

И.И. Ким, О.В. Повещенко, В.И. Коненков, Е.А. Покушалов*, А.Б. Романов*,
Н.А. Бондаренко, А.Ф. Повещенко, Д.С. Сергеевичев*, А.М. Караськов*

Эффективность мобилизации CD34⁺ прогениторных клеток препаратом G-CSF в зависимости от ишемического анамнеза и возраста больных с хронической сердечной недостаточностью

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск, 630060, ул. Тимакова, 2, kii5@yandex.ru
* ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15, crsc@ngs.ru

УДК 612.42:612.017.1
ВАК 14.01.05

© И.И. Ким,
О.В. Повещенко,
В.И. Коненков,
Е.А. Покушалов,
А.Б. Романов,
Н.А. Бондаренко,
А.Ф. Повещенко,
Д.С. Сергеевичев,
А.М. Караськов, 2012

Показано, что введение препарата G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) пациентам с хронической сердечной недостаточностью оказывает гемостимулирующее воздействие, увеличивая количество лейкоцитов и нейтрофилов в периферической крови. G-CSF приводит к мобилизации прогениторных клеток из костного мозга в периферическую кровь. На количество CD34⁺-клеток после мобилизации влияют их базальное содержание, количество инфарктов и длительность после последнего перенесенного инфаркта. Ключевые слова: прогениторные клетки; ишемическая болезнь сердца; G-CSF-мобилизация.

Ведущая роль в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний принадлежит ишемической болезни сердца (ИБС) – 35% [1]. Несмотря на эффективность современных методов лечения, по-прежнему существует необходимость в разработке принципиально новых подходов к лечению ИБС и инфаркта миокарда (ИМ) как одной из наиболее грозных ее форм. В связи с этим в последние два десятилетия развивается новый подход восстановительной терапии ИБС – клеточная терапия стволовыми/прогениторными клетками (ПК) [6]. Ранее было показано, что трансплантация клеток костного мозга (КМ) улучшает перфузию миокарда и систолическую функцию у пациентов с ИБС, но инвазивность забора КМ ограничивает его клиническое применение [3, 9, 14, 15, 17]. Мобилизация ПК из костного мозга в периферическое русло путем применения препарата гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) является альтернативой забору клеток КМ и менее инвазивным подходом, который используется в экспериментальных работах и клинических исследованиях [9].

В гематологической практике действие G-CSF как мобилизующего агента стволовых клеток в периферическую кровь хорошо изучено, при этом CD34⁺ используется как маркер эффективности мобили-

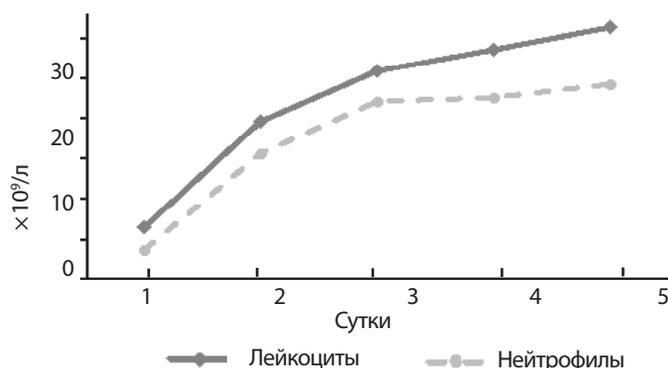
зации. Также большинство работ по трансплантации ПК пациентам с ИМ для оценки эффективности мобилизации используют маркер CD34⁺. Ранее была показана безопасность и эффективность введения G-CSF как у здоровых доноров, так и пациентов с ИБС [9]. Цель исследования – определение влияния возраста, длительности заболевания и количества перенесенных ИМ на эффект мобилизации G-CSF у больных ИБС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 38 больных (89% из них мужчины) ИБС с III–IV функциональным классом хронической сердечной недостаточности (ХСН) (NYHA). Средний возраст пациентов 57,0±7,7 лет. Длительность ИБС составила 8,04±5,84 лет, количество ИМ – 1,5±0,8. Письменное информированное согласие получено от всех пациентов. Протокол исследования одобрен локальными этическими комитетами, утвержден учеными советами обоих учреждений-соисполнителей. Пациенты находились на лечении в ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина.

Введение рекомбинантного человеческого G-CSF (грасальва – «TEVA Pharmaceutical Industries Ltd», Израиль) осуществлялось путем подкожных инъекций в дозе 3,3–5,0 мкг/кг веса в течение 5 суток. До моби-

Динамика количества лейкоцитов и нейтрофилов в процессе мобилизации G-CSF.



