

## ОЦІНКА БЕЗПЕЧНОСТІ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ МОНОНУКЛЕАРНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ КРОВІ У ХВОРИХ ЗА РЕФРАКТЕРНОЇ СЕРЦЕВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

О. Ю. Усенко, Р. В. Салютін, А. В. Якушев, М. Ф. Соколов, Г. С. Лобинцева,  
М. В. Кости́лев, В. Ф. Оніщенко

Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України,  
Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України,  
Інститут клітинної терапії, м. Київ

## ESTIMATION OF SAFETY OF TRANSPLANTATION OF MONONUCLEAR STEM CELLS OF UMBILICAL BLOOD IN PATIENTS, SUFFERING CARDIAC INSUFFICIENCY

O. Yu. Usenko, R. V. Salyutin, A. V. Yakushev, M. F. Sokolov, G. S. Lobintseva,  
M. V. Kostylev, V. F. Onishchenko

Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, Kyiv  
Coordination Centre of Transplantation of Organs, Tissues and Cells MH of Ukraine, Kyiv  
Institute of Cellular Therapy, Kyiv

Провідне місце в структурі захворюваності і смертності населення сучасного світу посідають хвороби серцево—судинної системи, більшість з яких зумовлюють формування хронічної СН. В США клінічні ознаки СН виявляють більш ніж у 5,1 млн. хворих, щороку діагностують понад 650 тис нових спостережень СН [1]. Смертність від СН в розвинених країнах становить 40 — 65% впродовж 5 років після встановлення діагнозу [2]. Показники десятирічного виживання пацієнтів при СН, за даними деяких авторів, не перевищують 10%, СН з зниженою систолічною функцією лівого шлуночка (ЛШ) асоційована з значно вищим ризиком раптової серцевої смерті [3].

Методи лікування СН спрямовані в основному на усунення симптомів та механічну підтримку скоротливої функції серця і не вирішують проблему СН [4]. Єдиним радикальним методом лікування СН у термінальній стадії є трансплантація серця. Проте, постійний дефіцит донорських органів обмежує використання трансплантації серця та, відповідно, зумовлює чергу пацієнтів на листі очікування донорського органа. Це зумовлює високу смертність пацієнтів за рефрактерної СН та обгрунто-

### Реферат

Проаналізовані результати спостереження за 20 хворими з рефрактерною серцевою недостатністю (СН) ішемічної етіології, яким в комплексі з консервативною терапією здійснено трансплантацію мононуклеарних стовбурових клітин (МСК) пуповинної крові (ПК) з метою відновлення скоротливої здатності міокарда. З метою оцінки ефективності та безпеки трансплантації МСК ПК для реципієнтів до та через 1, 3, 6 і 9 міс після неї проводили обстеження хворих з використанням інструментальних, біохімічних та імунологічних методів. Вивчали проаритмогенний вплив МСК, активацію персистуючих в організмі вірусних інфекцій, активацію та прогресування атеросклеротичного ураження вінцевих артерій. Встановлено, що МСК ПК не спричиняли зазначених ускладнень, отже, їх можна вважати безпечними для реципієнтів у строки спостереження до 9 міс.

**Ключові слова:** пуповинна кров; стовбурові клітини; трансплантація; проаритмогенний вплив; активація вірусних інфекцій; прогресування атеросклерозу.

### Abstract

Results of follow—up of 20 patients, suffering refractory cardiac insufficiency of ischemic origin, to whom along with conservative therapy a mononuclear stem cells (MSC) transplantation of umbilical blood (UB) was conducted for restoration of myocardium contractile capacity, were analyzed. The patients' examination, using instrumental, biochemical and immunological methods, was conducted before and in 1, 3, 6 and 9 mo after the MSC of UB transplantation with the objective to estimate its efficacy and safety for recipients. Proarrhythmogenic impact of MSC of UB, activation and progress of atherosclerotic affection of coronary arteries, persistence of viral infections in organism were studied. There was established, that MSC of UB did not cause significant complications, so they may be considered safe for recipients in terms of follow—up to 9 mo.

**Keywords:** umbilical blood; stem cells; transplantation; proarrhythmogenic impact; activation of viral infections; progress of atherosclerosis.

вує необхідність пошуку альтернативних методів їх лікування.

Одним з перспективних напрямків, на думку авторів, є клітинна терапія [5]. Проте, не вирішені деякі питання щодо клінічного застосування стовбурових клітин (СК), зокрема, вибір їх ефективного й без-

печного типу. При трансплантації СК є певний ризик виникнення типових побічних реакцій та ускладнень, зокрема, проаритмогенного впливу [6], активації атеросклерозу [7], персистуючих вірусних інфекцій [8]. Поряд з ефективністю, відзначали безпечність нового типу СК —

МСК ПК, проте, даних щодо вірогідності виникнення типових ускладнень після їх трансплантації не достатньо.

