

DOI: 10.15825/1995-1191-2015-1-126-133

# КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ЭНДОМИОКАРДИАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ У БОЛЬНОГО С ВЫРАЖЕННОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ МИОКАРДА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА

*Е.Н. Кливер, А.М. Чернявский, Е.А. Покушалов, Е.Э. Кливер, А.М. Волков*

ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава РФ, Новосибирск, Российская Федерация

**Цель.** Представить результаты клиничко-морфологического исследования после интрамиокардиального введения моноклеарной фракции клеток костного мозга, выполненного пациенту с хронической сердечной недостаточностью при ишемической болезни сердца. В октябре 2007 года больному проводилась операция интрамиокардиальной имплантации моноклеарной фракции клеток костного мозга с использованием системы NOGA. С этого же времени пациент был включен в лист ожидания трансплантации сердца. Отмеченное у больного по истечении двухлетнего срока наблюдения улучшение самочувствия, увеличение фракции выброса левого желудочка с 22 до 27%, снижение конечно-систолического объема левого желудочка с 265 мл до 250 мл указывало на стабилизацию гемодинамических показателей и позволило дожидаться ортотопической пересадки сердца, которая была выполнена в декабре 2009 года.

*Ключевые слова:* моноклеарная фракция аутологичных клеток костного мозга, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца.

## CLINIC-MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF THE APPLICATION OF THE MONONUCLEAR FRACTION OF AUTOLOGOUS BONE MARROW CELLS IN ENDOMYOCARDIAL IMPLANTATION IN A PATIENT WITH SEVERE ISCHEMIC MYOCARDIAL DYSFUNCTION OF THE LEFT VENTRICLE

*Ye.N. Kliever, A.M. Cherniavsky, Ye.A. Pokushalov, Ye.E. Kliever, A.M. Volkov*

Ye.N. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

**Aim.** The purpose of this study is to conduct clinic-morphological analysis following intramyocardial administration of a mononuclear fraction of bone marrow stem cells in a CHF patient suffering from ischemic heart disease. In October 2007 the patient underwent surgery, with a mononuclear fraction of bone marrow stem cells implanted with the use of a NOGA system. The patient was then put on a waiting list for heart transplantation. After 2-year follow-up amelioration was observed, LVEF increased from 22 to 27%, LF end systolic volume dropped from 265 ml to 250 ml. All these positive developments indicated the stabilization of hemodynamic indicators and enabled to wait for orthotopic heart transplantation which was performed in December 2009.

*Key words:* a mononuclear fraction of autologous bone marrow cells, heart failure, ischemic heart disease.

**Для корреспонденции:** Кливер Елена Николаевна. Адрес: 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15. Тел. (383) 332 47 58. E-mail: ekliiver@mail.ru

**For correspondence:** Kliever Yelena Nikolayevna. Address: 15, Rechkunovskaya Str, Novosibirsk, 630055. Tel. (383) 332 47 58. E-mail: ekliiver@mail.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема ишемической болезни сердца (ИБС) занимает одно из ведущих мест среди важнейших медицинских проблем XXI века. Являясь распространенным заболеванием, ИБС стоит первой среди основных причин смертности, а также временной и стойкой утраты трудоспособности населения в развитых странах мира. Судьба больных ИБС во многом зависит от качества и своевременности диагностики, а в последующем и от адекватности проводимого современного терапевтического и хирургического лечения. Существует группа пациентов с атеросклеротическим поражением дистальных отделов коронарного русла, которым используемые традиционные методы хирургии ИБС не позволяют выполнить адекватную реваскуляризацию миокарда [1–4]. В 2007 году в ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России было начато ограниченное клиническое исследование по эндомиокардиальной имплантации мононуклеарной фракции аутологичных клеток костного мозга (МФККМ) пациентам с ИБС. Протокол исследования был одобрен Локальным этическим комитетом (протокол № 10 от 15.02.2007), все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Основной целью исследования была оценка долгосрочных результатов современной терапии и эндомиокардиального введения клеток костного мозга пациентам с хронической ишемической сердечной недостаточностью [5].

**Цель публикации:** представить отдаленные двухлетние клиничко-морфологические результаты интрамиокардиального введения МФККМ с использованием системы NOGA, выполненной пациенту с ишемической дисфункцией миокарда левого желудочка.

## КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ И МЕТОДЫ

*Пациент Ш. 56 лет поступил в ФГБУ «ННИИПК имени академика Е.Н. Мешалкина» в феврале 2007 года с жалобами на одышку при незначительной физической нагрузке: ходьбе 150 метров, подъеме на 1–2 лестничных пролета. На момент госпитализации на фоне терапии, проведенной в стационаре, ночных приступов удушья не отмечает. В 1998 году перенес Q-позитивный циркулярный верхушечный инфаркт миокарда.*

*Больному проведено полное клиничко-инструментальное обследование. По данным выполненной селективной коронарографии: тип кровотока правый; на 5 левых и 2 правых коронарограммах определяется протяженная окклюзия правой коронарной артерии в средней и дистальной трети с системными перетоками, диффузное поражение передней нисходящей артерии в передней и средней трети со*

*стенозами до 80%, окклюзия передней нисходящей артерии после отхождения второй диагональной ветви с межсистемными перетоками и окклюзия огибающей артерии после отхождения I ветви тулового края с внутрисистемными перетоками.*

*По данным эхокардиографии (ЭХОКГ), левый желудочек (ЛЖ): конечно-диастолический размер (КДР) – 7,5–8,3 см, конечно-диастолический объем – 356 мл, конечно-систолический объем – 265 мл, фракция выброса – 20%. Межжелудочковая перегородка без особенностей. Левое предсердие 4,75 × 5,46 см, правое предсердие 4,35 × 4,85 см. Правый желудочек (ПЖ): КДР – 2,5 см. Заключение: значительно расширен ЛЖ, расширены оба предсердия; показатели глобальной сократимости миокарда значительно снижены. Диастолическая дисфункция ЛЖ II типа (рестриктивный тип). На фоне диффузного гипоакинеза миокарда ЛЖ дискинез зоны верхушки. Митральная регургитация 2–3-й степени, до умеренной по объему. Трикуспидальная регургитация 1–2-й степени. Расчетное систолическое давление в легочной артерии 45 мм рт. ст.*

*Учитывая полученные в ходе обследования клиничко-anamнестические данные, пациенту был выставлен клинический диагноз: «ишемическая болезнь сердца; стенокардия напряжения 2-го ФК; ПИКС (ИМ Q позитивный, нижнебоковой, 1998 год); митральная регургитация 3-й степени; умеренная легочная гипертензия, ХСН IIА, III ФК (NYHA)».*

*Принимая во внимание выраженность поражения коронарных артерий, невозможность выполнения их стентирования, а также высокий риск открытого хирургического вмешательства, с использованием системы NOGA пациенту была выполнена эндомиокардиальная имплантация МФККМ в заднюю, переднюю, боковую стенки, а также участок межжелудочковой перегородки левого желудочка. В день процедуры введения костный мозг аспирировался из подвздошного гребня под местной анестезией по стандартной методике. Мононуклеарные клетки костного мозга изолировались путем центрифугирования на градиенте плотности Ficoll (1,077; Ficoll-PlaquePlus, Amersham Pharmacia Biotech). Затем были проведены 3 пошаговые отмывки, клетки ресуспензировались в гепаринизированном физиологическом растворе для дальнейшего использования. Жизнеспособность клеток тестировалась трепановым синим (метод исключения) и достигала более чем 98% для каждого трансплантата. Среднее значение введенных клеток составило  $41 \pm 16 \times 10^6$ . Фракция CD34/CD45-позитивных клеток измерялась в количестве  $2,5 \pm 1,6\%$ . Течение послеоперационного периода без осложнений. При выписке пациент включен в лист ожидания трансплантации сердца.*

В течение двух лет больной проходил плановые обследования в клинике. За этот период отмечено значимое повышение следующих показателей: фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) с 20 до 27%, шестиминутного теста со 155 до 315 метров (табл.).