лизации (0 сутки) и после окончания инъекций G-CSF на 6-е сутки забиралась кровь из локтевой вены. Выделение фракции мононуклеарных клеток осуществлялось на градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho = 1,078$ г/л). Фенотипирование мононуклеарных клеток проводили с помощью проточного цитометра FACS Cantoll («Becton Dickinson», США) в программе FACS Diva («Becton Dickinson», США). Для поверхностного маркирования использовали моноклональные антитела к CD34⁺, CD45, меченные флуоресцеином изотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE), в количестве, рекомендуемом производителем («Becton Dickinson», США).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной и непараметрической статистики с использованием программы Statistica 6.0. Для описательной статистики использовались медиана, 25 и 75 квартили. Для оценки достоверности различий использовался непараметрический критерий Манна – Уитни, степень взаимозависимости исследуемых параметров оценивалась с помощью показателя ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биологические эффекты G-CSF опосредуются его взаимодействием с рецептором, который экспрессируется на клеточной поверхности нейтрофилов, индуцируя их экспансию в КМ, синтез протеаз, что приводит к деградации и инактивации адгезии и хемотаксиса между гемопоэтическими стволовыми клетками и КМ и выходу ПК в периферическое русло крови. Показано, что введение G-CSF здоровым донорам приводит к эффективной экспансии нейтрофилов и увеличению количества лейкоцитов в периферической крови [2]. В проводимом нами исследовании введение G-CSF пациентам с тяжелой ХСН также приводит к лейкоцитозу и гранулоцитозу. Количество лейкоцитов в периферической крови возрастает 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 5-м суткам (рисунок). Повышение количества лейкоцитов сопровождается повышением процентного и абсолютного числа нейтрофилов в 6,8 раз (рисунок). Повышение

количества нейтрофилов прямо коррелирует с повышением количества лейкоцитов ($r_s = 0,987$, $p = 0,004$).

Для оценки эффекта мобилизации ПК в периферическое русло использовался маркер гемопоэтических стволовых клеток CD34⁺. Подсчет CD34⁺-клеток проводился в мононуклеарной фракции клеток путем ограничения событий с учетом экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45. Показано, что у пациентов с ХСН базальное количество циркулирующих CD34⁺-клеток составляет 0,01% (медиана). После введения G-CSF на 6-е сутки число CD34⁺ возрастает до 0,42% (медиана) (табл. 1). Кратность увеличения количества CD34⁺-клеток в среднем составляет $20,7 \pm 16,8$ раз. Причем у тех пациентов (11%), у которых изначально до мобилизации был высокий уровень CD34⁺-клеток (выше 0,2%), прирост CD34⁺-клеток был незначительным ($2,7 \pm 1,1$ раз). Эти данные согласуются с данными литературы как по количеству, так и приросту CD34⁺-клеток у больных с сердечно-сосудистой патологией [10]. У здоровых же людей количество CD34⁺-клеток после мобилизации достигает более высоких значений (до 1%) [7]. Вместе с тем нами не было выявлено достоверных связей между увеличением числа лейкоцитов и нейтрофилов и количеством CD34⁺-клеток.

Известно, что с возрастом и при различных хронических, в том числе сердечно-сосудистых, заболеваниях уменьшается как количество, так функциональные свойства ПК [4, 8]. Включенные в наше исследование пациенты не только принадлежат к старшей возрастной группе и имеют длительный ишемический анамнез, но и перенесли от 1 до 5 инфарктов, характеризуются тяжелой прогрессирующей СН. Мы провели анализ связи количества CD34⁺-клеток как в нестимулированных условиях, так и при воздействии G-CSF после мобилизации с возрастом пациентов. Показано, что отсутствуют достоверные взаимосвязи между этими показателями (табл. 2). В то же время имеются достоверная обратная корреляционная связь между количеством CD34⁺-клеток после мобилизации G-CSF и количеством перенесенных ИМ и достоверная положительная корреляционная связь с длительностью от последнего инфаркта до момента введе-

Таблица 1
Количество CD34⁺-клеток до и после мобилизации G-CSF

Экспрессия маркера, % позитивных клеток	Кол-во CD34 ⁺ -клеток		Кратность увеличения
	0 сутки	6-е сутки	
CD34 ⁺	0,01 (0,01–0,067)	0,42 (0,25–0,64) p = 0,0001*	22,5 (4,96–340,1)

Таблица 2
Корреляция содержания CD34⁺-клеток,
* p – достоверность различий по Спирмену

