечивало уменьшение площади инфарктированного миокарда и улучшение сократительных свойств левого желудочка сердца в эксперименте на животных. Открытие мультипотентности стволовой клетки взрослого организма и доказательство возможности регенерации ткани миокарда в эксперименте [1–5, 7, 8] во взрослом организме с помощью стволовых клеток костного мозга позволило в 2001 г. японским кардиологам, а в 2002 г. немецким — начать использование аутологичных моноклеаров костного мозга (АМКМ) для лечения кардиологических больных [6, 11]. Следует отметить, что использование АМКМ, как правило, проводилось параллельно с традиционным методом лечения (баллонная коронарная ангиопластика или аортокоронарное шунтирование), поэтому дифференцировать эффект, полученный с помощью клеточной терапии от эффекта за счет прямой реваскуляризации миокарда, практически невозможно. Однако большинство исследователей сходятся во мнении, что эффект клеточной терапии приносит дополнительную пользу в виде улучшения сократимости миокарда и улучшения реваскуляризации миокарда [1–3, 11].

**Материал и методы.** На первоначальном этапе оценка эффективности сочетанного введения АМКМ и аортокоронарного шунтирования проведена 7 больным. У всех был отмечен положительный эффект при контрольном обследовании в сроки 6 и 12 мес, однако дифференцировать значимость клеточной терапии на фоне коронарного шунтирования у этих больных практически невозможно. Эти пациенты были исключены из анализа.

В дальнейшем, в период с октября 2003 г. по сентябрь 2005 г. АМКМ использованы в лечении 50 больных в виде отдельной процедуры, не связанной с традиционной реваскуляризацией миокарда. Везде АМКМ вводили через катетер во время коронарографии на фоне лечения традиционными медикаментозными препаратами, подобранными за 1 мес до первичной оценки пациента.

Были выделены две группы больных, различающихся по типу поражения сердца. 1-ю группу составили 36 больных только с коронарной недостаточностью, которым оперативное лечение в виде аортокоронарного шунтирования или коронарной ангиопластики было не показано из-за диффузного и дистального поражения коронарного русла. Во 2-ю группу вошли 14 больных с коронарной и сердечной недостаточностью, которым по тем или иным причинам традиционное оперативное лечение было не показано. Все больные страдали ишемической болезнью сердца (ИБС), стенокардией напряжения 3–4 функционального класса. Ранее (3–7 лет назад) 11 больным из 1-й группы были выполнены операции аорто- и маммарокоронарного шунтирования, однако рецидив стенокардии потребовал выполнения контрольной коронарошунтографии. При шунтографии выявлено, что из 3–5 шунтов функционирует 1–2 шунта (как правило, работает маммарокоронарный анастомоз). В этой группе больных выполнить ангиопластику шунтов или нативных артерий было невозможно, а повторная операция аортокоронарного шунтирования была не показана из-за выраженного дистального поражения коронарного русла.

Следует отметить, что медикаментозная терапия, подобранная за месяц до начала клеточной терапии, не менялась в течение всего срока наблюдения. Она включала нитраты, бета-блокаторы, дезагреганты (аспирин); при наличии сер-

дечной недостаточности в терапии применяли ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, верошпирон (в качестве антагониста альдостерона), мочегонные, препараты калия.

Получение взвеси мононуклеаров осуществляли следующим образом. Пункцию грудины и подвздошной кости выполняли под внутривенным наркозом диприваном, получали 120 мл костного мозга. Для профилактики тромбообразования использовали гепарин. Затем проводили седиментацию эритроцитов костного мозга гидроксиэтилкрахмалом (6% стабизол) в течение 1,5–2 ч до получения лейкоцитарно-лимфоцитарного слоя, центрифугировали 20 мин при температуре 24 °С со скоростью 2000 об/мин. Выделение мононуклеарной фракции костного мозга после предварительной *липэкспузии* осуществляли в замкнутой системе трех соединенных между собой мешков для сбора крови (Teguto). Количество стволовых клеток костного мозга определяли с помощью проточной цитофлуориметрии двухплатформенным методом по относительному содержанию CD34+ -клеток с помощью протокола ISHADE.

Всем больным проводили суточное ЭКГ-мониторирование, нагрузочный тест с 6-минутной ходьбой (для больных с сердечной недостаточностью), эхокардиографию на аппарате «Sonos1500» (HP, USA), коронарографию, однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (ОФЭКТ) с технетрилом или позитронную эмиссионную томографию (ПЭТ) для оценки перфузии и метаболизма миокарда.

