

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е.Н. МЕШАЛКИНА» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Гуляева Ксения Константиновна

**Клинико-функциональная оценка метода интрамиокардиальной
имплантации аутологичных клеток костного мозга, обработанных
эритропоэтином, в хирургии ишемической болезни сердца.**

3.1.15– сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д.м.н., профессор А.М.Чернявский

Новосибирск – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. НЕПРЯМАЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ МИОКАРДА С ПРИМЕНЕНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ХИРУРГИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	
1.1 ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ НЕПРЯМОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА.....	15
1.2 РОЛЬ НЕОАНГИОГЕНЕЗА В ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МИОКАРДА.....	28
1.3 КЛЕТКИ-КАНДИДАТЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СОСУДОВ.....	36
1.4 КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА	42
1.5 ПОВЫШЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА КЛЕТКИ.....	49
1.5.1 Эритропоэтин.....	51
1.6 СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ИШЕМИЗИРОВАННЫЙ МИОКАРД.....	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 ОБЩАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
2.1.1 Конечные точки исследования.....	61
2.1.2 Последовательность событий и методология исследования.....	61

2.1.3 Критерии включения и исключения.....	62
2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
2.2.1 Клиническое обследование.....	63
2.2.2 Инструментальное обследование.....	70
2.3 РАБОТА С КЛЕТОЧНЫМ МАТЕРИАЛОМ.....	79
2.4 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ.....	87

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРФУЗИИ МИОКАРДА ПО ДАННЫМ СЦИНТИГРАФИИ С ТЕХНЕТРИЛОМ. АНАЛИЗ ПЕРВИЧНОЙ КОНЕЧНОЙ ТОЧКИ.....	88
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

3.2 БЛИЖАЙШИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ МЕТОДА ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК КМ, ОБРАБОТАННЫХ ЭРИТРОПОЭТИНОМ, В ХИРУРГИИ ИБС.....	96
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

3.3 ДИНАМИКА ГЛОБАЛЬНОЙ И СЕГМЕНТАРНОЙ СОКРАТИМОСТИ ПО ДАННЫМ ЭХОКАРДИОГРАФИИ И ТКАНЕВОЙ ДОППЛЕРОГРАФИИ.....	104
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

3.4 ПАРАМЕТРЫ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МИОКАРДА ПО ДАННЫМ МРТ СЕРДЦА С КОНТРАСТИРОВАНИЕМ И ОФЭКТ С 123-I- MIBG.....	110
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	113
---------------------------------------------------------	------------

ВЫВОДЫ	122
---------------------	------------

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКШ – аортокоронарное шунтирование

ВГА – внутренняя грудная артерия

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

КА – коронарная артерия

КАГ – коронарная ангиография

КДО – конечный диастолический объём

КСО – конечный систолический объём

КШ – коронарное шунтирование

ЛЖ – левый желудочек

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

МНК – моноклеарные клетки

ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография

ОДП – общий дефект перфузии

ПДП – преходящий дефект перфузии

ПКА – правая коронарная артерия

ПДПОВ – преходящий дефект перфузии в области воздействия

ПНА – передняя нисходящая артерия

СДП – стабильный дефект перфузии

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТМЛР – трансмиокардиальная лазерная ревазуляризация

УО – ударный объём

ФВ – фракция выброса

ФК – функциональный класс

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭПО – эритропоэтин

ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки

ЭКГ – электрокардиография

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ЭХО КГ – эхокардиография

HIF-1 – транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией фактор 1

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

NYHA - нью-йоркская ассоциация сердца

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистая патология как в России, так и во всем мире занимает первое место в структуре заболеваемости и смертности населения, лидирующую позицию которой занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС). Согласно Российским Клиническим рекомендациям (Стабильная ишемическая болезнь сердца, 2020 г.) - ежегодная смертность россиян от ИБС составляет 27%.

На современном этапе хирургического лечения хронической ИБС сердца «золотым стандартом» является прямая реваскуляризация миокарда, а именно аортокоронарное шунтирование (АКШ). Однако, по мере накопления опыта стало ясно, что существует ряд сложностей, связанных с критическим поражением коронарного русла. Проблема критического (диффузного и/или дистального) поражения коронарных артерий (КА) у больных с ИБС составляет 25-30% всех нуждающихся в хирургическом лечении [1; 2; 3]. У пациентов, с таким поражением КА, ИБС протекает с тяжелой стенокардией, часто рефрактерной к медикаментозной терапии [4]. Не мало пациентов с КА малого диаметра (менее 1 мм), шунтирование которых не всегда возможно даже с применением такого высокотехнологичного устройства как операционный микроскоп. Традиционные методы реваскуляризации миокарда – коронарное шунтирование (КШ) и ангиопластика со стентированием в таких случаях неэффективны и зачастую сопряжены с высоким риском неблагоприятных кардиальных событий [5; 6]. Коронарные артерии остаются не оперированными, и проблема ИБС у пациента не решается.

В связи с неэффективностью общепризнанных методов лечения ИБС в случаях диффузного и/или дистального поражения КА, малого диаметра артерий, ранее перенесших прямую реваскуляризацию миокарда с неудовлетворительным результатом, большие надежды возлагаются на не прямые методы реваскуляризации, в том числе, клеточные технологии - имплантацию клеток аутологичного костного мозга (КМ) в миокард. Клеточная трансплантация является одним из самых обсуждаемых методов лечения поврежденной ткани миокарда. Несмотря на положительные результаты таких крупных исследований, как BOOST, REPAIR-AMI, TOPCARE-AMI, которые подтвердили выполнимость и безопасность процедур введения клеток костного мозга (ККМ), улучшение функции левого желудочка (ЛЖ), остается ряд вопросов и проблем, с которыми сталкивается клеточная терапия [7; 8]. Недостатком применения метода имплантации ККМ является их нестабильность и апоптоз [9]. Одним из вариантов повышения функционального статуса ККМ является их инкубирование с эритропоэтином.

В экспериментальных работах S. Brunner и соавт. (2009), M.R. Ward и соавт. (2008), D.G. Zhang и соавт. (2007), X.X. Zhonghua и соавт. (2006), E.R. Ergun и соавт. (2014 г.), было показано положительное влияние эритропоэтина на уменьшение размера миокарда, увеличение плотности капилляров, уменьшение зоны фиброза, уменьшение полости ЛЖ и улучшение сократимости миокарда на модели острого инфаркта миокарда (ИМ) крыс [10; 11; 12; 13]. Таким образом, имеются все предпосылки и основания для экспериментальной оценки и

последующего клинического внедрения метода интрамиокардиальной имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином, в хирургию ИБС как метода непрямой реваскуляризации миокарда.

Цель исследования

Клинико-функциональная оценка эффективности и безопасности применения интрамиокардиальной имплантации клеток аутологичного костного мозга, обработанных эритропоэтином, в хирургии ишемической болезни сердца.

Задачи

1. Оценить безопасность метода интрамиокардиальной имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином в ближайшем и отдаленном послеоперационных периодах.
2. Изучить перфузию миокарда по данным перфузионной сцинтиграфии с Технетрилом у пациентов с ИБС после интрамиокардиальной имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином в ближайшем и отдаленном послеоперационных периодах.
3. Оценить эффективность влияния метода интрамиокардиальной имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином у больных с ИБС на клинический статус в ближайшем и отдаленном послеоперационных периодах.
4. Исследовать изменения функции левого желудочка по данным Эхо-КГ, тканевой доплерографии у пациентов с ИБС после интрамиокардиальной

имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином в ближайшем и отдаленном послеоперационных периодах.

