

На правах рукописи

Ким Ирина Иннокентьевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ  
СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПРИ  
ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМН (г. Новосибирск) и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

**Научные руководители:** доктор медицинских наук, академик РАМН  
Коненков Владимир Иосифович  
доктор медицинских наук,  
Повещенко Александр Федорович

**Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук, профессор  
**Трунов Александр Николаевич**

(Научный центр клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск, руководитель лаборатории иммунологии репродукции)

доктор медицинских наук, профессор  
**Зубахин Александр Анатольевич**

(Новосибирский государственный медицинский университет, профессор кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета)

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (г. Томск)

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2012 г. в « \_\_\_\_ » часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2012 года

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Волков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Клеточная биология и биология стволовых/прогениторных клеток считается базисом регенеративной медицины. Клеточная терапия как составная часть клеточной технологии применяется при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [Кочегура Т.Н., 2010; Плотников У.Ю., 2009; Ярыгин К.Н., 2008]. Несмотря на имеющиеся достижения современной фармакотерапии хронической сердечной недостаточности, ежегодно в Российской Федерации от нее умирает до 986000 человек [Беленков Ю.Н., 2006, 2008]. Как правило, это больные, для которых трансплантация сердца остается единственным методом лечения [Беленков Ю. Н., 2008; Кочегура Т. Н., 2010]. Получение стволовых/прогениторных клеток мобилизацией их из костного мозга введением ростовых факторов, в том числе гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, является альтернативой аспирации клеток костного мозга из крестцовой кости [Беленков Ю.Н., 2003; Козлов В.А., 2004; Кочегура Т.Н., 2010]. Показано, что введение мобилизованных Г-КСФ стволовых/прогениторных клеток мышам с индуцированным инфарктом миокарда сопровождается уменьшением зоны инфаркта [Kastrup J., 2006]. Недостатком экспериментальных работ на лабораторных животных является отсутствие моделирования динамического развития процессов происходящих при ИБС у человека. Имеющиеся в литературе сообщения о применении у пациентов с патологией сердечно-сосудистой системы Г-КСФ не в полной мере дают представления об эффективности, что диктует необходимость исследования сочетания мобилизации аутологичных стволовых клеток из костного мозга с их последующим локальным/интрамиокардиальным введением [Смолянинов А. Б., 2007; Kastrup J., 2006]. Кроме этого, недостаточно сведений о фенотипе мобилизованных стволовых клеток и их пролиферативном потенциале, а также их функциональной активности, в частности цитокинпродуцирующей способности, у пациентов с ХСН и взаимосвязи вышеуказанных параметров стволовых/прогениторных клеток с клинической эффективностью.

**Цель исследования.** Изучить морфофункциональные свойства прогениторных клеток периферической крови, мобилизованных введением Г-КСФ пациентам с ХСН, и исследовать клиническую эффективность их применения при интрамиокардиальной трансплантации.

#### **Задачи исследования**

1. Исследовать морфологические/фенотипические свойства мононуклеарных клеток периферической крови у больных с ХСН в ходе мобилизации Г-КСФ.

2. Определить функциональные свойства мононуклеарных клеток периферической крови у больных с ХСН в ходе мобилизации Г-КСФ по их пролиферативной и секреторной активности.

3. Оценить взаимосвязь параметров морфофункциональных свойств стволовых/прогениторных клеток с показателями клинической эффективности интрамиокардиального введения мононуклеаров.

4. Разработать критерии прогнозирования клинической эффективности интрамиокардиальной трансплантации стволовых/прогениторных клеток на основе их морфофункциональных параметров.

**Научная новизна работы.** Впервые исследован фенотип и функциональная активность стволовых/прогениторных клеток, мобилизованных введением Г-КСФ у пациентов с тяжелой формой ХСН. Показано, что при мобилизации Г-КСФ клеток из костного мозга происходит увеличение количества различных популяций эндотелиальных прогениторных клеток.

