

Autológna transplantácia mezenchýmových kmeňových buniek do koronárneho riečiska dysfunkčného myokardu. Opis prípadu

EVA GONCALVESOVÁ, JÁN LAKOTA*, VILIAM FRIDRICH, JURAJ FABIÁN
Bratislava, Slovenská republika

GONCALVESOVÁ E, LAKOTA J, FRIDRICH V, FABIÁN J. **Autológna transplantácia mezenchýmových kmeňových buniek do koronárneho riečiska dysfunkčného myokardu. Opis prípadu.** *Cardiol* 2004;13(3):161–164

Autori opisujú u nás prvú transplantáciu autológnych kmeňových mezenchýmových buniek u pacienta so srdcovým zlyhaním päť rokov po infarkte myokardu v oblasti prednej steny. Bunky v celkovom množstve 2×10^7 sa injikovali katétrom zavedeným štandardnou technikou do ramus interventricularis anterior v štyroch bolusoch po 3 ml suspenzie. Pacienta po štyroch dňoch prepustili do domácej starostlivosti. Do 14 dní po výkone sme nezaznamenali žiadne komplikácie.

Kľúčové slová: srdcové zlyhanie – transplantácia buniek – mezenchýmové kmeňové bunky

GONCALVESOVA E, LAKOTA J, FRIDRICH V, FABIAN J. **Autologous transplantation of mesenchymal stem cells in coronary artery supplying of dysfunctional myocardium. Case report.** *Cardiol* 2004;13(3):161–164

The authors describe the first autologous transplantation in the Slovak Republic of mesenchymal stem cells in a patient with heart failure five years after anterior myocardial infarction. A total of 2×10^7 of in-vitro expanded cells were injected into the left anterior descending artery using routine catheter technique. Four days after the intervention the patient was discharged from hospital. No complications had occurred 14 days after the procedure.

Key words: Heart failure – Stem cells transplantation – Mesenchymal stem cells

Srdcové zlyhávanie (SZ) na podklade ťažkej systolickej dysfunkcie ľavej komory pri pokročilej, chirurgicky neriešiteľnej koronárnej chorobe je závažný medicínsky problém. Prognóza týchto pacientov je zlá a len malá časť z nich žije dlhšie ako päť rokov od prvej manifestácie SZ.

Liečba bunkami je jednou z perspektívnych možností liečby týchto pacientov. Od prenosu zárodočných buniek do myokardu sa očakáva regenerácia jeho devitalizovaných okrskov. Teoretické a experimentálne poznatky, ako aj doterajšie klinické skúsenosti s podobnými postupmi sme opísali v prechádzajúcich súhrnných prácach (1, 2).

Náplňou tohto článku je informácia o prvom perkutánom intrakoronárnom podaní zárodočných buniek v klinickej medicíne v našej republike.

Opis prípadu

49-ročného pacienta po opakovaných infarktoch myokardu prednej steny poukázali na naše oddelenie pre syndróm srdcového zlyhávania v štádiu NYHA III. Ob-

jektívne sme okrem príznakov SZ zistili výrazne dysfunkčnú a dilatovanú ľavú komoru s akinézou až dyskínézou prednej steny a hrotu, hypokinézou spodnej steny s globálnou ejekčnou frakciou ľavej komory 0,21 (**obrázok 1**). Na koronárnych tepnách sa nezistili významnejšie stenózy.

Po rozbere zdravotného stavu a zhodnotení prognózy pacienta sme uvažovali aj o transplantácii srdca. V tom čase sme však tento výkon nepovažovali za naliehavý.

Pacienta s odporúčaním komplexnej konzervatívnej liečby prepustili do domácej starostlivosti. Pri kontrolnom vyšetrení o šesť mesiacov bol stabilizovaný, funkčne NYHA III, bez prejavov kongescie. Vzhľadom na vyčerpané možnosti konvenčnej liečby a neaktuálnosť transplantácie srdca sme pacientovi navrhli liečbu intrakoronárnym podaním mezenchýmových kmeňových buniek. Pacient s tým súhlasil.