Метою дослідження є аналіз можливості виникнення типових ускладнень після трансплантації МСК ПК у пацієнтів за рефрактерної СН. Для досягнення мети слід вирішити такі завдання: проаналізувати можливість проаритмогенного впливу МСК ПК; реактивації та акселерації атеросклеротичного процесу у вінцевих артеріях (ВА) після трансплантації МСК ПК; вплив цих клітин на зміни імунітету та можливість активації персистуючої TORCH—інфекції.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежені 20 хворих віком від 20 до 65 років, у яких діагностовано СН II А—II Б стадії, 3—4 функціонального класу (ФК за NYHA), фракція викиду (ФВ) ЛШ менше 35%. З метою відновлення скоротливої здатності міокарда їм здійснювали трансплантацію МСК ПК. Обстеження проводили до та через 1, 3, 6 і 9 міс після операції.

Трансплантацію МСК ПК виконували шляхом внутрішньовенного введення суспензії клітин препарату "Кріоконсервована пуповинна кров людини", розведеної у 200 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. У клітинному препараті ядровмісних клітин було від  $0,890 \times 10^9$  до  $0,950 \times 10^9$ , в тому числі CD34+ від  $0,486 \times 10^9$  до  $0,520 \times 10^9$ .

Холтеровський моніторинг ЕКГ проводили за допомогою апарата Microvit—101 Shiller з використанням програмного забезпечення MT200. Коронарорентрикулографію

здійснювали за допомогою ангиографічного обладнання Toshiba Infinix VF—i/P.

Рівень IgG, IgM визначали в акредитованій лабораторії за уніфікованими методиками. Для дослідження фагоцитозу вивчали стан бактерицидних систем пероксидази клітини, що корелювало з утворенням супероксидних радикалів, їх визначали за активністю відновлення формазану в тесті з нітросинім тетразолієм (НСТ) [9].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З метою аналізу та виявлення можливого проаритмогенного впливу трансплантації МСК ПК, з огляду на наявність такого впливу деяких інших СК, всім пацієнтам проводили добовий моніторинг Холтер—ЕКГ. Під час дослідження встановлено, що основним ритмом в усіх пацієнтів на всіх етапах спостереження був синусовий. Коливання середньої частоти скорочень серця (ЧСС) в коротко— та середньостроковому періоді спостереження не перевищувало 3% від вихідного стану ( $p = 0,17 - 0,30$ ). За період спостереження подовження коригованого за ЧСС інтервалу QT (QTc), збільшення QTc понад 500 мс та пароксизмів шлуночкової тахікардії типу пірует не спостерігали.

Шлуночкова екстрасистолія (ШЕС), за даними Холтер—ЕКГ, виявлена в усіх хворих. Частота ШЕС відносно кількості всіх комплексів QRS за добу на всіх етапах спостереження суттєво не відрізнялася від такої у здорових осіб. Незначна частота ШЕС за наявності виражених постішемічних змін міокарда, вірогідно, зумовлена систематичним за-

стосуванням  $\beta$ —адреноблокаторів під час консервативної терапії СН. Незважаючи на невелику абсолютну частоту ШЕС, у деяких пацієнтів до трансплантації МСК ПК виявляли форми ШЕС, асоційовані з певним прогностичним ризиком раптової аритмогенної смерті, проте, після трансплантації відзначене відносне зменшення частоти загрозливих форм ШЕС у порівнянні з вихідною (див. таблицю). Збільшення класу ШЕС (за класифікацією Lown—Wolff) виявлене в одного пацієнта на тлі прогресування СН при порушенні режиму медикаментозної терапії.

Зменшення класу ШЕС, відсутність загрозливих для життя порушень ритму та провідності після трансплантації, вірогідно, зумовлені відновленням мікроструктури міокарда ЛШ, зменшенням його фізичного напруження, покращенням внутрішньосерцевої гемодинаміки. Таким чином, трансплантація МСК ПК не впливала на частоту виникнення порушень ритму серця та ризик раптової серцевої смерті, отже, МСК ПК є цілком безпечним типом СК щодо можливості проаритмогенного впливу.