Впервые показана высокая пролиферативная активность мобилизованных Г-КСФ МНК в сочетании с продукцией ими широкого спектра цитокинов как с провоспалительным, так и с противовоспалительным потенциалом действия, иммунорегуляторными и ангиогенными свойствами.

Впервые установлено, что интрамиокардиальное введение мобилизованных Г-КСФ МНК пациентам с ХСН является клинически эффективным способом лечения, при котором отмечено возрастание

толерантности к физической нагрузке, снижение функционального класса сердечной недостаточности и стенокардии напряжения, увеличение ФВЛЖ, а также улучшение перфузии миокарда – данные изменения сохраняются на протяжении 12 месяцев.

**Научно-практическая значимость работы.** Полученные в ходе исследования мобилизации стволовых клеток Г-КСФ из костного мозга пациентов с ХСН научные данные расширяют представления о фенотипических и функциональных свойствах прогениторных клеток, используемых для терапии сердечной недостаточности. Разработаны и применяются в практике Новосибирского научно-исследовательского института патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина критерии прогнозирования клинической эффективности интрамиокардиальной трансплантации МНК мобилизованных Г-КСФ на основе их морфофункциональных параметров. Указанные критерии позволяют реализовать индивидуализированный подход в терапии социально значимой патологии не только в Новосибирском научно-исследовательском институте патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, но могут быть рекомендованы для внедрения в практику работы специализированных высокотехнологичных центров, специализирующихся на лечении пациентов с патологией ССС.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Введение Г-КСФ приводит к мобилизации из костного мозга пациентов с хронической сердечной недостаточностью не только гемопоэтических клеток с фенотипом CD34+, но и эндотелиальных прогениторных клеток с фенотипом CD34+/CD133+ и CD34+/KDR (VEGFR<sub>2</sub>).

2. Мононуклеарные клетки периферической крови, полученные в ходе мобилизации из костного мозга введением Г-КСФ, обладают высоким пролиферативным потенциалом и секретируют проангиогенные ростовые факторы (ИЛ-1 $\beta$ , ЭПО, ГМ-КСФ, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6).

3. Интрамиокардиальная трансплантация мононуклеарных клеток крови, мобилизованных Г-КСФ из костного мозга, пациентам с хронической сердечной

недостаточностью приводит к улучшению функции сердца.

**Апробация материалов диссертации.** Материалы диссертации были представлены на иммунологическом форуме (Санкт-Петербург, 2008), на международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2008), на конференции «Актуальные вопросы клинической лимфологии» (Ташкент, 2009), на конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» (Москва, 2009), на IV симпозиуме «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Санкт-Петербург, 2010), на конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2010), на конференции, посвященной 20-летию Кузбасского кардиологического центра «Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии» (Кемерово, 2010), на X Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии» (Новосибирск, 2011), на IV Съезде лимфологов России (Москва, 2011), на VII научных чтениях, посвященных памяти академика РАМН Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, 2011), на IV Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2011).

**Внедрение.** Результаты диссертационной работы используются в лечении пациентов с хронической сердечной недостаточностью в Новосибирском научно-исследовательском институте патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, а также внедрены в учебный процесс кафедры анатомии, физиологии и безопасности жизнедеятельности Новосибирского государственного педагогического университета.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 19 работ, основные результаты представлены в 11, из них 5 – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России для публикаций основных результатов исследования кандидатских и докторских диссертаций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из следующих глав: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований,

обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, включающего 10 таблиц и 19 рисунков. Список литературы содержит 230 литературных источников, из них 177 зарубежных.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование проведено у 72 пациентов с ИБС, ФК ХСН (NYHA) III-IV, давших информированное согласие, согласно протоколам, утвержденным этическими комитетами и учеными советами Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМН (г. Новосибирск) и Новосибирского научно-исследовательского института патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина. Рекомбинантный человеческий Г-КСФ (Грасальва, Израиль) вводился подкожно в дозе 3,3-5,0 мкг/кг/сутки общим количеством 5 инъекций, на 6-е сутки пациентам проводилась процедура аппаратного цитафереза на сепараторе клеток крови (Haemonetics MCS+, США).