Научная новизна

Впервые:

- научно обоснована клиническая безопасность и эффективность применения метода интрамиокардиальной имплантации аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином, в хирургии ишемической болезни сердца.
- установлено положительное влияние интрамиокардиальной имплантации аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином, на клиническое течение заболевания, динамику функционального класса стенокардии, показателей теста 6-минутной ходьбы, перфузию и функциональное состояние миокарда в зоне непрямой реваскуляризации в хирургии ишемической болезни сердца.
- дана оценка перфузии и функционального состояния ЛЖ по данным перфузионной сцинтиграфии миокарда, ЭХО-КГ и тканевой доплерографии, МРТ с контрастированием после интрамиокардиального введения аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином в отдаленном периоде наблюдения.
- выполнен сравнительный анализ клинико-функциональных показателей и качества жизни у больных ИБС с применением метода интрамиокардиальной

имплантации аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином в сочетании с КШ и без использования клеточного продукта.

Практическая значимость

1. Технология применения метода интрамиокардиальной имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином, позволяет улучшить результаты хирургического лечения больных ИБС.
2. Использование методики непрямой реваскуляризации миокарда с помощью интрамиокардиального способа введения собственных ККМ, обработанных эритропоэтином, позволяет расширить пул «операбельных» больных с диффузным и/или дистальным поражением коронарного русла.
3. Для создания зон депо для введения аутологичных ККМ можно рекомендовать применение полупроводникового лазера, который позволяет формировать каналы для имплантации клеточного материала.

Положения, выносимые на защиту

1. Метод интрамиокардиальной имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином, является безопасным в хирургии ИБС при дистальном и/или диффузном поражении коронарного русла.
2. Применение аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином в хирургии ИБС, улучшает клиническое состояние пациентов в отдаленном периоде наблюдения.

3. Интрамиокардиальная трансплантация аутологичных клеток КМ, обработанных эритропоэтином, в хирургии ИБС, стимулирует процессы ангио- и васкулогенеза, что проявляется улучшением как общей, так и сегментарной перфузии по данным сцинтиграфии миокарда.

4. Метод интрамиокардиальной имплантации аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином, благоприятно влияет на глобальную и сегментарную сократимость миокарда левого желудочка по данным Эхо-КГ, тканевой доплерографии.

Достоверность выводов и рекомендаций

Достаточная мощность исследования (80%) и высокий методический уровень выполненной работы свидетельствуют о достоверности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе.

Личный вклад автора

Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

Автор принимал участие в отборе пациентов с ИБС с дистальным и/или диффузным поражением правой коронарной артерии, их предоперационном обследовании и проведении теста 6 минутной ходьбы. Кроме того, автор лично участвовал в операциях, проводил наблюдение и обследование пациентов в раннем и отдаленном послеоперационном периоде, вел необходимую электронную документацию, проводил анализ и интерпретацию полученных

результатов, опубликовал основные положения, выводы диссертации и практические рекомендации.

Личное участие автора в получении научных результатов, представленных в диссертации, подтверждается соавторством в публикациях по теме диссертации.

Апробация работы и публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 21 статьи, 13 из которых в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и WOS, 9 тезисов. Основные положения диссертации были представлены на следующих российских и зарубежных мероприятиях: Международном форуме «Биомедицина-2016» (Новосибирск, 2016 г.); XII Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (НЦ ССХ, Москва 2016); Международном биомедицинском конгрессе критических состояний (Москва, 2016); SBRAS-MOST симпозиуме (Тайвань, 2016); XXI Ежегодной сессии ННПЦССХ им. А.Н. Бакулева (21 - 23 Мая 2017); Международной конференции по ядерной кардиологии и компьютерной томографии сердца (Вена, Австрия, 2017); III национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 15-18.11.2017); III Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов (Москва, 2-4.10.2017); 27 съезде Всемирного сообщества кардиоторакальных хирургов (WSCTS, Астана, 1-3.09.2017); 18 Конгрессе Европейского сообщества трансплантологов (Барселона, 24-27.09.2017); IX Ежегодном съезде трансплантологов (17 - 19 сентября 2018, Москва); 67

международном конгрессе Европейского общества кардиоваскулярных хирургов (Страсбург, 12-14.04.2018); Всемирном конгрессе регенеративной медицины и стволовых клеток (7-9 декабря 2018, Сиань, Китай); V съезде специалистов по лучевой диагностике и лучевой терапии Сибирского Федерального Округа (20-22 сентября 2018, Иркутск); Международной научно-практической конференции «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» (20-21 ноября 2018, Новосибирск).

Объем и структура диссертации

Работа состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, 2-х глав собственного материала и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и содержит 10 таблиц и 15 рисунков.

Указатель использованной литературы содержит перечень из 52 отечественных и 71 зарубежных авторов.

ГЛАВА I

1.1 История развития непрямой реваскуляризации миокарда

Ишемическая болезнь сердца – заболевание, приводящее к сужению коронарных артерий вследствие развития атеросклероза: локальной аккумуляции в интима сосуда липидов, триглицеридов, крови и ее продуктов с последующим разрастанием фиброзной ткани, гиалинозом, кальцинозом и постепенным распространением процесса в медию артерии [14]. Сердечно-сосудистые заболевания, обусловленные атеросклерозом, и их осложнения являются основной причиной инвалидизации и смертности среди взрослых лиц в развитых странах мира, в том числе в России.

По определению комиссии Всемирной организации здравоохранения, ИБС представляет собой острую или хроническую дисфункцию, возникающую в результате абсолютного или относительного уменьшения снабжения миокарда артериальной кровью. Такая дисфункция чаще всего связана с патологическим процессом в системе коронарных артерий.

Коронарная хирургия включает в себя все вмешательства, направленные на улучшение кровоснабжения ишемизированного миокарда. Более ста лет назад во Франции появилась идея хирургического вмешательства при ИБС, которая изначально была направлена лишь на устранение главного синдрома самого заболевания – стенокардии (грудной жабы). Так начиналась история коронарной хирургии и совершенствовалась, пройдя путь от вмешательств в симпатическую нервную систему, перейдя к различным видам и техникам непрямой

реваскуляризации миокарда и, наконец, к прямой реваскуляризации миокарда, эндоваскулярным техникам, генной инженерии и до использования робот-ассистированных технологий.

Хирургическое лечение ИБС не теряет своей актуальности и на сегодняшний день стоит на первом месте среди болезней системы кровообращения и является одной из главных проблем во всем мире. Более того, по данным прогноза Р.А. Heidenreich и соавт. распространенность ИБС к 2030 г. увеличится на 9,3%, следовательно, коронарная хирургия останется неотъемлемой частью лечения данного заболевания [15].