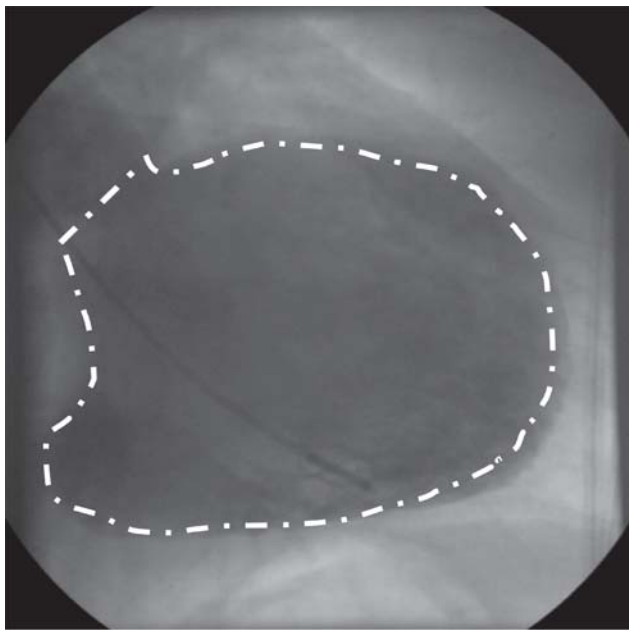
Výsledky vybraných relevantných vyšetrení, ktoré sa urobili dva až tri týždne pred výkonom, sú uvedené v **tabuľke 1**.

14. januára 2004 sme v lokálnej anestéze s analgetickou premedikáciou odobrali 30 ml kostnej krvi z drene lopaty bedrovej kosti. Z tejto sa následne izolovali mezenchýmové kmeňové bunky a expandovali in vitro. Použila sa komerčne dostupná technológia firmy Osiris Therapeutics, INC. Podrobnosti metódy sú opísané inde (3), a preto sa na tomto mieste obmedzíme na stručný opis izolácie a kultivácie. Aspirát kostnej drene sa riedil

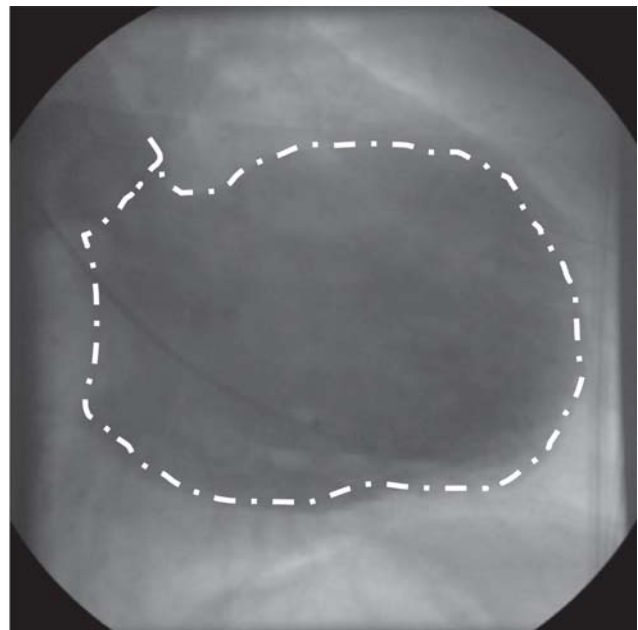
Zo Slovenského ústavu srdcových a cievnych chorôb a *Národného onkologického ústavu v Bratislave

Do redakcie prišlo dňa 5. 3. 2004; prijaté dňa 26. 4. 2004

Adresa pre korešpondenciu: Doc. MUDr. Eva Goncalvesová, CSc., Transplantačné oddelenie, SÚSCH, Pod Krásnou hôrkou 1, 833 48 Bratislava, goncal@susch.sk