Показатели	Кол-во CD34 ⁺ -клеток			
	0 сутки		6-е сутки	
Возраст	rs = 0,28	p = 0,10	rs = 0,13	p = 0,44
Кол-во инфарктов	rs = -0,19	p = 0,25	rs = -0,46	p = 0,05*
Длительность от последнего инфаркта до введения клеток	rs = 0,26	p = 0,12	rs = 0,53	p = 0,001*

Таблица 3
Количество CD34⁺-клеток до и после мобилизации,
* p = 0,001 достоверность различий между подгруппами

Показатели	Кол-во CD34 ⁺ -клеток		
		0 сутки	6-е сутки
Возраст, лет	48,5 (45–49)	0,03 (0,02–0,05)	0,66 (0,28–1,03)
	58 (55–64)	0,01 (0,01–0,07)	0,42 (0,22–0,56)
Кол-во инфарктов	1	0,03 (0,01–0,08)	0,66 (0,27–1,03)
	2 (2–3)	0,01 (0,01–0,02)	0,42 (0,11–0,56)
Длительность от последнего инфаркта до введения клеток, лет	2 (1–3,5)	0,01 (0,01–0,55)	0,36 (0,21–0,55)*
	12 (11–13)	0,03 (0,01–0,07)	1,04 (0,55–1,51)

ния клеток. Таким образом, у пациентов с одним инфарктом в анамнезе количество прогениторных CD34⁺-клеток после введения G-CSF было максимальным, что позволяет прогнозировать лучший эффект мобилизации у таких больных с хронической ишемией миокарда.

Выявив определенные закономерности зависимости клинических показателей и количества CD34⁺-клеток, в последующем мы разделили пациентов на подгруппы в зависимости от возраста (старше и младше 50 лет), количества инфарктов (больше и равно 1) и длительности от последнего инфаркта (больше и меньше 10 лет). При разделении пациентов на подгруппы в зависимости от возраста была выявлена тенденция к увеличению как базального количества CD34⁺-клеток, так и их количества после мобилизации с уменьшением возраста пациентов, т. е. чем моложе пациенты, тем, вероятно, больше выход клеток предшественников в периферическую кровь, тем эффективнее мобилизация. Аналогичную тенденцию показало влияние количества инфарктов (табл. 3). В то же время было показано, что чем больше прошло времени от последнего инфаркта, тем больше CD34⁺-клеток как до введения G-CSF (тенденция), так и после мобилизации на 6-е сутки (p = 0,001). Этот эффект подтвердила и положительная корреляционная связь между длительностью от последнего инфаркта более 10 лет и количеством CD34⁺-клеток после мобилизации на 6-е сутки (rs = 0,77, p = 0,015) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях было показано, что трансплантация мобилизованных G-CSF стволовых/прогениторных клеток улучшает функцию сердца как при острой, так и при хронической СН [3, 16, 18]. Исследования эффективности мобилизации G-CSF у здоровых доноров показали, что количество CD34⁺-клеток после мобилизации достигает более высоких значений (до 1%) [7], чем у больных с сердечно-сосудистой патологией [10]. При этом было обнаружено, что на эффективность мобилизации действуют базальное содержание CD34⁺-клеток и возраст донора, но не оказывают значительного влияния ни пол, ни вес донора, ни доза препарата [5].

В нашем исследовании мы изучали воздействие на мобилизацию стволовых/прогениторных клеток таких факторов, как базальное содержание CD34⁺-клеток, возраст, количество ИМ и длительность заболевания у пациентов с тяжелой ишемической болезнью сердца, у которых прямая реваскуляризация миокарда неэффективна, с III–IV ФК ХСН. Показано, что у здоровых доноров высокое базальное содержание CD34⁺-клеток и молодой возраст являются хорошими прогностическими признаками эффективности мобилизации. При этом чем больше базальный уровень CD34⁺-клеток и чем моложе доноры, тем эффективнее мобилизация [5, 13].

В нашем исследовании мы также показали в общей группе пациентов связь между базальным уровнем CD34⁺-клеток и их количеством после мобилизации. Вместе с этим при разделении пациентов на подгруппы в зависимости от базального уровня CD34⁺-клеток больше и меньше 0,2% было показано, что кратность увеличения клеток, т. е. эффективность мобилизации, больше у тех пациентов, у которых базальный уровень был меньше 0,2%. Это может быть связано с истощением пула стволовых/прогениторных клеток в КМ и избыточным спонтанным их выходом в периферическое русло до мобилизации в интактных условиях. В то же время нами не выявлено достоверных связей количества мобилизованных CD34⁺-клеток с возрастом пациентов ни в общей группе, ни в подгруппах старше и младше 50 лет. Хотя была обнаружена тенденция к увеличению как базального количества CD34⁺-клеток, так и их количества после мобилизации с уменьшением возраста пациентов (младше 50 лет).