1.1.1 Начальные этапы развития коронарной хирургии

В конце 19-го века С.Е. Francois-Frank впервые предпринял попытку устранить сердечные боли путем пересечения симпатических стволов на шее. В 1916 году Т. Jonnesco проводил удаление симпатических узлов. G.M. Fautet в 1946 году применял пересечение задних корешков спинного мозга в сочетании с периаортальной симпатэктомией коронарных артерий. Все подобные вмешательства основывались как минимум на трех принципах, реализуемых в ходе вмешательства: блокада передачи сосудосуживающих импульсов по вазомоторным нервам; перерыв в осуществлении кардиопрессорных рефлексов и снижение в результате этого работы миокарда; блокада эфферентных импульсов [16].

Недостаточный эффект таких методов привел хирургов к мысли, что причина возникновения боли при ИБС другая, и как следствие поиск принципиально новых способов ее устранения.

В 1935 году С. Векс осуществил операцию, направленную на создание слипчивого перикардита путем механической абразии в сочетании с вдуванием в полость перикарда порошка асбеста, иногда предваряя процедуру протиранием скарификационного перикарда и эпикарда 5 % раствором трихлоруксусной кислоты. Так возникла операция перикардокардиопексия или перикардиального припудривания (пудража). Улучшенную версию перикардиопексии предложил S. Thompson, заключающуюся в распылении в полости перикарда стерильного талька через небольшой внеплевральный доступ [16].

В разные годы хирурги распыляли не только тальк, но и асбест, костную муку, каолин, йод, эфир, спирт, мелкодисперсные порошки антибиотиков, даже металлические опилки [17].

Следует отметить, что в период с начала 60-х до начала 70-х годов в России в Москве наиболее часто выполняли операцию Fieschi-Thompson, сочетавшую перевязку внутренней грудной артерии с распылением талька в области перикарда [18].

Несмотря на неплохие ближайшие результаты после перикардиопексии, отдаленные последствия приводили к такому осложнению как сдавливающий сердце перикардит. В 1964 году категоричное высказывание В. И. Колесникова:

«Тотальный слипчивый перикардит не отвечает самой идее реваскуляризации миокарда...» поставило точку в применении данного метода [16; 17; 18].

В 1936 году L. O'Shaughnessy впервые подшил к поверхности обнаженного миокарда, страдавшего стенокардией 64-летнего пациента лоскут большого сальника на ножке. Так наступило время операции под названием оментокардиопексии, которая принесла ее автору мировую известность. Однако идея такого вида вмешательства возникла независимо и почти одновременно и у русского профессора Б. Кириллова. По его данным анастомозы между артериями сальника и коронарным руслом обнаруживали уже через 9 суток после вмешательства, и функционировали продолжительное время [17].

Хирург А. Letius первым выполнил операцию пневмокардиопексию, подшив к эпикарду близлежащее легкое. Помимо успешно выполненного хирургического вмешательства, он доказал наличие пульмонально-коронарных анастомозов, введя контрастное вещество в легочную артерию.

В дальнейшем операции органогистокардипексии приобретали самый неожиданный поворот, используя для реваскуляризации кожный лоскут, участок тонкой кишки, желудка, диафрагмы и даже селезенки, но со временем, чаще всего, это приводило к ухудшению сердечной деятельности из-за рубцового перерождения подшитой части органа или ткани.

В качестве метода стимуляции окольного кровообращения в миокарде в 1939 году D. Fieschi предложил операцию перевязки внутренних грудных

артерий (ВГА). Его эксперимент установил, что существуют коллатерали между ВГА и коронарным руслом.

В России впервые двухстороннюю перевязку ВГА при хронической коронарной недостаточности в 1958 году осуществил Василий Иванович Колесов. Но уже в 1960 году американские хирурги во главе с D.G. Dimond показали, что положительные результаты операции обусловлены эффектом «плацебо». Несмотря на это, операцию Fieschi-Thompson практиковали во многих странах, включая Россию еще некоторое время.

В 1941 году уже известный С. Веck развил идею редуцированного венозного кровотока. Суть заключалась в уменьшении венозного оттока и артериализацию венозной системы сердца. Так, операция «Веck-1» предполагала частичное суживание венечного синуса, в результате чего, по мнению автора, венозный отток уменьшался, артериальный кровоток оставался прежним, что впоследствии приводило к развитию коллатералей, плюс ко всему выполнялась кардиоперикардиопексия. Его гениальным решением было наложение анастомоза между аортой и коронарным синусом с помощью аутовенозного трансплантата (операция «Веck-2»). Однако смертность после такого оперативного вмешательства была крайне высока, и хирург был подвергнут критике [16]. В дальнейшем его мысль об использовании аутовенозного трансплантата сыграет одну из главных ролей в переходе от не прямой к прямой реваскуляризации миокарда.

Наивысшим достижением методов непрямой реваскуляризации стала операция А.М. Weinberg имплантация кровоточащей внутренней грудной артерии в миокард желудочков. Он считал, что строение интрамиокардиального сосудистого русла за счет разветвленной сети артериальных, мышечных, венозных синусов способно впитывать как губка большое количество поступающей в них крови без образования гематом (феномен Weinberg). В период с 1946 по 1958 год хирург выполнил более 1500 операций животным с успешными результатами. Первая операция, будучи полностью нетрудоспособному человеку, была выполнена им в 1950 году и спустя 3 года его пациент смог пройти 10 миль без остановки [19].

Также был разработан целый ряд различных модификаций этой операции: имплантация в миокард эпигастральной, межрёберной, селезеночной артерий, аутовенозного или нейлонового трансплантата, анастомозированного с грудной аортой [20].

Пионер коронарографии F. Sones в 1961 году выполнил селективную коронарографию прооперированным 5 пациентам, у двоих были обнаружены проходимые трансплантаты ВГА с развитой сетью коллатералей, питающих дистальное коронарное русло окклюзионных артерий [21].

Основой для развития современной коронарной хирургии стало применение техники сосудистого шва. Идея сшивания и трансплантации сосудов принадлежит А. Carrel, за что собственно он и удостоен Нобелевской премии. В 1910 году он разработал первую в истории медицины экспериментальную

модель аортокоронарных анастомозов [16]. Все эксперименты он выполнял на собаках. Хирург накладывал анастомозы между нисходящей аортой и КА, используя в качестве шунтов заранее забранную и законсервированную сонную артерию, взятую от другого животного, яремную вену и пластмассовые трубочки. Несмотря на то, что все животные погибали от остановки сердца, это стало отправной точкой к прямой реваскуляризации миокарда [16].

Профессор Е. Лехер впервые в качестве аутотрансплантата стал использовать большую подкожную вену бедра для замещения дефектов бедренных артерий. Таким образом он передал в руки хирургов универсальный пластический материал, который используется в настоящее время во всех стандартных операциях аутовенозного аортокоронарного шунтирования.

1953 год стал знаковым в коронарной хирургии. Независимо друг от друга наш соотечественник В.П. Демихов и канадец D.W.G. Murray сообщили об успешном наложении маммарно-коронарного анастомоза в эксперименте, однако не были применены в клинической практике. В 1953 г. J. Gibbon впервые выполнил операцию ушивания межпредсердного дефекта у 18-летней пациентки с использованием искусственного кровообращения [22].

Восстановление коронарного кровотока путем удаления атеросклеротической бляшки из просвета КА было впервые успешно выполнено в 1957 году американским хирургом С. Bailey.