Diastola



Systola

Obrázok 1 Lavostranná ventrikulografia
Figure 1 Left ventriculography

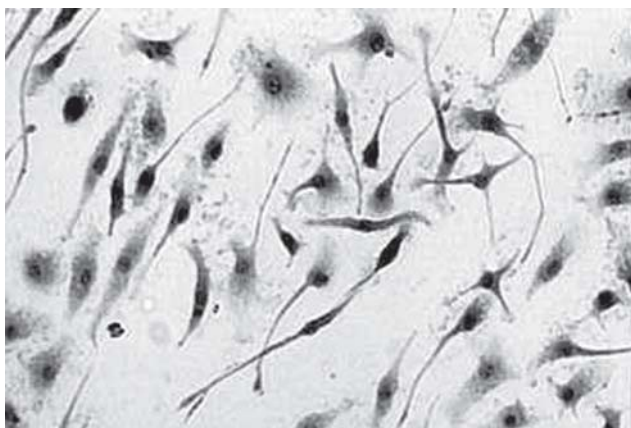
70 ml PBS a centrifugoval 900 xg 10 minút pri 20 °C. Sedimenty boli nasuspendované v 30 ml PBS a prevrstvené po 15 ml na 35 ml Percoll (hustota 1,073 g/ml) a centrifugované 900 xg 30 minút pri 20 °C. Mononukleárne bunky sa odsali a nariedili PBS do 50 ml a centrifugovali 460 xg 10 minút. Sedimenty boli opäť suspendované v PBS. Bunky sa pridali do 35 ml DMEM (Gibco) s nízkou glukózou, ktoré obsahovalo 10 % FBS a inkubované pri 37 °C v 5 % CO₂ 48 hodín. Neaderujúce bunky sa zliáli a ku adherujúcim bunkám sa pridalo to isté médium. Výmeny sa opakovali každých 72 hodín až do 90 – 100 % konfluencie adherujúcich buniek. Celá inkubácia sa uskutočňovala pri 37 °C v 5 % CO₂. Adherujúce bunky sa uvoľnili inkubáciou 0,05 % trypsinom-EDTA, po centrifugácii nasuspendované v 12 ml PBS, ktorý obsahoval 2 % ľudský albumín. Získaná populácia buniek (**obrázok 2**) bola CD 34, CD 45 a CD 117 negatívna.

2. februára 2004 sa vykonala intrakoronárna instilácia získaných buniek. Balónikovým katétrom so systémom „over the wire“ (Concerto) sa počas trojminútových nízkotlakových oklúzií strednej časti ramus interventricularis anterior aplikovali štyri 3 ml bolusy suspenzie kmeňových buniek. Celkový počet podaných buniek bol 2 x 10⁷. Výkon pacient toleroval dobre a prebehol bez komplikácií. V nasledujúcom 24-hodinovom období monitorovania na Oddelení koronárnej starost-

Tabuľka 1 Prehľad výsledkov vybraných vyšetrení pred výkonom
Table 1 Selected results of pre-transplant examination

Výšetrenie (Test)	Výsledok (Result)
Srdcová frekvencia (Heart rate) (min ⁻¹)	76
Tlak krvi (Blood pressure) (mmHg)	110/70
EKG (ECG)	Fibrilácia predsiení (Atrial fibrillation) Bifascikulárna blokáda (Bifascicular block)
Kardiorakálny index (Cardiothoracic index)	0,52
Komorová ektopická aktivita (Ventricular ectopic activity)	Lown 4B
Šesť minút chôdze (m) (Six minutes walking test)	560
Maximálna spotreba kyslíka (ml/kg/min) (Maximal oxygen consumption)	14,1
BNP (pg/ml)	480
Echokardiografia (Echocardiography)	
Ľavá komora v diastole (mm) (Left ventricle in diastole)	84
Mitrálna regurgitácia (stupeň) (Mitral regurgitation (degree))	II
Kinetika stien (Wall motion)	Hypoakíneza prednej steny (Hypoakinesis of anterior wall) Dyskinéza hrotu (Dyskinesis of apex)
Wall motion score (16 segmentov) (16 segments)	37
EF LK (izotopová ventrikulografia) (EF LV (isotope ventriculography))	0,14
Perfúzna scintigrafia (Perfusion scintigraphy)	Ireverzibilná porucha v povodí RIA a PKA (Irreversible defect in LAD and RCA regions)

EF LK – ejekčná frakcia ľavej komory (LVEF – Left ventricular ejection fraction), RIA – ramus interventricularis arteria (LAD – Left anterior descending), PKA – pravá koronárna artéria (RCA – Right coronary artery)



Obrázok 2 Mezenchýmové kmeňové bunky v kultúre
Figure 2 Mesenchymal stem cells in culture

livosti sa nezachytili žiadne elektrokardiografické či biochemické prejavy lézie myokardu, ani významné poruchy rytmu. Pacienta v dobrom klinickom stave sme na štvrtý deň po výkone prepustili do ambulantnej starostlivosti.