МНК из сепарированной крови выделяли на градиенте плотности фиколла/верографина ( $\rho = 1,078$  г/л). Фенотип МНК (CD3, CD4, CD8, CD14, CD19) (Сорбент, Россия) и CD34, CD45 CD133, KDR (Becton Dickinson, США) исследовали на проточном цитометре FACSCantoII (Becton Dickinson, США). В популяции CD34<sup>+</sup> клеток исследовали клеточный цикл методом двуцветной проточной цитофлюориметрии с помощью окрашивания клеток пропидиумом иодида (Becton Dickinson, США) согласно инструкции.

Пролиферативный потенциал МНК ( $2 \times 10^5$  клеток/ лунку) исследовали в спонтанном, митоген-стимулированном (КонА 5 мкг/мл и ЛПС 10 мкг/мл (США) тестах, и в присутствии: 50 Ед/мл Г-КСФ (Грасальва, Израиль) или 100 Ед/мл ИЛ-2 (Ронколейкин, Россия) спектрофотометрически по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ).

Определение концентрации цитокинов в супернатантах от 48 часовых культур МНК проводили методом проточной флюориметрии Bio-Plex™ 200 System (BioRad, США) и методом ИФА (Вектор-Бест, Россия).

Пациентам интрамиокардиально под контролем навигационной системы NOGA XR в 10 точках вводили клетки ( $1,5 \times 10^8$ /мл в объеме 0,2 мл/точка). Эффективность лечения оценивали через 6 и 12 месяцев по объему ФВЛЖ с помощью ЭХО-КГ и по изменению перфузии миокарда по данным ЭКГ-синхронизированной томосцинтиграфии (SPECT) с технецием (Tc-99m) в покое и при нагрузке, индуцированной введением аденозина, по толерантности к физической нагрузке по тесту 6 минутной ходьбы, по изменению ФК СН.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6,0 for Windows (StatSoft, США). Полученные данные проверяли на нормальность распределения согласно критериям Колмогорова-Смирнова, меры центральной тенденции и рассеяния описаны в случае нормального распределения признаков средним их значением (M) и средним квадратичным отклонением ( $\pm\sigma$ ), а параметры, не имеющие нормального распределения – медианой (Me), нижним (LQ) и верхним (HQ) квартилями. Достоверность различий оценивали по критериям Манна-Уитни (в независимых группах) и Вилкоксона (в зависимых группах). Наличие связей между явлениями устанавливали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Гемостимулирующая активность Г-КСФ.** Введение Г-КСФ пациентам с ХСН приводило к увеличению количества лейкоцитов в периферической крови в 4,9 раз с  $6,39 \pm 1,2 \times 10^9$ /л до  $31,25 \pm 6,0 \times 10^9$ /л к 6 суткам, в основном за счет нейтрофилов, что подтверждается наличием высокой прямой зависимости ( $R = 0,987$ ;  $p = 0,004$ ). Каких-либо статистически значимых различий в количестве популяции CD3+ Т-лимфоцитов и субпопуляций Т-клеток (CD4, CD8), В-лимфоцитов (CD19), CD14+ - клеток (моноцитов) на фоне мобилизации МНК Г-КСФ не выявлено.

**Эффект мобилизации МНК Г-КСФ у больных с ХСН на выход СК в периферическое русло.** Необходимо отметить, что у больных с ХСН до проведения мобилизации МНК Г-КСФ количество CD34+ клеток составляло