Следующим этапом коронарной хирургии стала пластика коронарных артерий. Первую такую операцию выполнил I. Senning. В качестве заплат

хирурги применяли аутовену, аутоартерию, аотоперикард. Надо сказать, что с технической точки зрения эти вмешательства сложны и небезопасны, вопрос о целесообразности такого рода операций оставался открытым [16; 17].

Наконец, 2 мая 1960 года профессор R. Goetz впервые в мире сформировал прямой анастомоз между правой внутренней грудной артерией и правой коронарной артерией (ПКА) у 38-летнего больного [16]. Вторым в мире, кто выполнил успешное плановое наложение маммарно-коронарного анастомоза, стал наш соотечественник Василий Иванович Колесов [18].

Первую успешную операцию АКШ выполнил Michael DeBakey [23]. Так как эти хирурги не оценили данный метод реваскуляризации и не опубликовали о своих результатах, а лишь спустя некоторое время, когда аутовенозное АКШ стало набирать обороты, все лавры достались аргентинскому хирургу Rene Favaloro. В 1967 году он выполнил операцию АКШ, применив в качестве свободного трансплантата подкожную вену бедра [24].

Одним из основоположников маммарокоронарного шунтирования также считают американского хирурга G. Green [21]. В 1968 году он выполнил шовный анастомоз ВГА с передней нисходящей артерией, обобщил результаты операций с применением левой ВГА в группе из 165 пациентов, впервые применив микрохирургические технологии и операционный микроскоп. Именно он настоял на использовании микроскопа в коронарной хирургии. Это привело к тому, что в настоящее время очки-лупы или микроскоп являются обязательным атрибутом для хирурга при выполнении операции АКШ.

Знаковым стал 1964 год, когда В. И. Колесов выполнил первые успешные операции аутоартериального КШ, используя ВГА «на ножке» [24].

На сегодняшний день разработаны протоколы, стандарты выполнения операции коронарного шунтирования: с использованием аутоветвы и/или аутоартерии; с применением аппарата искусственного кровообращения и без; под микроскопом или в очках с увеличением; мини доступы или макси. Современное оборудование, инструментарий, огромный опыт кардиохирургов позволяют бороться с одним из самых распространённых заболеваний человечества – ИБС.

Однако, по мере накопления опыта стало ясным то, что существует значительная группа больных, для которых выбор методов прямой реваскуляризации ограничен. В 25-30% случаев диаметр коронарных артерий недостаточен для эффективного шунтирования. Кроме того, часть сосудов подвержена диффузным изменениям на всем протяжении, что делает их «нешунтабельными». К этой же группе относятся пациенты с диффузным поражением интрамуральных ветвей КА, а также пациенты, ранее перенесшие операцию прямой реваскуляризации миокарда с плохим результатом

Проблема хирургического лечения больных ИБС с диффузным поражением КА весьма актуальна. Диффузным поражением КА считаются гемодинамически значимые стенозы (обычно >70%) длиной более 2 см, множественные значимые стенозы одной и той же артерии или значимое сужение по всей длине артерии [25]. Прямая реваскуляризация таких артерий сопровождается высокой

летальностью и значительным числом осложнений. 39,2% таких больных умирает в течение 1-го года, у 37,2% возникает ИМ и еще у 5,8% развивается сердечная недостаточность. Согласно D. Kandzari и соавт. [26], 2-летняя летальность у этой категории больных составляет 37,2% и еще у 20% возникает острый ИМ.

По данным C.D. Rocha и соавт. 2/3 пациентов, у которых по причине диффузности поражения КА не было выполнено КШ – или умерли, или перенесли по крайней мере нефатальный ИМ в течение 12 месяцев.

Число больных с диффузным поражением коронарного русла среди кандидатов на КШ растет, и они представляют реальную проблему для кардиохирургии [4]. Именно эти предпосылки определили развитие альтернативных методов реваскуляризации миокарда таких, как трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация (ТМЛР) и клеточные технологии [27].

1.1.2 Начальные этапы развития трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации

Использование лазерных технологий для выполнения процедуры не прямой реваскуляризации миокарда широко распространено в настоящее время. Развитие методов ТМЛР основывалось на особенностях эволюции миокардиального кровообращения. Система кровообращения миокарда млекопитающих и человека сохранила некоторые черты кровообращения рептилий и более примитивных существ - через синусоиды. У человека

синусоидный тип кровоснабжения имеет место в эмбриональном периоде, затем в ходе онтогенеза он постепенно замещается на эпикардиально – коронарный.

Попытки воспроизвести «эмбрионизацию сердца» начались с 1957 года, в эксперименте с помощью имплантации Т-образных полиэтиленовых катетеров разработали технику создания сообщений между полостью ЛЖ и миокардом. Р. Sen и соавт. создавали трансмиокардиальные каналы методом акупунктуры. Исследовалась принципиальная возможность поступления оксигенированной крови из полости ЛЖ в ишемизированный миокард.

Ю.М. Ишенин разработал метод туннелизации миокарда с помощью тубусного скальпеля [28; 29]. А.Я. Кононов и В.Т. Зайцев предложили имплантировать в миокард протез микрососудов с последующей обработкой внутрестеночного туннеля лазерным излучением. К сожалению, клеточная инфильтрация в зоне повреждения, быстрое разрастание фиброзной ткани и образование рубцов способствовали закрытию каналов, все это было обусловлено механической травмой [27].

В 1969 году появилась возможность для использования лазера [30]. Наиболее вероятным механизмом лазерной реваскуляризации миокарда считается лазерноиндуцированный ангиогенез, в зоне рубца на месте бывшего лазерного канала и в миокарде, прилегающем к области воздействия. Образование мелких артериол, капилляров и сосудов синусоидного типов в трансмиокардиальном рубце, и увеличение плотности сосудов в прилегающем миокарде, подтверждается результатами экспериментальных и клинических

испытаний. Формирование новых сосудов в зоне рубца и в миокарде сопровождается увеличением ростовых и ангиогенных факторов. Проще говоря, механизм действия лазера заключается в создании соустьев между лазерными каналами и полость ЛЖ из которого поступает оксигенированная кровь из ЛЖ к миокарду.

Экспериментальные работы различных авторов, описывающие формирование микрососудистых сплетений в области трансмиокардиального рубца, подтверждают теорию о стимуляции неоангиогенеза в зоне воздействия лазерного луча и, вследствие этого, улучшение перфузии ишемизированных зон миокарда [27].

На симпозиуме VII ежегодной конференции в Барселоне (1993 г.) ТМЛР получила окончательное признание как альтернативный метод реваскуляризации миокарда [28].

Эффективность данного метода также была подтверждена многоцентровым сравнительным исследованием, проведенным в 1996 году в США под руководством D.A. Cooley [31]. Исследованию были подвергнуты более 200 больных пожилого возраста, ранее оперированных. Результаты позволили сделать однозначный вывод о том, что ТМЛР способна снизить проявления коронарной болезни.

В 1996 году Т. Komoto и Р. Fischer использовали технику чрескожной трансартериальной катетеризации сердца для реваскуляризации зоны острой

ИМ. Эта методика получила название «эндокардиальная катетерная лазерная реваскуляризация миокарда» [32; 33].