**Результаты и обсуждение.** Процедура введения АМКМ переносилась хорошо, у отдельных больных имели место кратковременные эпизоды стенокардии в момент введения взвеси АМКМ, исчезающие при прекращении введения.

Изменения на ЭКГ имели место только в момент введения взвеси мононуклеаров в коронарное русло в виде кратковременной инверсии Т-волны у 1/3 пациентов. У двух пациентов имели место более длительные эпизоды ишемии на ЭКГ, сопровождавшиеся стенокардией, они купированы введением нитратов.

В течение послеоперационного периода каких-либо значимых изменений самочувствия не было. Через 3–4 дня после введения АМКМ пациенты были выписаны на амбулаторное лечение в удовлетворительном состоянии. Изменений клинических или биохимических анализов крови и мочи в ближайшем послеоперационном периоде не отмечено. Летальных исходов не было.

Клинически улучшение самочувствия отметили все больные через 2–6 мес после процедуры введения АМКМ. Уменьшение сердечной недостаточности и (или) коронарной недостаточности на 1–2 степени отмечено в течение первых 2–3–6 мес после инфузии АМКМ. При контрольном проведении нагрузочного теста с 6-минутной ходьбой у больных с сердечной недостаточностью отмечено увеличение толерантности к физической нагрузке (рис. 1).

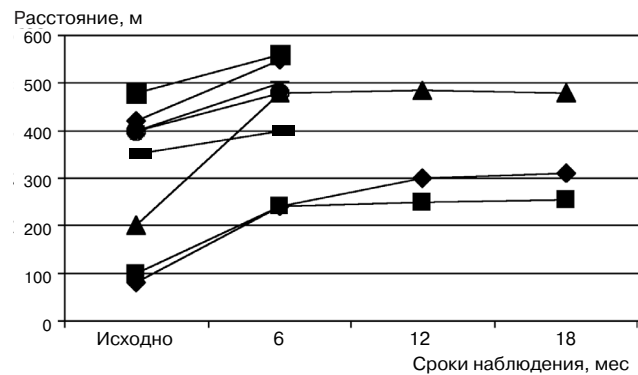


Рис. 1. Динамика теста 6-минутной ходьбы у 7 больных с ишемической болезнью сердца.

■, □, ▲, ●, ◆ — больные.

В группе больных с сердечной недостаточностью при эхокардиографии глобальная фракция изгнания левого желудочка в среднем увеличилась на  $(8 \pm 4,2)\%$ . Отмечено уменьшение конечного диастолического и конечного систолического объемов левого желудочка. При этом значимых изменений размеров сердца у больных с ИБС без сердечной недостаточности не выявлено (показатели оставались в пределах нормальных величин как и до введения.)

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография подтвердила отчетливое уменьшение зон гипоперфузии миокарда в сроки 3 и 6 мес как у больных 1-й, так и 2-й группы. Контрольные данные ОФЭКТ через 12 мес незначительно отличаются от состояния перфузии миокарда в сроки через 6 мес в положительную сторону. При позитронной эмиссионной томографии миокарда отмечено отчетливое улучшение перфузии и метаболизма миокарда через 3–6 мес после введения АМКМ (рис. 2) и сохраняется незначительная положительная динамика при сравнении данных в 6 мес и 12 мес в 1-й и 2-й группе пациентов.

В среднем каждому больному было введено около 60 мл взвеси клеток, содержащей  $4,7\text{--}10 \times 10^8$  ядросодержащих клеток, из них  $1,2\text{--}1,8 \times 10^8$  (12–24%) мононуклеаров и  $1,5\text{--}3 \times 10^6$  (1,3–2,5%) клеток CD34+. Количество АМКМ существенно не отличалось в исследуемых группах больных.

При суточном ЭКГ-мониторировании в исследуемых группах больных, получавших АМКМ катетерным способом, не отмечено значимых изменений сердечного ритма и проводимости в сроки 6 и 12 мес.