Изучение влияния количества перенесенных ИМ на эффект мобилизации показало достоверную обратную корреляционную связь. Кроме того, также в подгруппах пациентов была выявлена тенденция к увеличению как базального количества CD34⁺-клеток, так и их количества после мобилизации с уменьшением количества инфарктов (≤ 1). Ранее зарубежными учеными было показано, что при ИМ происходит спонтанная мобилизация клеток КМ, в частности CD34⁺-клеток [11, 12]. Вследствие этого можно предположить, что с каждым последующим ИМ происходит истощение пула стволовых/прогениторных клеток в КМ и уменьшение мобилизации в периферический кровоток. Вместе с этим нами была выявлена достоверная положительная корреляционная связь между длительностью от последнего ИМ и количеством CD34⁺-клеток после мобилизации G-CSF. Таким образом, чем больше времени прошло от последнего инфаркта, тем больше CD34⁺-клеток мобилизуются в периферическое русло, что, вероятно, связано с восстановлением пула стволовых/прогениторных клеток в костном мозге.

В результате нашего исследования было показано, что более молодой возраст пациента, меньшее количество ИМ, большая длительность после последнего перенесенного ИМ и базальный уровень CD34⁺-клеток могут служить хорошими прогностическими факторами эффективной мобилизации стволовых/прогениторных клеток в периферическое русло при ишемической болезни сердца III–IV ФК ХСН (NYHA). Несмотря на меньшую эффективность мобилизации ПК у больных ИБС по сравнению со здоровыми донорами, количество выделяемых CD34⁺-клеток видится достаточным для дальнейшего интрамиокардиального введения и репарации сердечной ткани у больных с хронической сердечной недостаточностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.И. // Современные мед. технологии. 2010. С. 32–37.
2. Anderlini P., Champlin R. // Blood. 2008. V. 111. P. 1767–1772.

3. Assmus B. et al. // Circulation. 2002. V. 106. P. 3009–3017.
4. Capobianco S. et al. // World J. Cardiol. 2010. V. 26. P. 411–420.
5. De la Rubia J. et al. // Hematologica 2004. V. 89. P. 1530–1532.
6. Herrmann J. et al. // Ann. Thorac. Surg. 2009. V. 88. P. 1714–1722.
7. Erbs S., Linke A., Adams V. et al. // Circ. Res. 2005. V. 97. P. 756–762.
8. Gascon P., Fuhr U. et al. // Ann. Onc. 2010. V. 21. P. 1419–1429.
9. Hyun-Jae Kang et al. // Lancet. 2004. V. 363, Issue 9411. P. 751–756.
10. Imamura R. et al. // J. Immunology. 2005. V. 175. P. 2647–2654.
11. Kondo T., Shintani S. et al. // Heart Asia. 2010. V. 2. P. 20–23.
12. Leone A. et al. // Eur. Heart J. 2005. V. 26. P. 1196–1204.
13. Mogili S., Chen R., Beccker M. et al. // Blood. 2010. P. 116.
14. Perin E. et al. // Circulation. 2003. V. 107. P. 2294–2302.
15. Strauer B. et al. // Circulation. 2002. V. 106. P. 1913–1918.
16. Suzuki S. et al. // Circulation. 2004. V. 110. P. 1387–1391.
17. Tse H., Kwong Y., Chan J. et al. // Lancet. 2003. V. 361. P. 47–49.
18. Wojakowski W. et al. // Eur. Heart J. 2006. V. 27. P. 283–289.

Ким Ирина Иннокентьевна – научный сотрудник лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН (Новосибирск).

Повещенко Ольга Владимировна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией лимфотропной терапии и лимфодиагностики НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН (Новосибирск).

Коненков Владимир Иосифович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, директор НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН (Новосибирск).

Покушалов Евгений Анатольевич – доктор медицинских наук, заместитель директора по научно-экспериментальной работе, руководитель центра хирургической аритмологии ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

Романов Александр Борисович – кандидат медицинских наук, хирург кардиохирургического отделения нарушений ритма сердца ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

Бондаренко Наталья Анатольевна – аспирант лаборатории лимфотропной терапии и лимфодиагностики НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН (Новосибирск).

Повещенко Александр Федорович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией физиологии протективной системы НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН (Новосибирск).

Сергеевичев Давид Сергеевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной хирургии и морфологии ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).

Караськов Александр Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, Заслуженный деятель науки РФ, директор ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск).