

Obrazowanie wczesnego zasiedlenia podanych przezwieńcowo komórek CD34⁺ w strefie granicznej uszkodzenia zawałowego

Visualisation of early engraftment of transc coronary applied CD34⁺ cells in the infarct border zone

Piotr Musiałek^{1,2}, Wiesława Tracz^{1,2}, Magdalena Kostkiewicz^{1,2}, Łukasz Tekieli^{1,2}, Wojciech Szot^{1,2},
Piotr Klimeczek², Paweł Banyś², Anna Zebzda³, Marcin Majka³, Zbigniew Walter⁴, Maria Olszowska^{1,2},
Piotr Pieniążek^{1,2}, Mieczysław Pasowicz^{1,2}

¹ Instytut Kardiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

² Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Kraków

³ Zakład Transplantologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁴ Katedra i Klinika Hematologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Abstract

Successful delivery of progenitor cells to the injury zone is a prerequisite for any effect of myocardial regeneration therapy. This key issue, however, has received far less attention than, for instance, a potential need for cell type selection or ex-vivo expansion, the optimal timing of cell application or multimodal functional evaluation after cellular transplantation.

By combining myocardial perfusion scintigraphy, magnetic resonance imaging and ⁹⁹Tc-HMPAO-labelled autologous bone marrow-derived CD34⁺ cells visualisation, we show in a 63-year-old man with a large anterior myocardial infarction that transc coronary applied cells (*via* the central lumen of an inflated over-the-wire balloon positioned in the stent implanted in primary PCI) graft preferentially to the infarct *border* zone. This is consistent with the idea that the area of myocardial 'irreversible' injury (i.e. the no-perfusion zone on perfusion scintigraphy or late enhancement zone on magnetic resonance) remains largely inaccessible to transc coronary-applied cells; thus other techniques need to be considered if the cell delivery is aimed at the zone of irreversible injury.

The potency of such combined high-resolution visualisation provides grounds for comparing the efficacy of different methods of cell delivery after a recent myocardial infarction in man.

Key words: transc coronary bone marrow cell delivery, myocardial progenitors, CD34⁺ cells, cell retention, early stem cell engraftment, myocardial homing, myocardial border zone regeneration

Kardiol Pol 2008; 66: 73–77

Wstęp

Pierwsze badania eksperymentalne, w których testowano możliwość regeneracji strefy uszkodzenia zawałowego mięśnia serca przez komórki macierzyste szpiku, dostarczyły obiecujących wyników i stały się motorem badań klinicznych, w których do przezwieńcowego podania komórek (*via* naczynie dozawałowe) stosowany jest uniwersalnie cewnik balonowy typu *over-the-wire* [1].

W badaniach klinicznych skupiono się przede wszystkim na zagadnieniach optymalnego czasu podania komórek w stosunku do wystąpienia uszkodzenia zawałowego [podanie wczesne – 1. doba zawału serca (MI) vs skoordynowane z endogennym wyrzutem komórek macierzystych – 7.–10. doba MI], doborze i przygotowaniu komórek do autoprzeszczepu oraz multimodalnej ocenie czynności lewej komory (LV) w obserwacji kilku- lub kilkunastomiesięcznej przy zastosowaniu klasycznej wentry-

Adres do korespondencji:

dr n. med. Piotr Musiałek, Klinika Chorób Serca i Naczyń CM UJ, KKS im. Jana Pawła II, ul. Prądnicka 80, 31-202 Kraków, tel.: +48 12 614 22 87, faks: +48 12 423 43 76, e-mail: pmusialek@szpitaljp2.krakow.pl

Praca wpłynęła: 09.11.2007. Zaakceptowana do druku: 21.11.2007.

Badanie finansowane w części z projektu PBZ-KBN-099/P05/2003.

kulografii, echokardiografii z uwzględnieniem próby dobutaminowej i echokardiografii kontrastowej oraz kardiologicznego rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) [1–3]. Stosunkowo niewiele uwagi poświęcono natomiast ocenie zasiedlenia komórek w sercu i optymalizacji ich podawania.