Таблица

**Клинико-функциональные показатели**

Показатель	Период наблюдения		
	исходно	1 год	2 года
ФК СН	2	2	3
ХСН (NYHA)	3	3	3
ФВ ЛЖ, %	20	22	27
КДО ЛЖ, мл	356	316	315
КСО ЛЖ, мл	265	250	250
КДР ЛЖ, см	8,3	7,6	7,6
УО, мл	90	66	65
p ЛА, мм рт. ст.	45	47	50
Шестиминутный тест, м	155	345	315

По данным 2-этапной (покой–аденозин) ЭКГ-синхронизированной томосцинтиграфии, в 2009 году имелось снижение перфузии миокарда верхушки, передней и нижней стенок в сегментах: 4, 7, 10, 13, 14, 16, 17, 19, 20. В ответ на инфузию аденозина небольшое ухудшение перфузии миокарда в сегментах 4, 5, 8, 12, 17 и более выраженное ухудшение перфузии миокарда в сегментах 10, 11, 18. ФВЛЖ (по Gated SPECT) составила 14%. В сравнении с исследованием от октября 2007 года отмечалось улучшение перфузии нижней стенки в покое и увеличение коронарного резерва в области передней и нижней стенок (увеличение и сохранение зоны красного цвета; рис. 1) Суммарная оценка участка гипоперфузии на этапе покоя составила 16 баллов, участка гипоперфузии на нагрузочном этапе – 29 баллов.

Результаты электроанатомического картирования левого желудочка представлены ниже. Общее число точек и их распределение (число точек в сегменте) незначительно отличалось от первоначального картирования (рис. 2) и при 24-месячном контроле (рис. 3). Общий униполярный вольтаж (UV) увеличился с  $8,1 \pm 2,1$  до  $13,2 \pm 3,1$  через 24 мес., в основном за счет увеличенного вольтажа в тех сегментах, в которые была имплантирована МФКМ ( $5,2 \pm 1,2$  mV изначально и  $11,1 \pm 2,1$  mV через 24 мес.). В тех сегментах, в которые МФКМ не вводилась, униполярный вольтаж оставался практически неизменным.

В декабре 2009 года пациенту в ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России была выполнена операция ортотопической трансплантации сердца.

**МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ И МЕТОДЫ**

Патологоанатомическое исследование эксплантационного препарата сердца было выполнено в патологоанатомическом отделении ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России.

Макроскопические данные препарата сердца реципиента: вес – 470 г, размеры –  $13,0 \times 11,0 \times 9,5$  см. Правое предсердие: эндокард чистый, гладкий. Толщина стенки правого желудочка  $0,5 \times 0,4 \times 0,4 \times 0,5$  см, приток – 7,0 см, отток – 8,5 см, эндокард гладкий. Периметр отверстия правильно сформированного трикуспидального клапана 12,5 см, створки склерозированы, уплотнены, клапана легочной артерии 8,0 см. Левое предсердие: эндокард гладкий. Толщина стенки левого желудочка  $1,7 \times 1,2 \times 0,8 \times 1,7$  см, приток – 8,0 см, отток – 10,5 см. Полость дилатирована. Периметр отверстия правильно сформированного аортального клапана 7,5 см, митрального – 11,0 см, створки склерозированы, уплотнены. Миокард бордового цвета, плотный, на разрезе с обширными участками белесоватого цвета в передне-верхушечно-боковой области (рис. 4, 5).

Кусочки миокарда для гистологического исследования иссекали из передней, задней и верхушечной части левого желудочка и межжелудочковой перегородки сердца, фиксировали в 10% растворе формалина на фосфатном буфере и заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм готовились на микротоме фирмы Microm HM 550 и окрашивались гематоксилин-эозином, по методу Ван-Гизона с комбинированной докраской эластике орсеином, так же проводилась постановка PAS-реакции, метода импрегнации срезов серебром (по Гомори) и окраска трихромом Массона с добавлением голубого анилина. Обзорное гистологическое исследование проводили с помощью программно-микроскопного комплекса, который включал в себя световой микроскоп ImadgerM2 немецкой фирмы ZEISS, цифровую видеокамеру AxioCamHRc и компьютер Pentium 4. Иммуногистохимическое окрашивание гистологических препаратов выполнено на автоматическом иммуногистостейнере Benchmark XT Ventana с использованием мышинных моноклональных антител к CD31(1A10) Roche и к CD34 (QBEnd/10) Roche и системы визуализации ultraViewUniversal DAB DetectionKit (Roche).

По данным микроскопического исследования гистологических препаратов, в левом желудочке на фоне диффузного и очагового кардиосклероза (рис. 6) отмечаются явления интерстициального отека, в кардиомиоцитах местами гомогенизация цитоплазмы, мелкокапельная дистрофия. В субэпикардальных слоях фрагментация мышечных волокон. В миокарде очаги миоцитолитоза. Интима артерий утолщена, в части из них участки кальциноза, в просвете сосудов эритроцитарные стазы.