0,01 % (0,01 % – 0,067 %). На 6-е сутки после завершения курса мобилизации МНК Г-КСФ в периферической крови количество клеток, экспрессирующих CD34+ маркер, возросло в  $20,7 \pm 16,8$  раз и составило 0,42 % (0,25 % – 50,64 %), что зависело от исходного уровня содержания данного фенотипа клеток в периферической крови ( $p_u = 0,0001$ ). Также на 6-е сутки после мобилизации Г-КСФ в периферической крови пациентов с ХСН было выявлено статистически значимое возрастание количества CD34+/CD133+ клеток ( $p_u = 0,01$ ) (ранние ЭПК), достигавшее 0,02 % (0,01 % – 0,075 %), с учетом их минимального содержания (0,001 %) в крови данных пациентов до курса мобилизации Г-КСФ. У больных с ХСН после завершения курса мобилизации Г-КСФ в периферической крови отмечена также тенденция к увеличению пула клеток с фенотипом CD34+/KDR+ - до 0,1% (0,05 % – 0,2 %) (поздние ЭПК), которые практически не выявлялись в крови этих больных до проведения процедуры мобилизации ( $p_u = 0,108$ ).

Исходя из выше изложенного, становится очевидным, что в ходе мобилизации Г-КСФ из КМ у больных с ХСН происходит не только увеличение пула лейкоцитов, но и прогениторных клеток как гемопоэтических, так и различных популяций эндотелиальных.

**Содержание CD 34+ клеток в периферической крови после мобилизации Г-КСФ в зависимости от возраста и длительности заболевания ХСН у пациентов.** Пациенты, подвергшиеся процедуре мобилизации Г-КСФ, характеризовались наличием прогрессирующей сердечной недостаточности, имели длительный ишемический анамнез. Выявлено наличие обратной средней силы связи количества CD34+ клеток на 6-е сутки с количеством ИМ в анамнезе ( $R = -0,467$ ,  $p = 0,045$ ). Не было установлено каких-либо статистически значимых корреляционных связей количества клеток с возрастом и длительностью заболевания как до, так и после курса мобилизации Г-КСФ. В то же время в подгруппе пациентов младше 50 лет отмечено увеличение количества CD34+ клеток в периферической крови как до, так и после курса мобилизации Г-КСФ. Аналогичная картина выявлена в

подгруппе пациентов с ХСН, имевших в анамнезе 1 эпизод ИМ, а именно, увеличение количества CD34+ клеток в периферической крови как до, так и после курса мобилизации Г-КСФ. Необходимо также сказать о том факте, что чем больше времени прошло от последнего эпизода ИМ, тем больше количество CD34+ клеток в периферической крови после мобилизации Г-КСФ ( $p = 0,001$ ), что также подтверждается наличием высокой прямой зависимости между количеством клеток с фенотипом CD34+, выделенных на 6-е сутки после курса мобилизации Г-КСФ, и временем, превышающим 10 лет от последнего эпизода ИМ ( $R = 0,77$ ;  $p = 0,015$ ).

Таким образом, на количество выхода в периферическую кровь клеток с фенотипом CD34+ после завершения курса мобилизации Г-КСФ (эффективность мобилизации) оказывает влияние возраст старше 50 лет, количество эпизодов ИМ и длительность заболевания ХСН.

**Исследование функциональной активности МНК периферической крови после курса мобилизации Г-КСФ.** На 6-е сутки после мобилизации Г-КСФ отмечено статистически значимое увеличение пролиферативного потенциала МНК как в спонтанном, так и стимулированном тестах ( $p < 0,05$ ). При стимуляции КонаА было отмечено увеличение пролиферации клеток в  $1,53 \pm 0,64$ , нейпогеном – в  $1,31 \pm 0,58$  и ронколейкином – в  $1,46 \pm 0,65$  раз.

Следует указать на то, что в группе пациентов с ХСН, имевших после мобилизации Г-КСФ в периферической крови количество клеток с фенотипом CD34+ свыше 0,4 % отмечено увеличение пролиферативной активности МНК по сравнению с группой пациентов с количеством CD34+ меньше 0,4 %.

Анализ клеточного цикла клеток с фенотипом CD34+ показал, что на 6-е сутки после завершения курса мобилизации Г-КСФ количество клеток, находящихся в фазе SM/G2, было равным  $11,23 \% \pm 5,72 \%$ , а в фазе клеточного цикла G0/G1 –  $86,65 \% \pm 5,89\%$ . Не смотря на то, что большинство клеток с фенотипом CD34+ находятся в стадии покоя, высок процент клеток, находящихся в синтетическо-митотической фазе.

Известно, что для стимуляции процессов регенерации/пролиферации

поврежденных тканей и органов требуется влияние биологически активных веществ, в том числе и цитокинов, и ростовых факторов, продуцируемых стволовыми/прогениторными клетками.

Было показано, что у пациентов с ХСН после курса мобилизации Г-КСФ преобладал противовоспалительный спектр продукции МНК цитокинов (ФНО- $\alpha$ /ИЛ-10 = 0,51 и ИФН- $\gamma$ /ИЛ-10 = 0,38). Кроме этого, было показано, что на 6-е сутки после мобилизации Г-КСФ МНК продуцируют в значительном количестве ИЛ-1  $\beta$  (415,9 пг/мл), ФНО- $\alpha$  (27,5 пг/мл), ИЛ-6 (15938,4 пг/мл), ГМ-КСФ (8,61 пг/мл) и ЭПО (18,1 мМЕ/мл), обладающие проангиогенными свойствами.

Следовательно, МНК периферической крови пациентов с ХСН после курса мобилизации Г-КСФ имеют сохраненный пролиферативный потенциал и достаточный уровень цитокинпродуцирующей функции с тенденцией к продукции противовоспалительных цитокинов, что имеет значение для ограничения силы воспалительного ответа в месте ишемизации миокарда при интрамиокардиальном введении клеточного трансплантата.

Клиническая эффективность интрамиокардиального введения МНК при мобилизации Г-КСФ больных ХСН. Эффективность интрамиокардиального введения МНК после курса мобилизации Г-КСФ у пациентов с ХСН была исследована через 6 и 12 месяцев. Установлено статистически значимое улучшение показателя теста 6-минутной ходьбы, выразившегося в увеличении проходимой за этот промежуток времени дистанции на 54 % спустя 6 месяцев и на 56 % спустя 12 месяцев в сравнении с исходным показателем ( $p < 0,01$ ). Отмечено статистически значимое изменение ФК ХСН, оцениваемой по NYHA с III до II класса ( $2,94 \pm 0,11$  и  $2,00 \pm 0,56$ ; соответственно,  $p < 0,01$ ) через 6 месяцев после введения клеток и ее стойкая сохранность через 12 месяцев ( $2,00 \pm 0,33$ ;  $p < 0,01$ ). Показано, что через 6 месяцев у пациентов происходит статистически значимое снижение ФК стенокардии напряжения с  $3,01 \pm 0,17$  до  $1,84 \pm 0,32$  ( $p < 0,01$ ), а также до  $1,69 \pm 0,43$  ( $p < 0,01$ ) через 12 месяцев наблюдения. Установлено статистически значимое увеличение ФВЛЖ на 4 %

через 6 месяцев после проведения данной процедуры (с  $42,59 \pm 13,84$  до  $46,02 \pm 12,84$ ;  $p < 0,01$ ) и на 5 % через 12 месяцев ( $46,44 \pm 12,06$ ;  $p < 0,01$ ) по сравнению с исходными данными.

Анализ данных сцинтиграфии миокарда у пациентов, получивших лечение интрамиокардиальным введением МНК, мобилизованных Г-КСФ как в покое, так и при нагрузке аденозином, выявил статистически значимое снижение зоны гипоперфузии миокарда через 6 месяцев после проведения данной процедуры с  $20,31 \pm 10,13$  до  $16,83 \pm 9,27$  и с  $24,07 \pm 10,28$  до  $19,42 \pm 8,99$  баллов, соответственно ( $p < 0,01$ ). В тоже время спустя 12 месяцев после проведенной процедуры отмечено увеличение зоны гипоперфузии в миокарде пациентов, получивших лечение интрамиокардиальным введением МНК, мобилизованных Г-КСФ, но они не достигали первоначальных значений.