На сегодняшний день наиболее вероятными механизмами лазерной реваскуляризации миокарда считается лазерноиндуцированный ангиогенез с улучшением регионального миокардиального кровотока и лазерноиндуцированная денервация миокарда вследствие деструкции миокардиальных нервных окончаний и эфферентных нервных путей, со снижением класса стенокардии, но без улучшения миокардиальной перфузии [34]. Образование мелких артериол капилляров и сосудов синусоидного типов в трансмиокардиальном рубце, и увеличение плотности сосудов в прилегающем миокарде, подтверждается результатами экспериментальных и клинических испытаний [34]. Формирование новых сосудов в зоне рубца и в миокарде сопровождается увеличением ростовых и ангиогенных факторов.

В 2008 году А.В. Фомичевым с соавт. была проведена оценка метода ТМЛР в сочетании с имплантацией моноклеарной фракции аутологичных ККМ в хирургии ИБС [27]. Исследование проводилось 51 пациенту с диффузным и/или дистальным поражением коронарного русла, 35 пациентам из которых выполнили ТМЛР в сочетании с имплантацией моноклеарной фракции аутологичного КМ во время операции АКШ, оставшимся 28 пациентам выполнили только АКШ. В ходе исследования установили, что ТМЛР в сочетании с имплантацией стволовых клеток является безопасной и эффективной процедурой. Улучшение клинического состояния проявлялось в

статистически достоверном снижении функционального класса (ФК) хронической сердечной недостаточности (ХСН) по NYHA (Нью-Йоркской ассоциации кардиологов) с 2,57-0,55 до 1,76-0,74, ФК 52 [27; 35], стенокардии напряжения с 2,8-0,7 до 0,23-0,4 при менее выраженном снижении этих показателей в группе контроля. При сравнении динамики ФК сердечной недостаточности в основной и контрольной группах авторы отмечали, что при сопоставимых исходных показателях в отдаленном периоде отмечается более выраженное снижение ФК (NYHA) в I группе ($p=0,009$). Данный метод способствует улучшению перфузии миокарда, что подтверждается данными радиоизотопного исследования миокарда и проведенными морфологическими исследованиями, которые выявили в местах воздействия неоваскуляризацию, способствует улучшению сегментарной сократимости ЛЖ, улучшает клиническое состояние пациентов в отдаленном периоде [27; 35].

Следует отметить, что применение ТМЛР само по себе является методом не прямой реваскуляризации миокарда, и использование моноклеарных клеток аутологичного КМ дает еще более улучшенный результат [27].

1.2 Роль неоангиогенеза в ишемическом повреждении миокарда

В основе ИБС лежит коронарная недостаточность, которой способствует действие любых органических или функциональных факторов, вызывающих либо прямое ограничение коронарного кровотока и снижение перфузионного давления в коронарной системе, либо значительное увеличение потребности

миокарда в кислороде, которое не сопровождается адекватным увеличением коронарного кровотока [36].

Снижение кровоснабжения миокарда и развитие ишемических повреждений ЛЖ приводят к функциональным и морфологическим изменениям в сердечной мышце, напрямую связанных с течением и прогнозом развития заболевания [36]. Наиболее значимыми последствиями ИБС являются снижение энергетического обеспечения кардиомиоцитов, «гибернация» и «оглушение» миокарда, кардиосклероз, диастолическая и систолическая дисфункция ЛЖ, а также нарушения ритма сердца.

Хроническое нарушение коронарного кровотока не всегда приводит к гибели кардиомиоцитов, часто можно наблюдать такие феномены как гибернация «спячка» и «оглушение» миокарда. Гибернирующий («спящий») миокард – это локальное снижение сократительной способности миокарда ЛЖ, вызванное его длительной гипоперфузией, которое полностью или частично исчезает после улучшения коронарного кровотока. Этот синдром характеризуется следующими особенностями: коронарный кровоток хронически снижен; отмечается хроническое нарушение сократительной функции миокарда в участках со сниженным миокардиальным кровотоком; жизнеспособность миокарда сохранена; продолжительность состояния гибернации от нескольких дней до нескольких месяцев и даже лет [36; 37]. Функция миокарда снижается, благодаря чему достигается равновесие между потребностью миокарда в кислороде и доставкой его с кровью. Описаны особенности метаболизма в

миокарде при его гибернации. Вначале (приблизительно через первые 10 мин после развития ишемии) в клетках миокарда снижается содержание АТФ и креатинфосфата, кардиомиоциты переходят на анаэробный метаболизм, при этом в миокарде накапливается молочная кислота. При продолжающемся ограничении коронарного кровотока примерно через час анаэробный метаболизм постепенно уменьшается и прекращается, уровень креатинфосфата восстанавливается, а содержание АТФ далее прогрессивно не снижается. Гибернация миокарда выявляется у 25-80% больных ИБС. Этот синдром может быть причиной рефрактерности к лечебным мероприятиям при сердечной недостаточности.

«Оглушенный» миокард – это состояние, которое сохраняется после реперфузии миокарда несмотря на восстановление коронарного кровотока и отсутствие необратимых изменений в миокарде. Этот феномен может развиваться у больных с нестабильной стенокардией; при раннем применении тромболитиков в остром периоде инфаркта миокарда; при хранении донорского сердца перед его трансплантацией; при наложении дистальных анастомозов во время аортокоронарного шунтирования. Патогенез этого состояния до конца не выяснен. В настоящее время существуют две популярные гипотезы, объясняющие механизм возникновения этого феномена: «кальциевая» гипотеза и «свободнорадикальная» гипотеза. Согласно «кальциевой» гипотезе имеют значение следующие механизмы: снижение чувствительности миокардиальных волокон к кальцию; перегрузка клеток миокарда кальцием; разобщение

процессов возбуждения и сокращения вследствие нарушения функции саркоплазматического ретикулума; активация протеинкиназ, фосфолипаз и других катаболических ферментов. В соответствии со свободнорадикальной гипотезой «оглушение» миокарда вызывают свободные радикалы, образующиеся в начале реперфузии [36; 37].

«Гибернирующий» и «оглушенный» миокард возможно восстановить полностью путем реваскуляризации миокарда в этих зонах.

1.2.1 Неоангиогенез в норме и при ишемической болезни сердца.

Неоангиогенез (образование новой сосудистой сети) – это многоступенчатый процесс, в котором взаимодействуют несколько типов клеток и медиаторов, и который происходит в пролиферирующих, поврежденных или ишемических тканях [38]. Термин потенциально включает в себя все элементы классической схемы новообразования сосудов: ангиогенез (образование новых кровеносных сосудов из предсуществующих капилляров посредством миграции и пролиферации зрелых эндотелиальных клеток), артериогенез (ремоделирование сосудистого русла) и васкулогенез (формирование первичного сосудистого сплетения *in situ* из клеток предшественников) в постнатальном периоде [34; 39; 40; 41].

Ангиогенез - образование новых капилляров от посткапиллярных венул, который осуществляется через активацию эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), экспрессию в них протеаз, деградацию внеклеточного матрикса, пролиферацию и миграцию этих клеток, образование ими

первичных высокопроницаемых сосудистых структур, последующую стабилизацию и "взросление" этих структур за счет привлечения перицитов и гладкомышечных клеток и организации их в сложную трехмерную сосудистую сеть [35]. Физиологический ангиогенез – это реакция ткани на гормональную стимуляцию (ангиогенез в репродуктивной системе) или изменения в окружающей среде (в ответ на ишемию ткань может расширять сосудистую сеть) [42].