Zasiedlenie strefy uszkodzenia zawałowego przez komórki progenitorowe jest bezwzględny warunkiem dla zaistnienia jakiegokolwiek efektu terapeutycznego. Badania obrazowe, oceniające z wysoką rozdzielczością przestrzenną retencję komórek macierzystych, są konieczne dla rzetelnej oceny wyników badań klinicznych obejmujących stosowanie komórek szpikowych u chorych po zawale mięśnia serca.

Przedstawiamy chorego, u którego technika znakowania autologicznych komórek CD34⁺ znacznikiem radioizotopowym (^{99m}Tc) została wykorzystana do wizualizacji wczesnego zasiedlenia w strefie uszkodzenia zawałowego. Ocena zasiedlenia została wykonana w powiązaniu z obrazowaniem uszkodzenia zawałowego w scyntygrafii perfuzyjnej (ang. *single photon emission computed tomography*, SPECT) i w MRI.

Opis przypadku

Chory w wieku 63 lat został przyjęty w 6. godz. ostrego MI ściany przedniej z uniesieniem odcinka ST. Koronarografia uwidoczniała proksymalne zamknięcie tętnicy międzykomorowej przedniej. Wykonano udrożnienie naczynia z implantacją stentu Evolution 3,0 × 13 mm i uzyskano przepływ TIMI 3.

Wczesny przebieg pozawałowy był niepowikłany. Maksymalna aktywność kinazy kreatyniny (CK) wynosiła 5069 U/l (norma 30–170 U/l), poziom izoenzymu CK-MB 721 U/l (norma <16 U/l). Maksymalny poziom troponiny I wyniósł 240,11 ng/ml (norma <0,10 ng/ml). Chory otrzymywał kwas acetylosalicylowy, klopidogrel, beta-bloker, inhibitor konwertazy angiotensyny i statynę. Chory wyraził świadomą dobrowolną zgodę na objęcie zaakceptowanym przez Komisję Bioetyczną UJ programem terapii autologicznymi znakowanymi komórkami macierzystymi.

W 7. dobie wykonano MRI serca z użyciem kontrastu paramagnetycznego (gadolinum-DPTA) i badanie SPECT mięśnia serca (^{99m}Tc-MIBI, po podaniu nitrogliceryny w celu lepszego zróżnicowania strefy niedokrwienia od strefy martwicy) [4, 5]. Badanie SPECT wykazało brak perfuzji w zakresie koniuszka i dystalnego segmentu przegrody międzykomorowej oraz hipoperfuzję w segmentach sąsiednich (strefa graniczna MI – Rycina 1A). Frakcja wyrzutowa LV (LVEF) obliczona metodą G-SPECT wynosiła 34%. Rezonans magnetyczny uwidoczniał akinezę koniuszka, hipokinezę ściany przedniej i przegrody międzykomorowej oraz obszar późnego wzmocnienia kontrastowego (*late enhancement*) w strefach odpowiadających brakowi perfuzji w SPECT (Rycina 1C). Frakcja wyrzutowa LV wynosiła 36% (objętość końcoworozkurczowa LV 124 ml, obję-

tość końcowoskurczowa LV 79 ml). Objętość strefy późnego wzmocnienia kontrastowego wynosiła 23 ml, co stanowiło 21% objętości mięśnia LV.

Pobranie, przygotowanie i znakowanie komórek

W 9. dobie MI z prawego talerza kości biodrowej pobrano w sposób typowy 90 ml szpiku kostnego [1, 4, 6]. Metodą immunomagnetyczną wyselekcjonowano komórki posiadające receptory CD34 [7]. Następnie komórki CD34⁺ (4,8 × 10⁶) zostały inkubowane (10 min) w zawiesinie technetu 99m (150 mBq) potężonego z hexamethyl-propylene-amine-oxime (HMPAO). Po przejściu przez błonę komórkową do wnętrza komórki lipofilny kompleks ^{99m}Tc-HMPAO ulega przemianie do kompleksu hydrofilnego, który pozostaje w komórce. Bezpośrednio po wyznakowaniu, komórki odwirowane i zawieszono w 10 ml roztworu fizjologicznego podano do tętnicy dozawałowej przez centralne światło wypełnionego cewnika balonowego *over-the-wire* (3,0 × 3,3 ml) [1, 4].