Symptomatické poruchy rytmu sme nezaznamenali. Po troch, ani po 14 dňoch sme 24-hodinovým monitorovaním EKG nezistili zvýšenie komorovej ektoptickej aktivity. Pretrvávala chronická fibrilácia predsiení (FP). Podrobné zhodnotenie klinického stavu, predovšetkým regionálnych zmien vo funkcii a perfúzii myokardu plánujeme o desať týždňov po výkone.

Diskusia

Početné laboratórne výskumy, experimenty na zvieratách, ako aj niektoré klinické pozorovania svedčia o tom, že rozličné typy zárodočných buniek dokážu diferencovať do fenotypu kardiomyocytu. Pritom podporia alebo sa priamo zúčastňujú na neovaskularizácii a regenerácii myokardu (4, 5). Jedným zo zdrojov zárodočných buniek u dospelého jednotlivca je kostná dreň alebo periférna krv. V kostnej dreni sa nachádza viacero typov multipotentných zárodočných buniek s rozličnými fenotypickými charakteristikami. Jednými z nich sú mezenchýmové kmeňové bunky (mesenchymal stem cells, MSC). Experimentálne práce na zvieratách potvrdili, že po injekcii do viabilného myokardu nadobúdajú charakteristiky kardiomyocytov, zlepšujú perfúziu, ako aj funkciu myokardu po experimentálne navodenom infarkte (6 – 9).

Mechanizmus účinku buniek kostnej drene na funkciu ischemickej lézie/nekrózy myokardu nie je jasný a je

pravdepodobne multifaktoriálny. Ukazuje sa, že sa na ňom podieľa predovšetkým indukcia neovaskularizácie. Ďalší možný efekt je podpora prirodzených reparačných procesov prostredníctvom uvoľňovaných rastových faktorov. Regenerácia myokardu diferenciaciou kmeňových buniek do kardiomyocytov sa zatiaľ jednoznačne nedokázala ani nevyklúčila.

Klinických skúseností s intrakoronárnou aplikáciou buniek kostnej drene v liečbe koronárnej choroby je relatívne málo. Väčšina z nich pochádza z aplikácie suspenzie neseparovaných mononukleárných buniek kostnej drene niekoľko dní po perkutánnej intervencii pre akútne infarkt myokardu. Takýmto spôsobom sa zistilo zlepšenie regionálnej perfúzie aj funkcie v zóne poškodenej infarktom (10, 11).

Pri chronickej systolickej dysfunkcii ľavej komory spôsobenej pokročilou koronárnou chorobou sa doteraz uprednostňovala priama intramyokardiálna aplikácia buniek (12 – 14). Zistilo sa zmenšenie intenzity, ako aj počtu anginózných záchvatov a súčasné zlepšenie regionálnej kontraktility.

Na kongrese AHA (Orlando, november 2003) Zeiher A. M. prezentoval prvé skúsenosti s intrakoronárnym podaním mononukleárných buniek získaných z kostnej drene alebo periférnej krvi. Tento postup použili u 64 pacientov viac ako šesť mesiacov po akútnom infarkte myokardu s priemernou EF ľavej komory 30 %. Zaznamenalo sa zlepšenie regionálnej funkcie v zóne predchádzajúceho infarktu. Obavy z proarytmického účinku implantovaných zárodočných buniek kostnej drene, ktorý sa pozoroval po implantácii skeletálnych myoblastov alebo embryonálnych buniek, sa zatiaľ nepotvrdili (15).

Cieľom tejto publikácie je opísanie transkatérovej intrakoronárnej aplikácie kmeňových mezenchýmových buniek u pacienta s chronickou ischemickou chorobou srdca s rozsiahlou nekrozou/jazvou a klinicky manifestným srdcovým zlyhávaním. Bunky sa injikovali do dobre priechodnej koronárnej tepny (RIA), v povodí ktorej v minulosti prebehol infarkt myokardu. Táto oblasť bola akinetická až dyskinetická, bez viabilného myokardu. Použili sme in vitro expandované mezenchýmové kmeňové bunky. Podľa dostupných informácií ide o prvú intrakoronárnou aplikáciu ex vivo expandovaných kmeňových mezenchýmových buniek v klinickej medicíne všeobecne. Originalita nášho postupu spočíva vo výbere pacientov, ale predovšetkým v druhu použitých buniek. Väčšina doterajších skúseností je s aplikáciou zárodočných buniek u chorých pri akútnom infarkte myokardu po perkutánnej revaskularizácii. V našom programe sa sústreďujeme na pacientov po prekonaní rozsiahleho IM, s remodelovanou ľavou komorou, ťažkou systolicou