Таким образом, терапия интрамиокардиальным введением МНК, мобилизованных Г-КСФ, у пациентов с ХСН приводила к улучшению клинических показателей, в частности, улучшению толерантности к физической нагрузке, оцениваемой по тесту 6-минутной ходьбы, снижению показателей ФК ХСН и стенокардии напряжения, а также возрастанию ФВЛЖ и уменьшению зоны гипоперфузии миокарда как в покое, так и при нагрузке аденозином.

**Изучение взаимосвязей морфофункциональных свойств аутологичных МНК мобилизованных Г-КСФ с параметрами клинической эффективности интрамиокардиального введения.** Показана прямая сильная связь между количеством клеток с фенотипом CD34+ в периферической крови после мобилизации Г-КСФ и зоной гипоперфузии миокарда спустя 6 месяцев после интрамиокардиального введения аутологичных СК в состоянии покоя у пациентов спустя 12 месяцев после процедуры клеточной трансплантации ( $R = 0,079$ ,  $p = 0,049$ ). Между количеством CD34+/CD133+ клеток и показателем гипоперфузии миокарда при нагрузке аденозином спустя 12 месяцев после клеточной трансплантации и ФВЛЖ выявлена прямая сильная взаимосвязь ( $R = 0,67$ ,  $p = 0,018$ ). Выявлены некоторые взаимосвязи между уровнями проангиогенных цитокинов с клинической эффективностью

интрамиокардиального введения МНК: между показателями гипоперфузии в покое и ФВЛЖ на 6 месяц после введения с уровнем ИЛ-10 ( $R = 0,71$ ;  $p = 0,015$  и  $R = 0,64$ ;  $p = 0,020$ ; соответственно); между ФВЛЖ на 6 месяц и уровнями ФНО- $\alpha$  и ГМ-КСФ ( $R = -0,67$ ;  $p = 0,018$  и  $R = -0,63$ ;  $p = 0,021$ ; соответственно).

Таким образом, имеющиеся сопряженности между показателями содержания в периферической крови пула клеток с прогениторной активностью, показателями продукции цитокинов МНК мобилизованными Г-КСФ у пациентов с ХСН с параметрами клинической эффективности после интрамиокардиального введения указывают на вовлеченность вводимых клеток в процесс регенерации и возможно неоангиогенеза в зоне ишемизации.

Изучение взаимосвязи продукции МНК цитокинов с проангиогенной активностью после мобилизации Г-КСФ и клинической эффективности клеточной терапии показало, что у пациентов с положительными результатами перфузии МНК при культивировании продуцируют в более высоких концентрациях ЭПО (МЕ/мл), ГМ-КСФ (пг/мл), ФНО- $\alpha$  (пг/мл) ( $17,6 \pm 1,7$ ;  $46,2 \pm 16$  и  $1343 \pm 857$ ; соответственно), чем у пациентов с ухудшением перфузии ( $15,8 \pm 1,8$ ,  $10,3 \pm 2,5$  и  $560 \pm 60$ , соответственно).

Следовательно, клиническая эффективность интрамиокардиального введения аутологичных МНК, полученных мобилизацией Г-КСФ у пациентов с ХСН, зависит от способности продуцировать проангиогенные факторы.

## **ВЫВОДЫ**

1. Мобилизация выхода прогениторных клеток из костного мозга под воздействием Г-КСФ у пациентов с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности приводит к возрастанию содержания в кровеносном русле мононуклеарных клеток с фенотипом CD34+, CD34+/CD133+ и CD34+/VEGFR2+, что свидетельствует о выходе в кровоток как гемопоэтических, так и эндотелиальных прогениторных клеток.

2. Мононуклеарные клетки крови после мобилизации из костного мозга Г-КСФ пациентов с хронической сердечной недостаточностью, входящие в состав клеточного трансплантата, проявляют высокий потенциал

пролиферативной активности. На 6-е сутки после курса мобилизации Г-КСФ, происходит увеличение пролиферативного потенциала при различных стимулах (митоген КонА, цитокины Г-КСФ и ИЛ-2) по сравнению с исходной пролиферативной активностью до курса мобилизации.