Ангиогенез в основном обуславливается воспалительной реакцией и ишемией ткани. Тканевая гипоксия выступает основным инициатором ангиогенеза. В результате вазодилатации улучшается кровоснабжение. При этом возникают новые микрососуды из существующих с участием эндотелиоцитов. Вместе с тем у вновь образованных капилляров отсутствует полноценная медиа, что ведет к увеличению проницаемости стенки сосуда и снижению его вазомоторных свойств.

Белок гипоксией индуцирующего фактора (HIF-1) участвует в физиологической адаптации к гипоксии двумя путями. Первый путь активируя различные гены, такие как регуляторы ангиогенеза (VEGF-A, ангиопоэтин-2), эритропоэза (эритропоэтин), тонуса сосудов (гемоксигеназа-1) и обмена железа (трансферрин), что способствует лучшему снабжению тканей кислородом второй путь, индуцируя HIF-1-зависимую генетическую регуляцию процессов, которые осуществляют адаптацию, и выживание клеток в условиях гипоксии [43; 44].

1.2.2 Факторы роста в стимуляции ангиогенеза, хоуминг.

Стимулируют рост сосудов семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), близкие к нему плацентарные факторы роста (PlGF- 1,2), основной фактор роста фибробластов (FGF-2), ангиопоэтины (ANGPT-1,2), интерлейкин-8 (IL-8), тромбоцитарные факторы роста (PDGF), трансформирующий фактор роста-бета (TGF-бета) и другие [45].

Большое значение в регуляции ангиогенеза играет фактор роста эндотелия сосудов или сосудистый эндотелиально-клеточный фактор роста VEGF (Vascular endothelial growth factor) и его рецепторы. Семейство молекул VEGF включает несколько факторов: VEGF-A, -B, -C, -D, -E, VEGF-A, -B и PlGF из которых основные регуляторы роста кровеносных сосудов [46; 47]. VEGF-A, также называемый VEGF, является одним из наиболее хорошо изученных факторов ангиогенеза. VEGF стимулирует пролиферацию клеток эндотелия сосудов, изолированных из артерий, вен и лимфатических сосудов *in vitro* [48]. На многих моделях показано активирующее действие VEGF на ангиогенез *in vivo* [46]. VEGF-A способствует выживанию клеток эндотелия *in vitro* и *in vivo*. VEGF активирует экспрессию оксида азота, простациклина и других цитокинов, что способствует вазодилатации и стимуляции образования металлопротеаз, разрушающих связи между эндотелиальными клетками и внеклеточным матриксом, тем самым, принимает участие в миграции клеток [49].

VEGF-A является сильным митогеном для эндотелиальных клеток, но он не вызывает пролиферацию других типов клеток [50]. Кроме того, VEGF,

подавляя апоптоз, стимулирует выживаемость эндотелиальных клеток, играет важную роль в мобилизации и миграции предшественников эндотелиоцитов из костного мозга в очаги ангиогенеза, а также увеличивает сосудистую проницаемость, ингибирует дифференциацию дендритных клеток, потенцирует транспорт гексоз в эндотелиоциты, активирует тканевые факторы и миграцию моноцитов [51].

Хоуминг представляет собой процесс перемещения циркулирующих клеток к тканям-мишеням (например, в сердце после ИМ) или в КМ. Рекрутирование стволовых клеток в очаг ишемии имеет сходство с воспалительным ответом. Прогениторные клетки взаимодействуют с поврежденным монослоем эндотелия подобно тому, как лейкоциты взаимодействуют с активированными эндотелиальными клетками [52].

Молекулы адгезии, вовлеченные в движение и адгезию лейкоцитов, идентифицированы как ключевые регуляторы хоуминга ЭПК. Начальная стадия хоуминга прогениторных клеток в ишемическую ткань включает адгезию прогениторных клеток к эндотелиальным клеткам и трансмиграцию через эндотелиальный монослой, обусловленную интегринами [53]. Селектины (P-selectin, E-selectin) обуславливают начальный процесс, интегрин (b2-integrins), молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1) способствуют адгезии и миграции ЭПК к поврежденному эндотелиальному монослою, катепсины (cathepsin L) и металлопротеиназы (ММР-2) способствуют деградации матрикса и инвазии ЭПК [40]. Данные о миграции в очаг ишемии (хоуминг), дифференцировке и участии

в ангиогенезе были получены на основании экспериментов *in vitro* [54]. Предполагается, что *in vivo* стволовые клетки, особенно мезенхимальные стволовые клетки (МСК), также могут мигрировать в поврежденные и воспаленные ткани из кровотока и оказывать терапевтический эффект [55]. Имплантированные МСК под воздействием микроокружения могут дифференцироваться по крайней мере в 3 типа клеток [56]: 1) тканеспецифические клетки поврежденной ткани, например, в кардиомиоциты, гладкомышечные клетки и сосудистые эндотелиальные клетки; 2) функционально родственные клетки, которые нужны для соответствующей ткани организма-хозяина. Такой тип дифференцировки, возможно, принимает участие в создании особого микроокружения для тканевой репарации; 3) регуляторные клетки, которые участвуют в восстановлении и регенерации тканей через секрецию цитокинов с трофической и иммуномодуляторной активностью. Механизмы, которые контролируют процесс дифференцировки МСК в различные типы клеток еще плохо изучены. Воздействие микроокружения в разных тканях еще более усложняет этот процесс. Некоторые гипотезы предполагают, что гены или особые белки, содержащиеся в МСК, активируются под воздействием окружающей микросреды, что определяет в конечном итоге результат дифференцировки [57].

1.3 КЛЕТКИ-КАНДИДАТЫ ДЛЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ СОСУДОВ

Впервые термин «стволовая клетка» был введен в 1908 году Максимовым. Он обнаружил группы клеток, которые при делении обладают разными свойствами: одна из них трансформируется в ту или иную клетку периферической крови, другая продолжает делиться [58].

Забор стволовых клеток может производиться из КМ, периферической крови, пуповинной крови, жировой ткани и др.

Периферическая кровь (после мобилизации стволовых клеток из КМ колониестимулирующими факторами) в значительной степени заменила КМ как источник стволовых клеток, особенно при аутотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), поскольку проводить забор стволовых клеток легче, а восстановление уровня нейтрофилов и тромбоцитов происходит быстрее. Трансплантация ГСК пуповинной крови зачастую используется только у детей, поскольку для взрослого человека в ней слишком мало стволовых клеток. Потенциальным будущим источником стволовых клеток являются плюрипотентные стволовые клетки (определенные клетки, взятые у взрослых и перепрограммированные, чтобы действовать как стволовые клетки) [58].

Технология использования ГСК, выделенных из пуповинной крови, в стадии отработки, находится в зачаточном состоянии, но набирает интерес. Пуповинная кровь характеризуется высоким содержанием стволовых кроветворных клеток. Именно наличие в ней стволовых клеток делает

пуповинную кровь ценнейшим биологическим материалом современности. Наибольшее значение стволовые клетки играют в воссоздании новых клеток крови (гематопротениторная способность) и специализированных клеток тканей организма. Стволовая клетка может стать практически любой клеткой в человеческом организме [58].