Wczesna retencja komórek – odsetek zasiedlenia w sercu i określenie obszaru zasiedlenia

Sześćdziesiąt minut po zabiegu przezwieńcowego podania znakowanych komórek u chorego wykonano badanie SPECT. Scyntygrafia całego ciała (ang. *whole body SPECT*) uwidoczniała obecność znacznika w sercu (3,42% całkowitej aktywności, Rycina 2.), co potwierdza wczesną retencję części podanych komórek w sercu. Wysoką aktywność znacznika stwierdzono przede wszystkim w wątrobie, płucach i śledzionie.

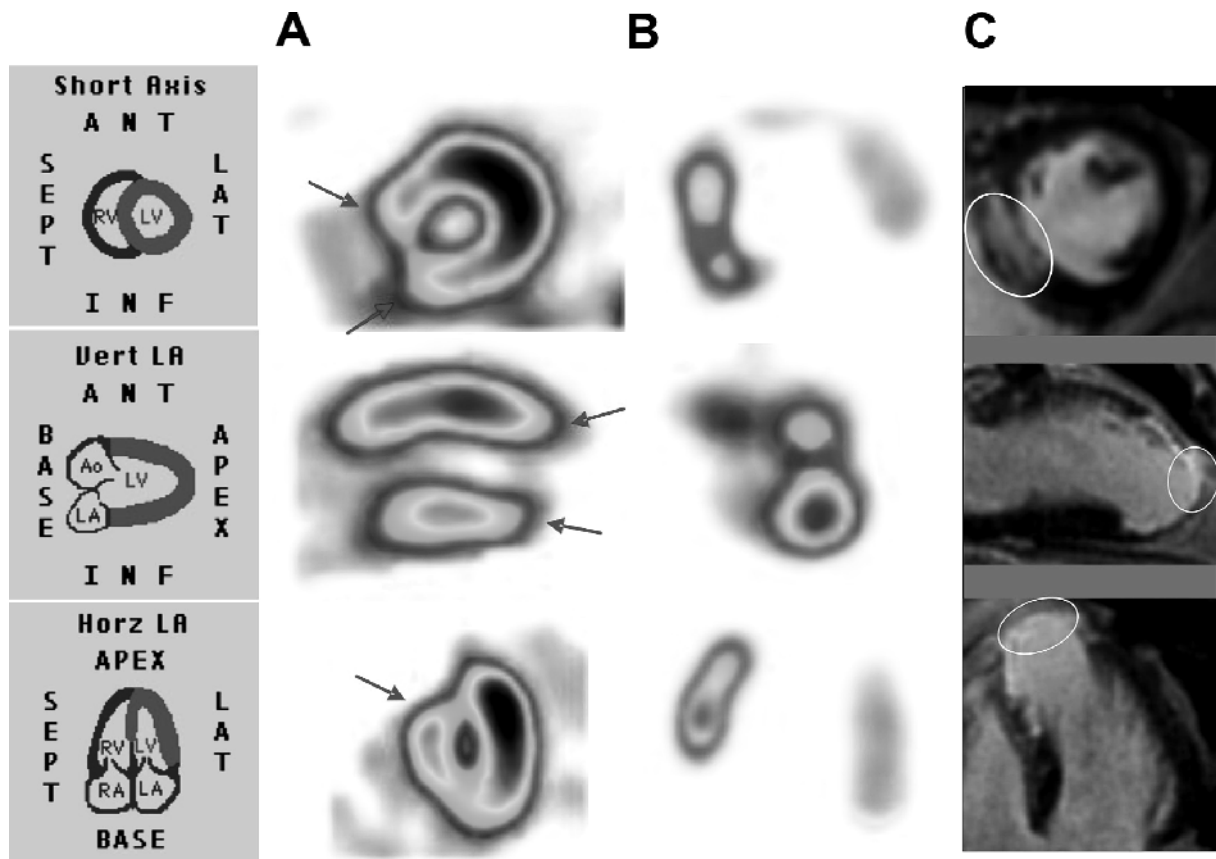
Badanie SPECT mięśnia serca (Rycina 1B) wykazało retencję implantowanych komórek w segmentach odpowiadających uwidocznionym wcześniej obszarom hipoperfuzji (Rycina 1A).