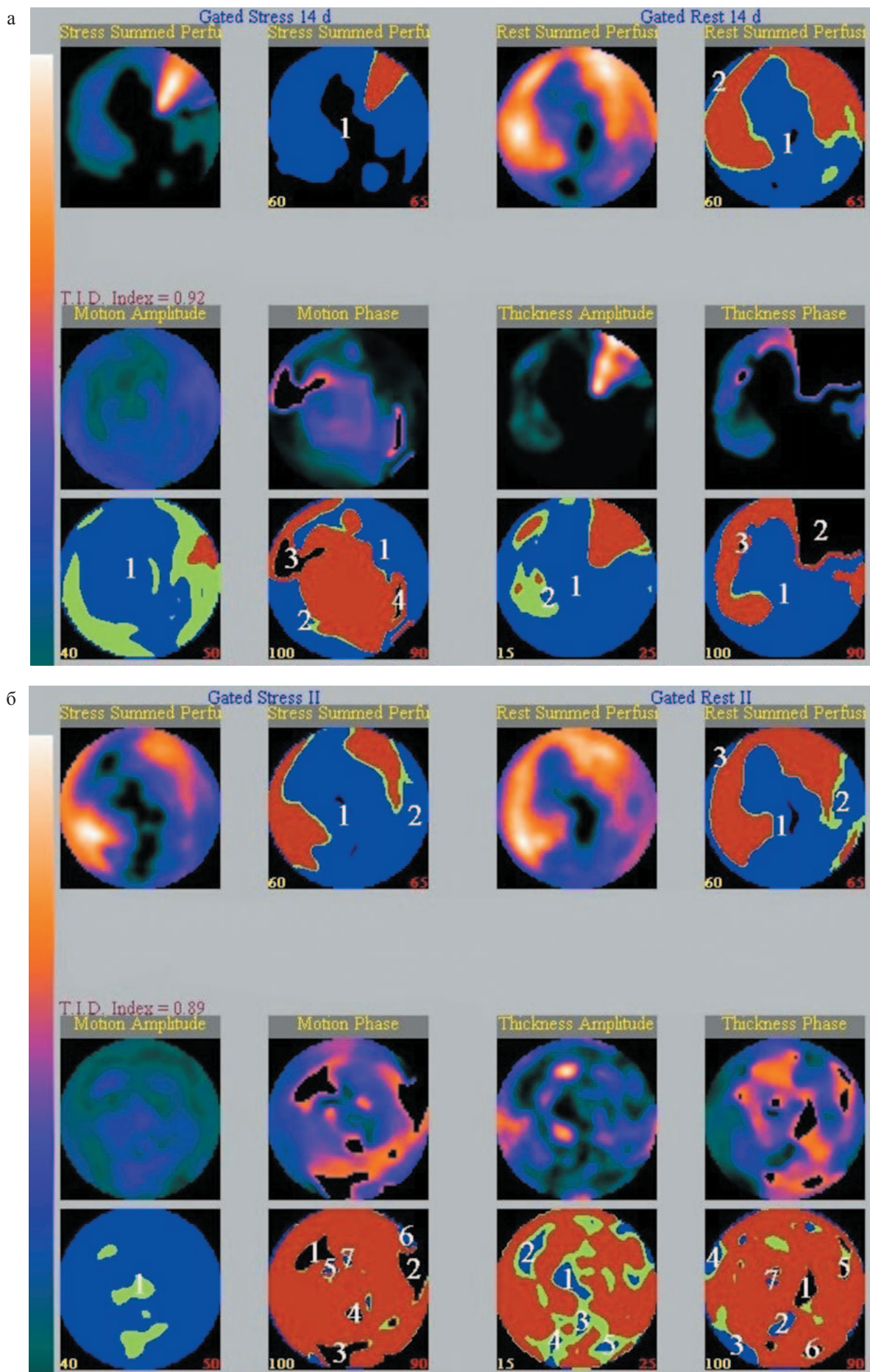


Рис. 1. Данные двухэтапной перфузионной сцинтиграфии миокарда: а – 2007 год; б – 2009 год