3. Мобилизованные введением Г-КСФ из костного мозга мононуклеарные клетки крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью проявляют способность к продукции широкого спектра цитокинов как провоспалительных (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-12), так и противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13), и цитокинов, обладающих проангиогенным действием (ИЛ-1 $\beta$ , ЭПО, ГМ-КСФ, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6).

4. Интрамиокардиальное введение собственных мононуклеарных клеток крови, обогащенных клетками с фенотипом CD34+, CD34+/CD133+ и CD34+/VEGFR2+, пациентам с хронической сердечной недостаточностью, приводит к увеличению толерантности к физической нагрузке, снижению класса сердечной недостаточности и, по данным эхокардиографии и ЭКГ-синхронизированной томосцинтиграфии, к увеличению фракции выброса из левого желудочка сердца и к улучшению перфузии миокарда спустя 6 и 12 месяцев после лечения.

5. Высокая концентрация клеток с фенотипом CD34+ и CD34+/CD133+ в клеточном трансплантате и повышенный уровень продукции мононуклеарными клетками крови, мобилизованными из костного мозга таких цитокинов, как ИФН- $\gamma$ , ИЛ-10, ФНО- $\alpha$  и ГМ-КСФ, могут служить прогностически благоприятными признаками высокой эффективности клеточной терапии пациентов.

6. Одним из механизмов репарации поврежденного миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью при интрамиокардиальном введении клеточного трансплантата, обогащенного предшественниками собственных гемопоэтических и эндотелиальных клеток, может являться стимуляции неоангиогенеза в миокарде.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Коненков В.И., Повещенко О.В., **Ким И.И.**, Покушалов Е.А., Романов А.Б., Гульева Н.А., Бернвальд В.В., Шевченко А.В., Голованова О.В., Янкайте Е.В., Повещенко А.Ф., Караськов А.М. Влияние G-CSF на проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью // **Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.** 2011. Т. VI, №3. С.71-75, автора – 0,06 п.л.

2. Коненков В.И., Покушалов Е.А., Повещенко О.В., **Ким И.И.**, Романов А.Б., Гульева Н.А., Бернвальд В.В., Соловьева А.О., Янкайте Е.В., Повещенко А.Ф., Караськов А.М. Характеристика фенотипа мобилизованных гранулоцитарным колониестимулирующим фактором клеток периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью // **Клеточные технологии в биологии и медицине.** 2012. № 1. С.9-14, автора – 0,06 п.л.

3. **Ким И.И.**, Повещенко О.В., Коненков В.И., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Бондаренко Н.А., Повещенко А.Ф., Сергеевичев Д.С., Караськов А.М. Эффективность мобилизации CD 34+ прогениторных клеток препаратом G-CSF в зависимости от ишемического анамнеза и возраста больных с хронической сердечной недостаточностью // **Патология кровообращения и кардиохирургия.** 2012. № 1. С.75-78, автора – 0,06 п.л.

4. Повещенко О.В., **Ким И.И.**, Бондаренко Н.А., Хабаров Д.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Повещенко А.Ф., Коненков В.И.. IL-10 и TNF- $\alpha$  после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у пациентов с ишемической болезнью сердца // **Вестник уральской медицинской академической науки.** 2012. № 4. С.148-149, автора – 0,03 п.л.

5. Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., **Ким И.И.**, Хабаров Д.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Повещенко А.Ф., Коненков В.И.. Влияние криоконсервирования на количество эндотелиальных прогениторных клеток периферической крови после мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором у пациентов с ишемической болезнью сердца // **Вестник уральской медицинской академической науки.** 2012. № 4.

С.18-19, автора – 0,03 п.л.