Obserwacja odległa

W kontroli 3- i 6-miesięcznej chory był bez dolegliwości stenokardialnych, w I/II klasie czynnościowej wg NYHA. Wykonany w 6. mies. submaksymalny test wysiłkowy (7,2 METs) był ujemny klinicznie i elektrokardiograficznie. Badanie MRI uwidoczniało zmniejszenie objętości LV (objętość końcoworozkurczowa 98 ml, objętość końcowoskurczowa 42 ml) i zwiększenie LVEF do 57%. Objętość obszaru późnego wzmocnienia wynosiła 12 ml (10% objętości mięśnia LV).

Dyskusja

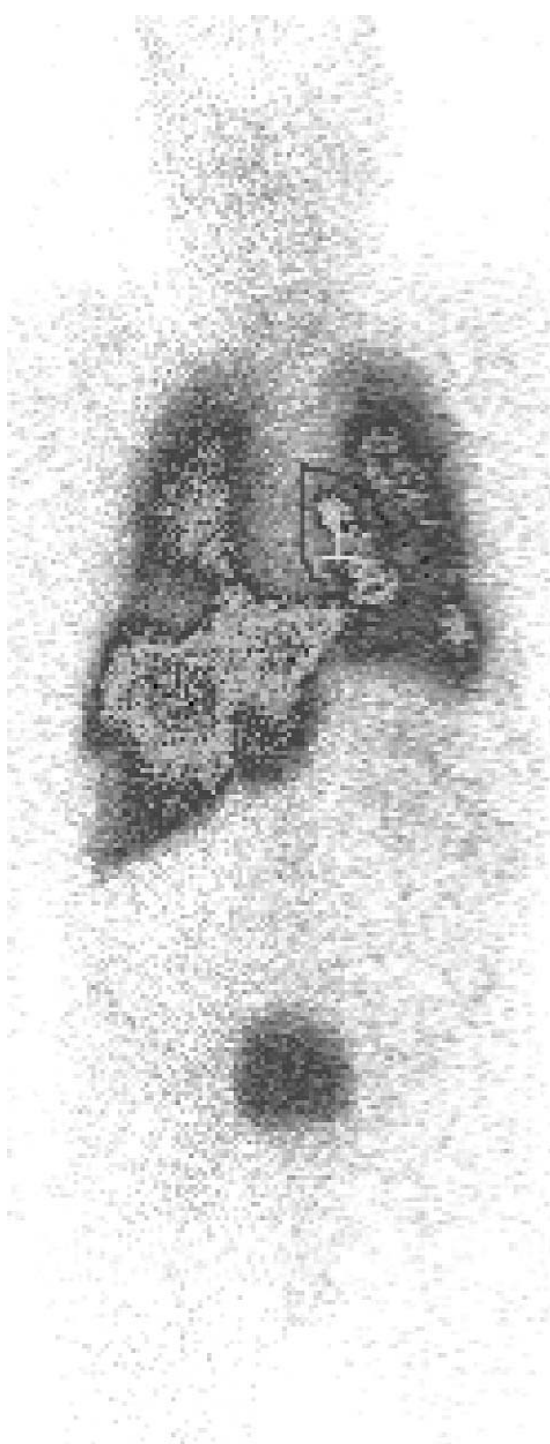
Niniejszy opis jest w dostępnym piśmiennictwie pierwszą w ocenie radioizotopowej SPECT demonstracją retencji komórek CD34⁺ **preferencyjnie** w strefie granicznej uszkodzenia zawałowego mięśnia sercowego człowieka. Wczesniejsze doniesienia oparte na eksperymentalnym modelu zawału serca u myszy postulowały rozproszone zadomowienie komórek w całym miokardium (tak w strefie uszko-