Результаты динамического наблюдения за больными свидетельствуют об эффективности использования АМКМ у больных с ИБС. Целесообразным следует считать ее применение у различных групп больных. Она всегда полезна в сочетании с прямыми реваскуляризирующими

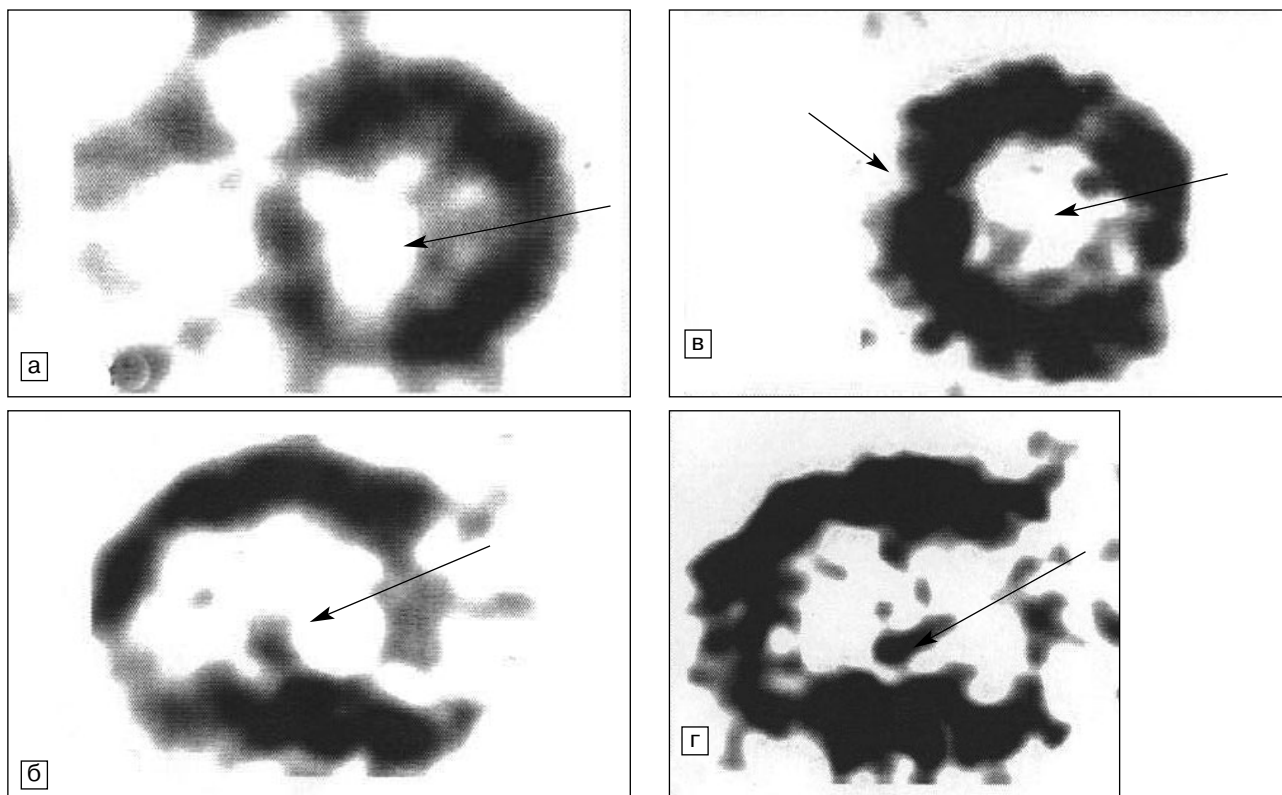


Рис. 2. Показатели позитронной эмиссионной томографии сердца с  $^{18}\text{F}$ -фтордезоксиглюкозой у больных с ишемической болезнью сердца до (а, б) и через 6 мес (в, г) после трансплантации аутологических мононуклеаров костного мозга. Стрелкой указана зона нарушений перфузии и метаболизма миокарда.

операциями (аортокоронарным шунтированием и ангиопластикой со стентированием).

Весьма тяжелой группой являются больные с рецидивами стенокардии или повторными инфарктами миокарда после перенесенного ранее аортокоронарного шунтирования вследствие стенозирования и тромбоза шунтов. К сожалению, эффективные повторные операции у этих больных возможны в редких случаях. В этой ситуации трансплантация АМКМ является достойной альтернативой повторным операциям. Наш опыт свидетельствует, что отчетливый эффект достигался в тех случаях, когда имел место рецидив стенокардии при сохранении функции по крайней мере одного из ранее наложенных шунтов или при дистальной форме поражения коронарных артерий.