dysfunkciou a priechodnou infarktovou artériou. V predchádzajúcich citovaných správach išlo vzhľadom na použitú populáciu buniek o zmes mononukleárných buniek. V našom prípade ide o homogénnu populáciu buniek bez charakteristík hemopoetickej diferenciacnej línie, selektovaných na základe ich schopnosti adhérencie. Vzhľadom na nedávno publikované výskumy sa táto populácia buniek zdá byť veľmi perspektívnou. Ukazuje sa totiž, že hemopoetické zárodočné bunky nie sú schopné diferenciácie do kardiomyocytov (16, 17).

Metóda je u nás realizovateľná, ekonomicky únosná a bezpečná. Jej význam pre zlepšenie funkcie myokardu a pozitívne ovplyvnenie osudu chorých ukáže budúcnosť. Prvé skúsenosti naznačujú, že intrakoronárna aplikácia MSC je vhodná a perspektívna cesta vo vývoji nových prístupov v liečbe pokročilej ischemickej choroby srdca.

Práca sa uskutočnila v rámci výskumnej úlohy „Celulárna plastika ischemickej kardiomyopatie“, ktorú schválila Etická komisia SÚSCH 5. novembra 2003.

Podakovanie: Autori ďakujú Prof. MUDr. Vasilovi Hricákovi, primárovi Oddelenia Koronárnej starostlivosti, Prof. MUDr. Ivanovi Pecháňovi, DrSc., CSc. a MUDr. Pavlovi Povincovi, PhD, spoluriešiteľom výskumnej úlohy „Celulárna plastika ischemickej kardiomyopatie“.

Dovetok: Pri autorskej korektúre boli známe výsledky vyšetrenia po desiatich týždňoch. EKG – chronická FP, tvar krivky bez zmeny. EFLK 0,16, priemer ľavej komory v diastole 85 mm, „wall motion score 37“, šesťminútový test chôdzou 600 m, maximálna spotreba kyslíka 16,5 ml/kg/min, BNP 398 pg/ml. Subjektívne pacient udával zlepšenie fyzickej výkonnosti, žiadne nové obtiaže sa neobjavili.

Literatúra

1. Goncalvesová E, Lakota J, Fridrich V, et al. Celulárna kardiomyoplastika. Reálne východisko alebo únik z reality? *Cardiol* 2004;13:100–106.
2. Fabián J, Goncalvesová E. Prehľad klinických skúseností s bunkovou liečbou srdcového zlyhania a infarktu myokardu. *Intervenční a akutní kardiologie* 2004;2:v tlačí.
3. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:307–316.
4. Perin EC, Yong-Jian G, Willerson JT. Adult stem cell therapy in perspective. *Circ* 2003;107:935–938.
5. Chiu RCJ. Bone-Marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Failure Rev* 2003;8:247–251.
6. Shake JG, Gruber PJ, William A. Baumgartner et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919–1926.
7. Yau TM, Tomita S, Weisell RD, et al. Beneficial effect of autologous cell transplantation on infarcted heart function: Comparison between bone marrow stromal cells and heart cells. *Ann Thorac Surg* 2003;75:169–177.
8. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Myogenesis, and angiogenesis following autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation improved heart function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:963–971.
9. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;22:699–705.
10. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circ* 2002;106:1913–1918.
11. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circ* 2002;106:3009–3017.
12. Tse HF, Kwong YL, Chan JKF, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47–48.
13. Perin EC, Dohman HFR, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circ* 2003;107:2294–2302.
14. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45–46.
15. Makkar RR, Lill M, Chen PS. Stem cell therapy for myocardial repair. Is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:2070–2072.
16. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haemopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664–668.
17. Balsam LB, Wagers AJ, Christenses JL, et al. Haemopoietic stem cells adopt mature haemopoietic fates in ischemic myocardium. *Nature* 2004;428:668–673.