Rycina 1. Wizualizacja strefy wczesnego zasiedlenia komórek CD34⁺ w sercu w odniesieniu do lokalizacji obszaru „nieodwracalnego” uszkodzenia i strefy granicznej uszkodzenia. **A.** Scyntygrafia perfuzyjna mięśnia serca (^{99m}Tc-MIBI) w 7. dobie po przebytych zawale ściany przedniej. Widoczny jest obszar braku perfuzji w koniuszku i przegrodzie międzykomorowej oraz obszar hipoperfuzji w przylegających segmentach (czerwone strzałki, strefa graniczna uszkodzenia zawałowego). Skala barw odpowiada rejestrowanej aktywności znacznika – aktywność maksymalna w kolorze czarnym, przez czerwony, zielony, niebieski do białego (brak aktywności). **B.** Rejestracja aktywności znacznika umieszczonego w komórkach CD34⁺ w sercu (SPECT, 9. doba zawału) 60 min po ich podaniu *via* tętnica dożawałowa. Zwraca uwagę preferencyjna retencja komórek w strefie granicznej uszkodzenia zawałowego (w scyntygrafii perfuzyjnej strefy hipoperfuzji – por. Rycina 1A; w kardiologicznym rezonansie magnetycznym strefy graniczne w stosunku do obszaru późnego wzmocnienia kontrastowego – por. Rycina 1C). **C.** Kardiologiczny rezonans magnetyczny z kontrastem (gadolinum-DPTA) wykonany przed podaniem komórek macierzystych. Białą obwódką zaznaczono strefy „nieodwracalnego” uszkodzenia zawałowego (pełnościennej obszar późnego wzmocnienia kontrastowego)

dzenia zawałowego, jak i w strefie nieuszkodzonej) [8]. Niedawne badania, w których los znakowanych komórek progenitorowych śledzono przy zastosowaniu SPECT w modelu dużego zwierzęcia (świni) [9] i u człowieka [10, 11] ograniczały się do oceny, jaki odsetek podanych przezwieńcowo komórek ulega wczesnemu zadomowieniu w sercu w stosunku do innych narządów (m.in. wątroby, śledziony, płuc). Określenie, że retencja komórek (Rycina 1B) ma miejsce preferencyjne w strefie granicznej uszkodzenia zawałowego (a więc w strefie hipoperfuzji otaczającej obszar całkowitego braku perfuzji, Rycina 1A) ma istotne implikacje teoretyczne i praktyczne. W szczególności, jeżeli obserwacje te zostaną potwierdzone

w większej grupie chorych, może to oznaczać, iż strefa późnego wzmocnienia w MRI i obszar całkowitego braku perfuzji w SPECT może pozostawać niedostępny dla komórek podawanych dowieńcowo. Na preferencyjną retencję podanych przezwieńcowo komórek progenitorowych w strefie granicznej zawału wskazują także pilotażowe wyniki obrazowania przy zastosowaniu pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) [12, 13]. Może to tłumaczyć niską *a priori* skuteczność terapii komórkami macierzystymi, a nawet jej całkowity brak u chorych z bardzo rozległym zawałem transmuralnym (*vide* np. [14]) i wskazuje na konieczność opracowywania dla takich chorych alternatywnych metod transplantacji komórek (np. iniekcje trans-



Rycina 2. Badanie scyntygraficzne całego ciała (*whole body SPECT*) 60 min po podaniu dowieńcowo (*via* naczynie dozawowe) autologicznych komórek CD34⁺ znakowanych ^{99m}Tc-HMPAO. Obraz przedstawia dystrybucję implantowanych komórek w narządach. Oprócz retencji w mięśniu sercowym (obrys czerwoną linią, 3,42% całkowitej aktywności znacznika) zwraca uwagę duża aktywność izotopu – świadcząca o obecności komórek CD34⁺ – w wątrobie, śledzionie i płucach

endokardialne przy wykorzystaniu systemu mapowania elektromechanicznego, NOGA).