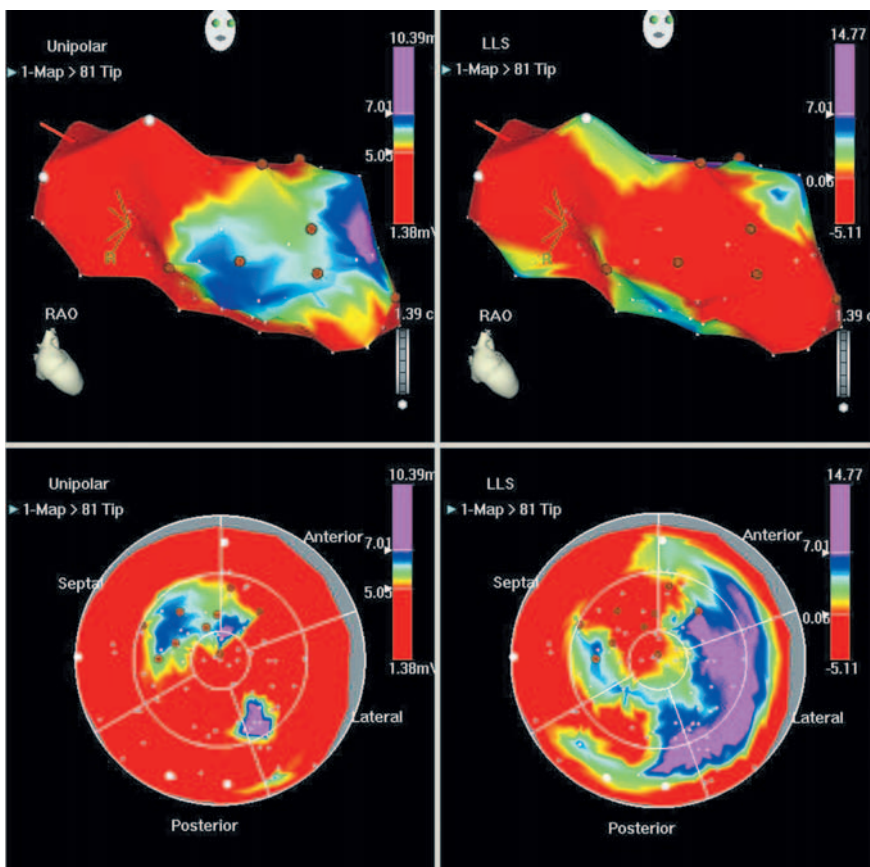


Рис. 2. Исходные результаты электроанатомического картирования

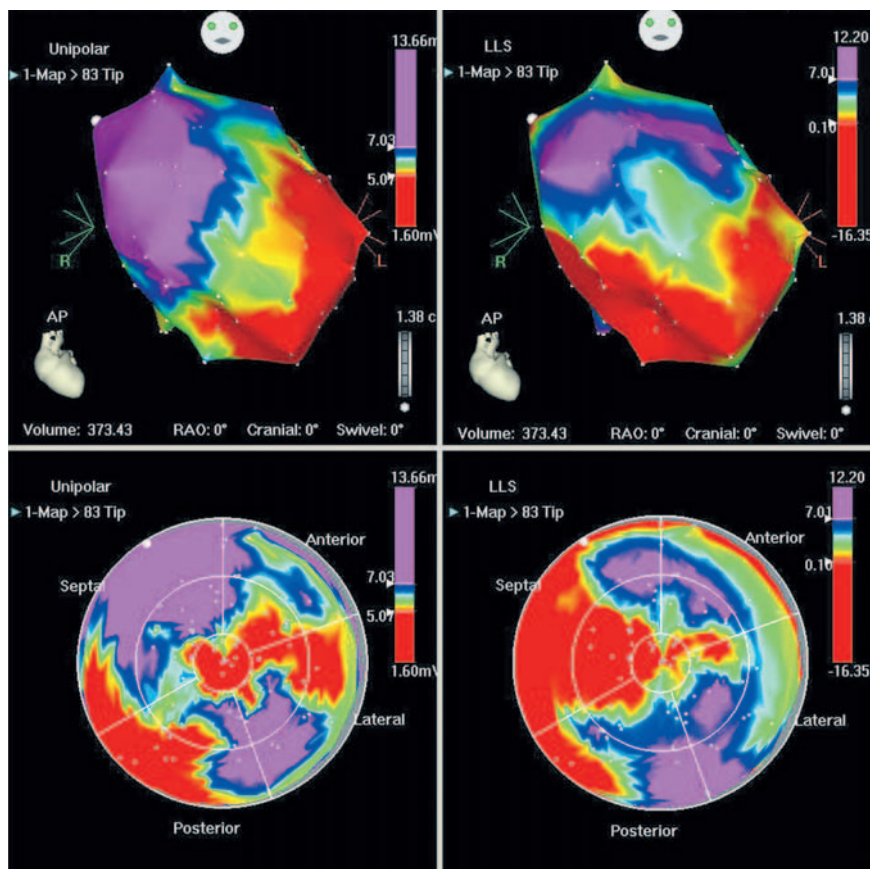


Рис. 3. Двухлетние результаты электроанатомического картирования



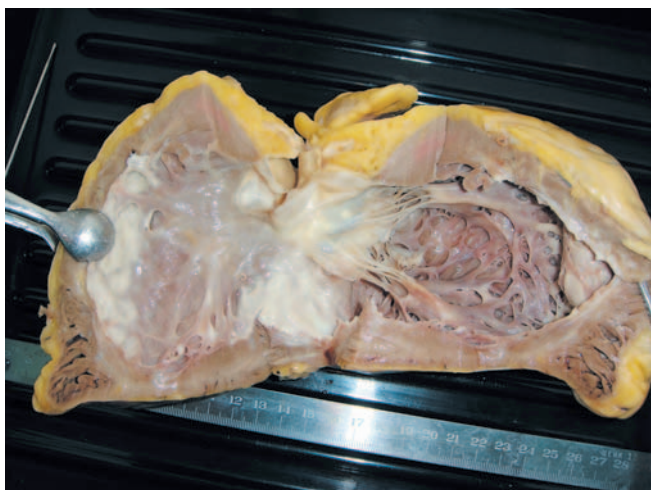


Рис. 4. Макропрепарат сердца. Левый желудочек с обширным кардиосклерозом. Фиксация 10% формалином