КМ состоит из сложной и гетерогенной смеси различных типов клеток. В его состав входят взаимодействующие строма и кроветворная система. Кроветворная система включает в себя кроветворные (гемопоэтические) стволовые и протениторные клетки (клетки-предшественники), которые дают начало различным клеткам крови и иммунной системы. Строма костного мозга содержит мезенхимальные стволовые клетки и мультипотентные взрослые клетки предшественники [59].

Стволовые клетки характеризуются уникальным транскриптом и совокупностью компонентов генетической и эпигенетической систем, которые позволяют им поддерживать самообновление, т.е. оставаться стволовыми клетками, а также сохранять способность к дифференцировке в различные клеточные производные [60].

Условно стволовые клетки делят на гемопоэтические (производящие клеточные элементы крови) CD34⁺ CD133⁺, способные пролиферировать и дифференцироваться в элементы крови, мононуклеарные (одноядерные) к ним относят моноциты и лимфоциты, эндотелиальные, мезенхимальные (или стромальные) CD35⁺, способные трансформироваться в

высокодифференцированные органоспецифические клетки, такие как адипоциты, хондроциты, теноциты, гепатоциты, миоциты, эндотелиальные клетки [61].

Гемопоэтическая стволовая клетка (гемопоэтическая фракция костного мозга CD34+) – это недифференцированная клетка, способная к самовоспроизведению и дифференцировке в любую клетку крови и иммунной системы [58]. Большинство гемопоэтических клеток-предшественников находятся в костном мозге, поэтому КМ является традиционным источником этих клеток для трансплантации. ГСК являются главным источником ЭПК, но они также могут вырабатываться и МСК костного мозга в связи с тем, что CD14+ миелоидные субпопуляции экспрессируют в гемопоэтические, и эндотелиальные рецепторы, CD14+ моноциты способны дифференцироваться в эндотелиальные клетки.

Эндотелиальные стволовые клетки по аналогии с другими клетками-предшественниками являются специфичными для определенного клеточного ряда и включают крайне разнородную популяцию, способную дифференцироваться исключительно в эндотелиальные клетки [62].

Клетки данного вида локализуются в КМ, являются унипотентными клетками (дифференцируются только в клетки эндотелия сосудов) и под действием определенных биоактивных молекул (VEGF) выводятся в кровоток, мигрируют к месту повреждения и способствуют неоангиогенезу [63].

Эндотелиальные стволовые клетки находятся в нише стволовых клеток с низким напряжением кислорода. В ответ на повреждение или ишемию периферических тканей происходят выход ЭПК из КМ в кровь и их миграция в область повреждения. Поступление ЭПК в зону повреждения представляет собой сложный скоординированный многоступенчатый процесс, включающий в себя мобилизацию, хемотаксис, адгезию, трансэндотелиальную миграцию и дифференцировку клеток с участием факторов роста, хемокинов и молекул адгезии [64].

В настоящее время ЭПК рассматривают в качестве нового маркера сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). В связи с непрямым защитным эффектом ЭПК на сердечно-сосудистую систему, истощение пула этих клеток приводит к развитию ССЗ, в том числе у пациентов с сахарным диабетом [65]. Они также являются предиктором развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Накоплены данные о том, что сниженное количество ЭПК связано с возникновением неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ИБС. Уровень циркулирующих ЭПК является прогностическим фактором развития повторного ИМ, прогрессирования атеросклероза, сердечно-сосудистой смертности [53; 66].

N. Werner и соавт. в своем исследовании определяли количество CD34+KDR+ клеток у 519 пациентов с ангиографически подтвержденной ИБС [66]. Через 12 месяцев наблюдения была проанализирована связь между исходным уровнем ЭПК и неблагоприятными сердечно-сосудистыми исходами.

Результаты исследования показали, что более высокое содержание ЭПК в периферической крови ассоциируется с низким риском сердечно-сосудистой смерти. Эти данные подкреплены и другим исследованием, в котором обнаружено, что снижение количества ЭПК связано с высокой частотой развития сердечно-сосудистых событий и является предиктором неблагоприятного прогноза, независимо от традиционных факторов риска и активности заболевания. В исследовании S. Schwartzberg и соавт. сообщается, что уровень CD34+CD133+ клеток прогнозирует развитие неблагоприятных кардиоваскулярных исходов в течение двухлетнего наблюдения у больных с ОКС, перенесших стентирование коронарных артерий [53].

В других исследованиях также было показано, что снижение циркулирующих ЭПК и нарушение миграционной активности клеток прогнозирует развитие неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после перенесенного ИМ. С целью улучшения стратификации сердечно-сосудистого риска с использованием количества ЭПК G.P Fadini и соавт. (2010г.) провели мета-анализ, объединяющий данные четырех многолетних исследований [67]. В исследование включено 1057 пациентов с измеренным уровнем ЭПК. ЭПК определялись как CD34+ ± KDR+. Оценивались основные вопросы патогенеза неблагоприятные сердечно-сосудистые события, такие как сердечно-сосудистая смерть, нефатальный ИМ, госпитализация по поводу нестабильной стенокардии или застойной сердечной недостаточности, реваскуляризация коронарных или периферических артерий, ангиографически подтвержденный рестеноз после

реваскуляризации миокарда, ампутация нижних конечностей, инсульт или транзиторная ишемическая атака. Время наблюдения составило $1,7 \pm 1,1$ лет. За время наблюдения зарегистрировано 48 случаев сердечно-сосудистой смерти, 19 не фатального ИМ и 245 других сердечно-сосудистых событий. Результаты исследования показали, что количество ЭПК позволяет прогнозировать развитие неблагоприятных исходов в будущем и является достоверным предиктором развития сердечно-сосудистых катастроф, в среднем на 1,7 лет. Таким образом, результаты проведенных исследований доказывают, что циркулирующие ЭПК могут быть использованы в качестве биомаркера сердечно-сосудистого риска, а также для прогноза прогрессирования атеросклероза, развития сердечно-сосудистых событий, независимо от других традиционных факторов риска.

Таким образом, ЭПК представляют собой популяцию клеток, участвующих в процессах восстановления и поддержания стабильности эндотелия, а также образовании новых сосудов.

Мезенхимальные стволовые клетки обнаружены в 70-х годах и на сегодняшний день являются широко изученным типом стволовых клеток, применяемым для восстановления сердца [68]. Помимо того, что МСК присутствуют практически во всех тканях организма (КМ, периферическая кровь, жировая ткань, пуповинная кровь, плацента) [69], они могут дифференцироваться в различные типы клеток [70], а также считаются гипоиммуногенными [71] и обладают высоким паракринным эффектом.

Многочисленные исследования продемонстрировали, что МСК могут выделять ангиогенные цитокины, такие как фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов и SDF-1 α белок, которые способствуют ангиогенезу в ишемизированном миокарде [72].

Для получения МСК наиболее часто используется КМ [73], хотя в нем они представляют очень малую фракцию от общей популяции ядерных клеток КМ (0,001%-0,01%).

1.4 Клеточная терапия у больных с ишемической болезнью сердца.

Сердце взрослого человека обладает ограниченной способностью к регенерации по сравнению с другими органами, такими как скелетная мускулатура, печень, кожа, кости и т.д. В норме митотический индекс для миокарда человека составляет 11 делящихся кардиомиоцитов на 1 миллион клеток или 59 000 делящихся клеток в ЛЖ [74].