Odsetek komórek CD34⁺ (3,42%), które uległy retencji w sercu 60 min po ich podaniu do tętnicy dozawowej *via* cewnik balonowy *over-the-wire* w prezentowanym przypadku, jest zbliżony do wyników pilotażowego badania grupy prof. Kurpisza i prof. Siminiaka, w którym komórki CD34⁺ znakowano indem (¹¹¹In, n=3, retencja 2,4–11,0%) [11]. Podobny odsetek wczesnego zadomowienia obserwowano po podaniu nieselekcjonowanych monojądrzastych komórek szpikowych: znakowanych ¹¹¹In w modelu zawalu serca u świni (n=5, retencja 2,6±0,3%) [9] oraz znakowanych ^{99m}Tc-HMPAO u człowieka (n=1, retencja 5%, n=5, retencja 1,3–5,1%) [10, 15]. Pilotażowe doniesienie, w którym do oceny zasiedlenia komórek szpikowych zastosowano PET (znacznik [¹⁸F]-FDG), sugerowało znacząco większą retencję w sercu wyselekcjonowanych komórek CD34⁺ w stosunku do nieselekcjonowanych szpikowych komórek monojądrzastych (14–39%, n=3 vs 1,3–5,3%, n=6) [12]. Obserwacja ta nie została jednak potwierdzona w badaniu, w którym [¹⁸F]-FDG PET zastosowano do systematycznej oceny wczesnego zasiedlenia przez komórki CD34⁺ strefy uszkodzenia zawałowego w większej grupie chorych (retencja 4–7%, średnio 5,5%) [13].

Podczas gdy niedawne doniesienia kwestionują plastyczność komórek macierzystych szpiku i jednoznaczność wyników badań eksperymentalnych demonstrujących różnicowanie komórek macierzystych w kardiomiocyty czy komórki naczyń mikrokrążenia, coraz częściej podnoszona jest terapeutyczna rola słabo zdefiniowanego efektu parakrynnego [16, 17]. Nie ma jednak wątpliwości, że wykazanie retencji komórek w strefie uszkodzenia jest warunkiem *sine qua non* dla każdego efektu, który miałyby one wywoływać. Plastyczność komórek szpikowych [18] nie jest zaś konieczna dla ich skuteczności w regeneracji strefy uszkodzenia, ponieważ w puli komórek szpikowych zidentyfikowano komórki specyficzne tkankowo [19, 20]. Wykazano ponadto, że posiadające receptor CXCR4 szpikowe komórki progenitorowe CD34⁺ migrują w gradiencie czynnika SDF-1 podlegającego ekspresji w strefie uszkodzenia zawałowego [7, 19, 20].

Odległa żywotność komórek progenitorowych, które zatrzymują się w strefie granicznej uszkodzenia zawałowego w wyniku przewieńcовой transplantacji (Rycina 1B), oraz ich potencjalne różnicowanie i integracja czynnościowa wymagają określenia w dalszych badaniach. Podstawowym ograniczeniem metod izotopowych i PET jest krótki czas obserwacji, limitowany czasem połowicznego rozpadu znacznika i/lub jego metabolizmem [21, 22]. Z drugiej jednak strony, stosowanie izotopów promieniotwórczych o dłuższym czasie półtrwania wiązałoby się z istotnym ryzykiem uszkodzenia komórek terapeutycznych wskutek promieniowania izotopu [2, 21, 22].

Kardiologiczny MRI jest metodą z wyboru oceny dynamiki zmiany wymiarów jam serca oraz żywotności mięśnia i funkcji LV [2, 3]. Niemniej przydatność MRI do monitoro-

wania zasiedlania komórek macierzystych jest kontrowersyjna. Wynika to z niskiej czułości stosowanych obecnie znaczników (SPIO) oraz występowania fałszywie dodatnich wyników związanych z gromadzeniem się ferrytyny w strefie uszkodzenia zawałowego [2, 3, 21].

W fazie eksperymentów zwierzęcych jest transfer do komórek progenitorowych genów reporterowych (kodujących, na przykład, zielone białko fosforyzujące) [2, 21, 22]; technika ta pozwoli najprawdopodobniej w niedalekiej przyszłości na śledzenie (w modelach zwierzęcych) ewentualnych podziałów i różnicowania komórek. Równolegle, kluczową rolę w dalszym rozwoju terapii regeneracyjnej serca będzie odgrywało opracowywanie i wdrażanie strategii optymalizujących przezwieńcową transplantację komórek macierzystych – tak aby zwiększyć (obecnie daleko niezadowolający) odsetek ich zdomowienia w strefie uszkodzenia zawałowego [4, 23].