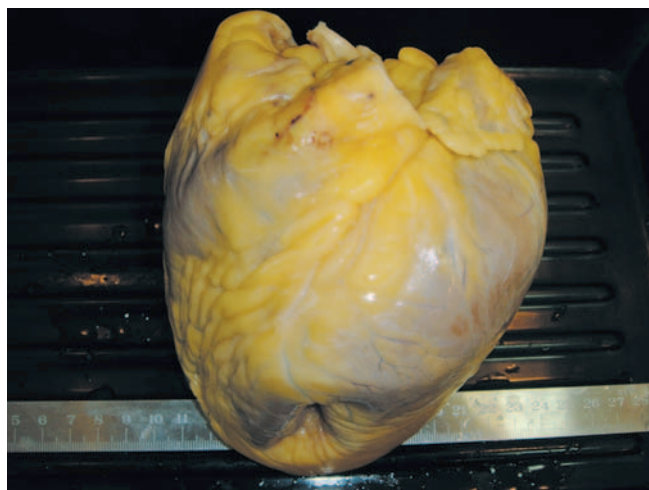


Рис. 5. Макропрепарат сердца. Общий вид передне-боковой проекции левого желудочка с участком формирующейся верхушечной аневризмы. Фиксация 10% формалином

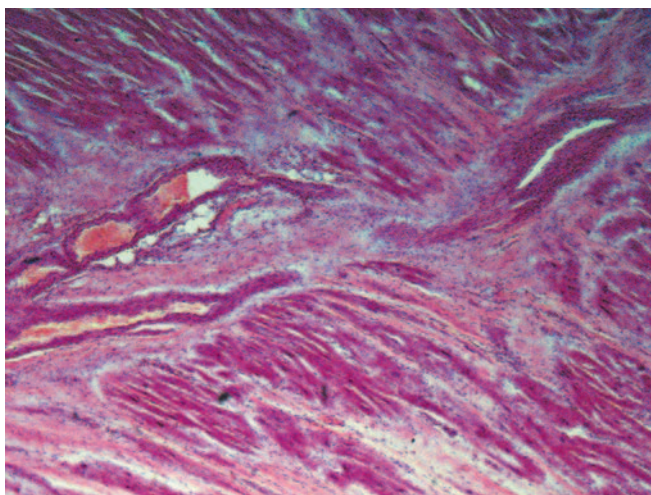


Рис. 6. Миокард левого желудочка с зонами диффузного и очагового кардиосклероза. Окраска гематоксилин-эозином.  $\times 350$