У зв'язку з існуючими даними про потенційну можливість активації атеросклеротичного процесу, виникнення стенозу та рестенозу ВА після трансплантації деяких типів СК, проведений поглиблений аналіз клінічного перебігу та даних об'єктивного дослідження у пацієнтів, яким в комплексі лікування здійснювали трансплантацію МСК ПК. При аналізі ознак ішемії міокарда встановлено, що після трансплантації негативної динаміки за даними ЕКГ, проведеної у 12 стандартних відведеннях, в порівнянні з такою до операції не було. При порівняльному аналізі даних холтеровського моніторингу ЕКГ з використанням критерію ішемічної події (правило 1—1—1, S. J. Shang, C. J. Pepine, 1977; P. E. Cohn, W. B. Kannel, 1987), негативну динаміку після трансплантації не спостерігали.

В одного пацієнта віком 47 років через 8 міс після трансплантації МСК ПК з'явилися скарги на біль за грудниною під час фізичного наван-

**Динаміка змін класу ШЕС (за класифікацією Lown—Wolff) у пацієнтів при трансплантації МСК ПК**

Клас ШЕС	Кількість спостережень				
	до операції (n=20)	через 1 міс (n=18)	через 3 міс (n=18)	через 6 міс (n=14)	через 9 міс (n=14)
V	3	1	—	—	—
IV b	—	1	1	1	1
IV a	4	2	1	—	—
III	7	5	3	—	3
II	—	—	—	—	—
I	6	9	13	13	10

таження. З метою визначення подальшої тактики лікування проведено коронарорентрикулографія. У решти хворих скарж, пов'язаних з прогресуванням ішемічного ураження міокарда, не було. При порівняльному аналізі коронарограм пацієнта до і через 8 міс після трансплантації МСК ПК негативні зміни, ознаки активації атеросклерозу ВА, ділянки з новими ознаками ураження, гіперплазії ендотелію в стенозованих судинах (стенгування з використанням елотинг—стентів за 4 роки до операції) не виявлені. Гемодинамічно незначуще звуження в середньому сегменті правої ВА (до 25 %) не прогресувало. Зона зменшення скоротливості міокарда ЛШ не збільшилась, ФВ ЛШ, за даними вентрикулографії, збільшилася з 24 до 31%. Найбільш вірогідною причиною виникнення стенокардії у пацієнта, на нашу думку, була надмірна фізична активність, пов'язана з покращенням ФК (за NYHA) з III—IV до II.

Таким чином, імовірний негативний вплив трансплантації МСК ПК у вигляді прогресування стенозуючого коронаросклерозу в строки спостереження до 9 міс у пацієнтів при СН не виявлений. Введення МСК ПК не слід вважати додатковим фактором ризику прогресування стенозу ВА при комплексному лікуванні СН ішемічного генезу. Отримані дані уточнюють дані інших дослідників [10].

Після трансплантації МСК ПК аналізували можливість виникнення рецидиву персистоючої TORCH — інфекції (токсоплазмоз, вірус краснухи, цитомегаловірус, вірус простого герпесу 1 і 2 типу, вірус Епштейна—Барр) на тлі можливих змін імунітету. За даними обстеження пацієнтів при СН, гострих клінічних проявів та рецидивів інфекцій протягом усього періоду спостере-

ження не було. Це підтверджене відсутністю змін рівня IgM. У пацієнтів, що перенесли TORCH—інфекцію до трансплантації МСК ПК, коливання рівня IgG були переважно в межах похибки методу визначення. Зміни негативного рівня IgG на сумнівний або з сумнівного на позитивний не спостерігали. Зазначені коливання не мали закономірностей, а відмінності від вихідного рівня не достовірні.

Таким чином, під час спостереження активацію персистоючих в організмі реципієнта вірусних інфекцій не виявлено, це може свідчити про відсутність порушень імунітету після трансплантації МСК ПК, що зумовлюють появу рецидиву TORCH—інфекції.

Відсутність суттєвого впливу трансплантації МСК ПК на стан імунітету реципієнтів підтверджена під час аналізу рівня прозапальних/протизапальних інтерлейкінів (ІЛ) і факторів вродженого імунітету. До операції відзначали підвищення метаболічної (за даними спонтанного та стимульованого НСТ—тесту) та фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів, що може бути пов'язане з формуванням асептичної запальної відповіді на ішемію міокарда. Про це свідчило підвищення рівня прозапального цитокіну (ІЛ—6) за нормального рівня протизапального цитокіну (ІЛ—10), що співпадає з даними інших дослідників [11]. До кінця 1—го місяця спостереження достовірними були зміни лише стимульованої фагоцитарної активності (зменшення на 11,2% відносно вихідної), що могло бути зумовлене певним впливом МСК ПК на імунну систему [12]. У строки спостереження 3—6 міс виявлене достовірне зниження рівня ІЛ—6, проте, статистично достовірних змін метаболічної та фа-

гоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів не було, відзначена тенденція до зменшення фагоцитарного числа. Такі результати могли свідчити про зменшення вираженості запальних процесів у міокарді. До кінця 9 міс спостереження виявлене достовірне зменшення стимульованої метаболічної та поглинальної активності нейтрофільних гранулоцитів, підвищення рівня ІЛ—6, що могло свідчити про переважання протизапальних впливів на тлі реактивації каскаду запальних реакцій на тлі основного захворювання — ішемічної хвороби серця.