Известно [9, 10], что физиологическая регенерация при ишемических повреждениях миокарда осуществляется за счет стволовых клеток костного мозга. Необходимыми условиями этого процесса являются: 1) выброс достаточного объема стволовых клеток в кровотоки; 2) свободный доступ стволовых клеток в очаг повреждения; 3) достаточная концентрация стволовых клеток в кровотоке. В обычных клинических условиях выполнение этих требований представляется сомнительным. Описанная методика

трансплантации стволовых клеток позволяет обеспечить все три условия. Но при этом, конечно, следует представлять, что улучшение клинического течения заболевания и показателей метаболизма и функции миокарда являются лишь косвенными свидетельствами эффективности трансплантации стволовых клеток. Необходимы прямые подтверждения появления новых кардиомиоцитов или ангиогенеза после трансплантации стволовых клеток. Пока получить их нельзя в связи с отсутствием точных маркеров стволовых клеток. Неизвестно также, что происходит в миокарде с пересаженными клетками. Подвергаются ли они трансдифференцировке или происходит межклеточная интеграция. Важно установить, какие клеточные и генетические механизмы регулируют эти процессы, какова роль клеточных реакций и механизмов апоптоза. Остается неясным, каковы масштабы гибели и переживаемости клеток. Решение этих важных вопросов позволит объективно оценить эффективность трансплантации стволовых клеток при ИБС и наметить пути ее повышения.

Но уже сейчас есть все основания считать, что клеточная терапия является новым революционным и весьма перспективным методом лечения больных с ИБС в реальной клинической практике.

**Выводы.** 1. Использование трансплантации аутологичных стволовых клеток костного мозга при проведении операций аортокоронарного шунтирования или ангиопластики и стентирования коронарных артерий позволяет повышать эффективность этих операций за счет улучшения перфузии и метаболизма миокарда.

2. Трансплантация АМКМ является эффективным методом лечения больных с рецидивирующей стенокардией или повторным инфарктом миокарда после ранее перенесенных операций.

3. В качестве монотерапии трансплантация АМКМ может быть рекомендована больным с ИБС с дистальным поражением коронарного русла.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Беленков Ю.Н., Агеев Ф.Т., Мареев В.Ю. и др. Стволовые клетки и их применение для регенерации миокарда // Сердечная недостаточность.—2004.—Т. 4, № 4.—С. 168–173.
- Потапов И.В., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А. Клеточная кардиомиопластика (аналитический обзор) // Вестн. трансплантол. и искусственных органов.—2001.—№ 2.—С. 46–53.
- Assmus B., Schachinger V., Teupe C. et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration Enhancement in acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI) // Circulation.—2002.—Vol. 106.—P. 3009.
- Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // Cell.—2003.—Vol. 114.—P. 763–776.
- Beltrami A.P., Urbaneck K., Kajstura J. et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction // N. Engl. J. Med.—2001.—Vol. 344.—P. 1750–1757.
- Hamano K., Nishida M., Hirata K. et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results // Jpan. Circ. J.—2001.—Vol. 65, № 5.—P. 845–847.
- Hierlihya A.M., Seale P., Lobe C.G. et al. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population // FEBS Letters.—2002.—Vol. 530.—P. 239–243.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // Nature.—2001.—Vol. 410.—P. 701–705.
- Orlic D., Hill J., Arai A., Stem cells for myocardial regeneration // Circ. Research.—2002.—Vol. 91, № 12.—P. 1092–2015.
- Stamm C, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration // Lancet.—2003.—Vol. 361.—P. 45–46.
- Strauer B.E., Brehm M., Zeus T. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans // Circulation.— 2002.— Vol. 106.—P. 1913–1918.

Поступила в редакцию 25.03.2006 г.

V.M.Sedov, A.S.Nemkov, B.V.Afanasiev, O.G.Zverev, A.O.Nesterko, L.M.Fregatova, S.A.Bely, E.A.Slojdo, O.V.Yudina, D.V.Ryzhkova, E.E.Zueva, N.V.Petrov, O.F.Stovpyuk, S.P.Tsurupa

#### EFFECTIVENESS OF USING AUTOLOGOUS MONO-NUCLEARS OF THE BONE MARROW IN TREATMENT OF PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

The authors have analyzed their experiences with treatment of 50 patients with ischemic heart disease using transplantation of autologous mono-nuclears of the bone marrow. It was shown that this operation resulted in an improvement of indices of the heart functions and myocardium metabolism. Transplantation of stem cells as mononuclear fraction of the bone marrow is indicated in treatment of different groups of patients: in recurrent diseases after previous operations on the coronary arteries; in patients with distal lesions of the coronary bed; transplantation of autologous stem cells of the bone marrow is expedient simultaneously with coronary artery bypass grafting or coronary angioplasty (stenting).