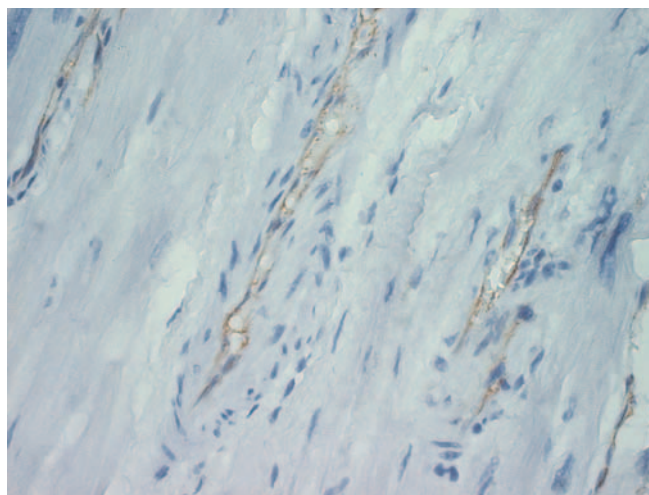


Рис. 7. Миокард левого желудочка. Очаги скопления кровеносных сосудов малого диаметра с позитивным окрашиванием эндотелиальной выстилки на CD31.  $\times 400$

При проведении иммуногистохимического исследования гистологических препаратов отмечено, что на фоне участков кардиосклероза в миокарде левого желудочка выделяются очаги скопления кровеносных сосудов малого диаметра. Это подтверждается позитивным окрашиванием их эндотелиальной выстилки на CD31 (рис. 7). При этом полученное негативное окрашивание на CD34 (рис. 8) указывает на отсутствие какого-либо активного процесса деления эндотелиоцитов, и соответственно, активной ревазуляризации данного региона на момент проведения аутопсии.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время использование клеточной терапии в практическом здравоохранении у пациентов

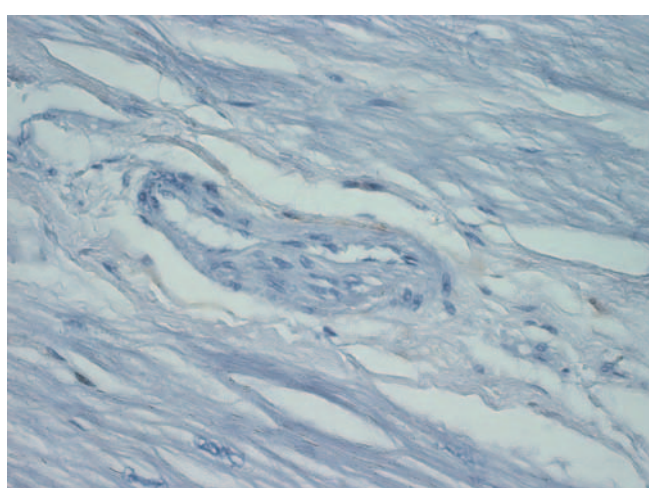


Рис. 8. Миокард левого желудочка. Кровеносные сосуды малого диаметра с негативным окрашиванием эндотелиальной выстилки на CD34.  $\times 400$

с хронической сердечной недостаточностью приобретает все большее значение. Из различных ее направлений трансплантация прекультивированных мезенхимальных стволовых клеток аутологичного костного мозга является наиболее перспективной [6–8]. 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 [9].

Полученные клинические результаты по интрамиокардиальной имплантации МФККМ больным с ишемической болезнью сердца показали, что данная методика лечения является перспективной, эффективной и безопасной для пациентов и не требует длительного пребывания последних в стационаре [5, 9, 10].

Введение клеток в ишемизированные сегменты улучшает перфузию без индукции дополнительных рубцовых зон. Многочисленные авторские работы подтверждают возможность клеток костного мозга участвовать в восстановлении микроциркуляторного русла ишемизированного миокарда [7, 12], что показано и в результатах нашего наблюдения. Интенсивный неоваскулогенез после имплантации костномозговых клеток в перирубцовую зону обусловлен не только непосредственным участием МФККМ, но и экспрессией этими клетками таких факторов ангиогенеза, как фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтина и других [13]. Стоит отметить, что вышеперечисленные процессы, по результатам проведенного исследования [5], имеют максимальный клинико-морфологический эффект в первый год после имплантации клеток, который несколько снижается с течением времени. На это же указывает полученное нами негативное окрашивание на CD34, который является клеточным поверхностным антигеном, экспрессирующимся как на гематопоетических прогениторных клетках, включая миелоидную и лимфоидную линии клеток-предшественников, так и на сосудистом эндотелии, причем пролиферирующие эндотелиальные клетки экспрессируют эти молекулы в большем количестве, чем непролиферирующие. Данный результат указывает на отсутствие какого-либо активного процесса деления эндотелиоцитов, и соответственно, активной реваскуляризации по истечении двух лет после интрамиокардиального введения МФККМ.