Узагальнюючі отримані результати, слід зазначити, що МСК ПК притаманні низькі імуногенні властивості, при їх трансплантації не виникають порушення імунітету, що потребували б специфічного лікування або застережень щодо загрози активації персистоючої вірусної інфекції; також проявляють протизапальну дію у строки спостереження до 9 міс. Трансплантація МСК ПК не супроводжується додатковим ризиком порушення імунітету, що зумовлює активацію персистоючих вірусних інфекцій.

Нами не виявлені жодні ускладнення, типові для трансплантації СК. МСК ПК не справляють проаритмогенного впливу, активації атеросклерозу, рестенозу ВА. Вони характеризуються низькою імуногенністю, про що свідчила відсутність активації персистоючої TORCH—інфекції та порушення вродженого імунітету. МСК ПК притаманний значний протизапальний вплив, що підтверджене достовірним зниженням рівня протизапальних цитокінів.

Отже, трансплантація МСК ПК безпечна для хворих при СН, рефрактерній до стандартних методів консервативної терапії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology Foundation: American Heart Association Task Force on Practice Guidelines / C. W. Yancy, M. Jessup, B. Bozkurt [et al.] // *Circulation*. — 2013. — N 128. — P. 1810 — 1852.
2. Zarrinkoub R. The epidemiology of heart failure, based on data for 2.1 million inhabitants in Sweden / R. Zarrinkoub, B. Wettermark, P. Wandell // *Eur. J. Heart Fail.* — 2013. — N 15. — P. 995 — 1002.
3. Roger V. R. Epidemiology of heart failure / V. R. Roger // *Circ. Res.* — 2013. — Vol. 113, N 6. — P. 646 — 659.
4. 2010 focused update of ESC Guidelines on device therapy in heart failure: an update of the 2008 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure and the 2007 ESC Guidelines for cardiac and resynchronization therapy. Developed with the special contribution of the Heart Failure Association and the European Heart Rhythm Association / K. Dickstein, P. E. Vardas, A. Auricchio [et al.] // *Eur. J. Heart Fail.* — 2010. — N 12. — P. 1143 — 1153.

5. Engineering myocardial tissue: The convergence of stem cells biology and tissue engineering technology / J. W. Buikema, P. Meer, J. P. G. Sluijter [et al.] // *Stem Cells*. — 2013. — Vol. 31, N 12. — P. 2587 — 2598.
6. Liao S. Y. Proarrhythmic risk of embryonic stem cell—derived cardiomyocyte transplantation in infarcted myocardium / S.Y. Liao, Y. Liu, C. W. Siu // *Heart Rhythm*. — 2010. — N 7. — P. 1852 — 1859.
7. Felix A. Remodeling of the thoracic aorta after bone marrow cell transplantation / A. Felix, N. Monteiro, V. N. Rocha // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* — 2014. — Vol. 7, N 9. — P. 5527 — 5537.
8. Kedia S. Infectious complications of hematopoietic stem cell transplantation / S. Kedia, P. S. Acharya, F. Mohammad // *J. Stem Cell Res. Ther.* — 2013. — Vol. 7, N 3. — P. 1 — 8.
9. Шмелев В. И. К оценке теста восстановления нитросиногетразолия у больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких / В. И. Шмелев, Т. К. Бумагина, Ю. Г. Митерев // *Лаб. дело*. — 1979. — № 9. — С. 524 — 528.
10. Nuzzolo E. R. Adult and cord blood endothelial progenitor cells have different gene expression profiles and immunogenic potential / E. R. Nuzzolo, S. Capodimonti, M. Martini // *Blood Transfus.* — 2014. — N 12. — P. 367 — 374.
11. Hofmann U. How can we cure a heart "in flame"? A translational view on inflammation in heart failure / U. Hofmann, S. Frantz // *Basic Res. Cardiol.* — 2013. — N 108. — P. 356.
12. Bernardo M. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation / M. E. Bernardo, W. E. Fibbe // *Cell Stem Cell*. — 2013. — N 13. — P. 392 — 402.