W podsumowaniu należy stwierdzić, iż u przedstawionego chorego autologiczne komórki CD34⁺ podane *via* tętnica dozawałowa przez cewnik balonowy typu *over-the-wire* zlokalizowały się preferencyjnie w strefie granicznej wczesnego uszkodzenia zawałowego. Badanie radioizotopowe SPECT pozwoliło na określenie z wysoką rozdzielczością przestrzenną wczesnej retencji znakowanych izotopem (^{99m}Tc-HMPAO) komórek CD34⁺ w sercu i innych narządach oraz określenie odsetka komórek podlegających retencji w sercu. Kardiologiczny MRI umożliwił nieinwazyjne śledzenie dynamiki zmian w strefie uszkodzenia zawałowego.

Piśmiennictwo

- Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167: 989-97.
- Chang GY, Xie X, Wu JC. Overview of stem cells and imaging modalities for cardiovascular diseases. *J Nucl Cardiol* 2006; 13: 554-69.
- Beeres SL, Bengel FM, Bartunek J, et al. Role of imaging in cardiac stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1137-48.
- Musiak P, Tracz W, Skotnicki AB, et al. Transcoronary stem cell delivery using physiological endothelium-targeting perfusion technique: the rationale and a pilot study involving a comparison with conventional over-the-wire balloon coronary occlusions in patients after recent myocardial infarction. *Kardiologia Pol* 2006; 64: 489-98.
- Kostkiewicz M, Olszowska M, Przewłocki T, et al. Prognostic value of nitrate enhanced Tc99m MIBI SPECT study in detecting viable myocardium in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiovasc Imaging* 2003; 19: 129-35.
- Siminiak T, Gryglewska B, Jerzykowska O, et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation in acute myocardial infarction: a report of two cases. *Kardiologia Pol* 2003; 59: 506-9.
- Wojakowski W, Tendera M, Zebzda A, et al. Mobilization of CD34 (+), CD117 (+), CXCR4 (+), c-met (+) stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27: 283-9.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-8.
- Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 2005; 112 (9 Suppl): I150-6.
- Mesquita CT, Correa PL, Felix RC, et al. Autologous bone marrow mononuclear cells labeled with Tc-99m hexamethylpropylene amine oxime scintigraphy after intracoronary stem cell therapy in acute myocardial infarction. *J Nucl Cardiol* 2005; 12: 610-2.
- Kurpisz M, Czepczyński R, Grygielska B, et al. Bone marrow stem cell imaging after intracoronary administration. *Int J Cardiol* 2007; 121: 194-5.
- Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; 111: 2198-202.
- Blocklet D, Toungouz M, Berkenboom G, et al. Myocardial homing of nonmobilized peripheral-blood CD34+ cells after intracoronary injection. *Stem Cells* 2006; 24: 333-6.
- Kueth F, Richartz BM, Sayer HG, et al. Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions. *Int J Cardiol* 2004; 97: 123-7.
- Widimsky P, Penicka M, Lang O, et al. Intracoronary transplantation of bone marrow stem cells: background, techniques, and limitations. *Eur Heart J Suppl* 2006; 8 (suppl H): H16-H22.
- Gnecchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006; 20: 661-9.
- Feygin J, Mansoor A, Eckman P, et al. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H1772-80.
- Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, et al. Some like it plastic. *Circ Res* 2004; 94: 132-4.
- Kucia M, Dawn B, Hunt G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95: 1191-9.
- Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cell biology – a never ending quest for understanding. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 353-8.
- Bengel FM, Schachinger V, Dimmeler S. Cell-based therapies and imaging in cardiology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32: S404-16.
- Chun HJ, Wilson KO, Huang M, et al. Integration of genomics, proteomics, and imaging for cardiac stem cell therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34: S20-6.
- Siminiak T, Grajek S. Przeszczepianie komórek w regeneracji serca. Obecny stan wiedzy i polskie doświadczenia kliniczne. *Kardiologia po Dyplomie* 2007; 6: 13-21.