Клинический эффект клеточной терапии в нашем наблюдении проявился увеличением фракции выброса, снижением конечно-систолического объема левого желудочка, а также улучшением самочувствия и практически двукратным увеличением

результатов 6-минутного теста. Все это указывает на стабилизацию гемодинамических показателей и является положительным прогностическим признаком в данной категории больных, у которых сохраняется достаточно высокий риск фатального ремоделирования левого желудочка. Кроме этого, у части пациентов, находящихся в листе ожидания для выполнения ортотопической пересадки сердца, появляется реальный временной промежуток, чтобы дождаться единственно возможного для них хирургического лечения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бокерия ЛА, Бершвили ИИ, Сигаев ИЮ. Современные тенденции и перспективы развития коронарной хирургии. *Анналы хирургии*. 2004; 4: 31–45. *Boqueria LA, Berishvili II, Sigayev IJ*. Current trends and prospects of development of coronary surgery. *Annals of Surgery*. 2004; 4: 31–45.
2. Беленков ЮН. Дисфункция левого желудочка у больных с ишемической болезнью сердца: современные методы диагностики, медикаментозной и немедикаментозной коррекции. *Русский медицинский журнал*. 2000; 3 (17): 685–693. *Belenkov JN*. Left ventricular dysfunction in patients with coronary heart disease: modern methods of diagnosis, medication and non-pharmacological correction. *Russian Journal of Medicine*. 2000; 3 (17): 685–693.
3. Беленков ЮН. Ремоделирование левого желудочка: комплексный подход. *Сердечная недостаточность*. 2002; 3 (4): 161–169. *Belenkov JN*. Left ventricular remodeling: an integrated approach. *Cardiac Failure*. 2002, 3 (4): 161–169.
4. Silva G, Perin E, Dohmann H, Borojevic R, Silva S. Catheter-based transendocardial delivery of autologous bone-marrow-derived mononuclear cells in patients listed for heart transplantation Texas Heart. Inst. 2004; (31): 214–219.
5. Кливер ЕН, Чернявский АМ, Покушалов ЕА и др. Результаты интрамиокардиального введения мононуклеарной фракции аутологичных клеток костного мозга пациентам с ишемической болезнью сердца, осложненной сердечной недостаточностью. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2013; 15 (3): 83–91. *Kliever YeN, Cherniavsky AM, Pokushalov EA et al*. The results intramiocardinalno administration mononuclear fraction of autologous bone marrow cells in patients with coronary heart disease complicated by heart failure. *Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2013; 15 (3): 83–91.
6. Потанов ИВ, Башкина ЛВ, Зайденев ВА 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: 88–89. *Potapov IV, Bashkina LV, Zaydenov VA et al*. Effect of transplantation of fetalcardiomyocytes and mesenchymalbone

- marrow cellson the contractilefunction of the heart in experimental myocardial infarction. *Bulletin of Transplantation and Artificial organs*. 2002; 3: 88–89.
7. Koçak H, Becit N, Ceviz M, Unlü Y. Left ventricular pseudoaneurysm after myocardial infarction. *Heart Vessels*. 2003; 18 (3): 160–162.
  8. Kohmoto T, Uzun G, Gu A et al. Blood flow capacity via direct acute myocardial revascularization. *Basic. Res. Cardiol*. 1997; 92: 45–51.
  9. Ortak J, Akin I, Kische S et al. Stem cell use for cardiac diseases as of 2008. *Transfusion and Apheresis Science*. 2008; 38: 253–260.
  10. Perin ES, Yong-Jian Geng, Willerson JT. Adult Stem Cell Therapy in Perspective. *Circulation*. 2003; 107: 935.
  11. Tse HF, Kwong YL, Chan JK. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003; 361 (9351): 47–49.
  12. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patients with ischaemic limb. *Lancet*. 1996; 348: 370–374.
  13. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T. 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.

Статья поступила в редакцию 17.07.2014 г.