6. **Ким И.И.**, Повещенко О.В., Колесников А.П., Мозжерина А.Н., Ульянов Е.В., Янкайте Е.В., Гертер Т.В., Хабаров Д.В., Романов А.Б., Покушалов Е.А., Коненков В.И. Фенотипические и функциональные характеристики мононуклеарных клеток периферической крови больных ИБС при мобилизации стволовых клеток из костного мозга // Лимфология. 2009. № 1-2. С. 239-240, автора – 0,02 п.л.

7. Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., **Ким И.И.**, Янкайте Е.В., Хабаров Д.В., Смагин А.А., Комбанцев Е. А., Романов А.Б., Покушалов Е.А., Коненков В.И. Эффективность интрамиокардиальной трансплантации аутогенных стволовых у пациентов с ишемической болезнью сердца // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии : сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием. Санкт-Петербург, 2010. С.177-178, автора – 0,03 п.л.

8. Гульева Н.А., **Ким И.И.**, Повещенко О.В., Бернвальд В.В., Повещенко А.Ф., Колесников А.П., Янкайте Е.В., Хабаров Д.В., Комбанцев Е.А., Смагин А.А., Романов А.Б., Покушалов Е.А., Коненков В.И. Возможности аутологичной клеточной терапии ишемической сердечной недостаточности // Стволовые клетки и регенеративная медицина : сборник тезисов Всероссийской научной школы-конференции. Москва, 2010. С.24-25, автора – 0,02 п.л.

9. Коненков В.И., Повещенко О.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., **Ким И.И.**, Любарский М.С., Повещенко А.Ф., Гульева Н.А., Бернвальд В.В., Хабаров Д.В., Смагин А.А., Караськов А.М. Эффективность интрамиокардиального введения аутологичных прогениторных клеток периферической крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью // VII научные чтения, посвященные памяти академика РАМН Е.Н.Мешалкина : материалы научно-практической конференции с международным участием. Новосибирск, 2011. С.213-214, автора – 0,02 п.л.

10. Повещенко О.В., **Ким И.И.**, Бондаренко Н.А., Янкайте Е.В., Хабаров Д.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Сергеевичев Д.С., Повещенко



А.Ф., Коненков В.И. Проангиогенные свойства мобилизованных клеток периферической крови у пациентов с ишемической болезнью сердца // Стволовые клетки и регенеративная медицина : сборник тезисов IV Всероссийской научной школы-конференции. Москва, 2011. С.64-65, автора – 0,03 п.л.

11. Коненков В.И., Повещенко О.В., Покушалов Е.А., Романов А.Б., **Ким И.И.**, Королев М.А., Хмельницкий Г.А., Повещенко А.Ф., Хабаров Д.В., Смагин А.А., Караськов А.М. Эффективность интрамиокардиальной терапии ишемической сердечной недостаточности аутологичными мобилизованными G-CSF клетками периферической крови // Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии : материалы научно-практической конференции, посвященной 20-летию Кузбасского кардиологического центра. Кемерово, 2010. С.145-147, автора – 0,03 п.л.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Г/ГМ-КСФ	гранулоцитарный/гранулоцитарномacroфагальный-колониестимулирующий фактор
ГПК	гемопoэтические стволовые/прогениторные клетки
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИЛ	интерлейкин
ИМ	инфаркт миокарда
ИФА	иммуноферментный анализ
ИФН $\gamma$	интерферона-гамма
КМ	костный мозг
КонА	конканавалин А
КМ	костный мозг
ЛПС	липополисахарид
МНК	моноклеарные клетки крови
МТТ	тест оксидоредукции нитросинего тетразоля
СК	стволовые/прогениторные клетки
СН	сердечная недостаточность
ССС	сердечно-сосудистая система
ФК	функциональный класс
ФВЛЖ	фракции выброса левого желудочка
ФНО- $\alpha$	фактор некроза опухоли
ХСН	хронической сердечной недостаточности
ЭПК	эндотелиальные прогениторные клетки
ЭПО	эритропоэтин

CD  
NYHA

кластер дифференцировки  
Нью-Йоркская классификация класса