В экспериментальных исследованиях на животных было показано, что ИМ приводит к усилению пролиферативной активности кардиомиоцитов в периинфарктной зоне [74; 75]. Увеличение пролиферативной активности кардиомиоцитов найдено и в миокарде людей, умерших через 4–12 дней после перенесенного ИМ [75]. В периинфарктной зоне митотический индекс составлял 800 митотических клеток на миллион, в межжелудочковой перегородке – 300, а в миокарде контрольной группы – 11 [75]. К сожалению, в очаге некроза делятся главным образом фибробласты, которые устойчивы к гипоксии, поэтому на месте инфаркта формируется рубец, а не здоровый миокард.

P.C. Hsieh и соавт., показали, что регенерация сердца млекопитающих происходит за счет пролиферации и дифференцировки стволовых клеток или резидентных клеток-предшественников кардиомиоцитов, а не за счет митотического деления полностью дифференцированных кардиомиоцитов [76]. Несмотря на доказанное существование резидентных клеток-предшественников кардиомиоцитов, собственной регенеративной активности сердца недостаточно для полного восстановления структуры и сократительной функции поврежденного органа после ИМ. Трансплантация стволовых клеток (СК) является наиболее многообещающим методом восстановления структуры и функции сердечной мышцы после ИМ [77].

Клеточная терапия – это клиническое направление, основанное на введении в организм пациента аутологичных, аллогенных, ксеногенных живых клеток, которые предварительно подверглись модифицированию, обработке и/или прекондиционированию *ex vivo*, для направленного терапевтического эффекта, с целью восстановления, улучшения, приобретения утраченной функции органа или ткани [78].

В 1999 году впервые получили кардиомиогенную клеточную линию из мышечных клеток стромы костного мозга [79].

В 2001-2002 гг. сделаны первые попытки лечения ССЗ у людей с помощью аутологичных ККМ. Наиболее приемлемым источником клеток для целей трансплантации является аутологичный КМ, в котором имеется значительное количество ГСК и МСК. Ранее в экспериментах на животных было показано, что

ГСК обладают свойством пластичности, обеспечивающее им трансдифференцировку в кардиомиогенном направлении при попадании в специфическое микроокружение [35]. Однако рядом авторов это утверждение было опровергнуто: была показана возможность слияния ГСК с взрослыми кардиомиоцитами и образования химерных клеток; при этом у исследователя создается впечатление, что ГСК трансдифференцируются в кардиомиоциты [80].

Клеточная кардиомиопластика – это все методики клеточной терапии в кардиологии, будь это пересадка в миокард кардиомиоцитов, гладкомышечных клеток, генно-модифицированных клеток (фибробласты, скелетные миобласты), ККМ или целенаправленная экспрессия регуляторных генов клеточного цикла кардиомиоцитов и другие высокотехнологичные методы клеточной терапии, призваны изменить процессы структурно-функциональной перестройки миокарда (ремоделирования сердца) и в конечном счете улучшить его функцию.

Наиболее перспективным направлением является трансплантация прекультивированных МСК аутологичного КМ [81; 82; 83]. Основные преимущества аутологичной терапии стволовыми клетками связаны с иммуногенностью и этическими проблемами. Поскольку эти клетки будут трансплантированы обратно тому же пациенту, у которого они получены, не должно быть иммунного отторжения, такого как у аллогенных имплантатов. Также эти клетки-предшественники выделены из тканей взрослого человека и не происходят из тканей плода, они не сталкиваются с серьезными выявленными этическими проблемами. С другой стороны, клеточная терапия

все еще сталкивается с рядом ограничений. После выделения популяция клеток часто является гетерогенной, что может приводить к различным ответам. Для получения большого числа клеток, необходимых для трансплантации, часто требуется экспансия клеток *ex vivo*, что приводит к проблемам регулирования и увеличению стоимости и времени, тем самым увеличивая барьеры для клинического перевода. Кроме того, эффективность трансплантации клеток, как правило, очень низкая при трансплантации и может вызывать воспалительные реакции. Тем не менее, в клинике с успехом прошли клеточные методы лечения [67; 84].

В настоящий момент существуют 4 механизма действия стволовых клеток на регенерацию миокарда:

1. Прямая клеточная трансдифференцировка из стволовых клеток КМ в кардиомиоциты [85];
2. Паракринный механизм (путем секреции введенными клетками цитокинов и ростовых факторов [86], плюс увеличение остаточных; жизнеспособных миоцитов особенно в пограничной зоне инфаркта);
3. Стимулирование внутренних миокардиальных стволовых клеток (эндогенные стволовые клетки) [87];
4. Индукция клеточного слияния между трансплантированными стволовыми клетками костного мозга и собственными миоцитами [88].

На сегодняшний день в мировых изданиях опубликовано множество результатов с использованием клеточных технологий в терапии острого ИМ,

ХСН, ишемической кардиомиопатии и ряда других патологий сердечно-сосудистого профиля.

К. Naitano и соавт. в 2001 г. впервые доказали, что интрамиокардиальное введение аутологичных моноклеарных ККМ улучшает перфузию миокарда путем стимуляции неоангиогенеза [71]. Интрамиокардиальную инъекцию стволовых ККМ выполняли вовремя КШ. Через 1 год после оперативного вмешательства проводилась оценка результатов с использованием перфузионной однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) миокарда, при этом у 3 из 5 пациентов было отмечено значительное улучшение перфузии в зоне кровоснабжения артерии, которая не была шунтирована [71].

Далее последовало ряд исследований, которые также доказали эффективность клеточной терапии путем введения ККМ [7; 8; 83].

В.И. Шумаков и соавт. впервые в России было выполнено клиническое исследование трансплантации МСК больным с ХСН в 2003 году. В исследование было включено 8 пациентов с проявлениями сердечной недостаточности, 6 из которых было выполнено интракоронарное введение МСК, 2 больным – интрамуральное, в зону постинфарктного кардиосклероза. В трех случаях МСК были помечены Таллием-201. По результатам радиоизотопной сцинтиграфии выявлено, что через 1,5 часа после интракоронарного введения и через 6,5 часов после интрамиокардиального способа доставки, МСК остаются в зоне введения. Через месяц после трансплантации МСК получено улучшение регионарной

перфузии, диастолической функции миокарда, а также улучшают функциональные показатели сократительной функции миокарда, толерантность к физической нагрузке, качество жизни пациентов с ХСН [90].

В 2005 году Л.А. Бокерия и соавт. опубликовали свои результаты интракоронарного введения мононуклеарных ККМ у больных с сердечной недостаточностью на фоне ИБС. Авторы показали, что терапия ККМ у таких больных является безопасным методом, приводит к улучшению качества жизни пациентов, приводит к улучшению перфузии и региональной сократимости миокарда ЛЖ, снижению ФК сердечной недостаточности [91]. В 2020 они показали, что изолированная ТМЛР в сочетании с интрамиокардиальной инъекцией аутологичных стволовых ККМ является безопасным методом, позволяющим достичь статистически значимого антиангинального эффекта и снизить потребность в "нитратах", что в свою очередь улучшает качество жизни и снижает частоту госпитализаций по поводу ИБС [92].

S. Veeres и соавт. (2006 г.) сообщили, что после интрамиокардиального введения мононуклеарных ККМ, у пациентов с хронической ИБС, рефрактерной к медикаментозной терапии, было значимое уменьшение выраженности симптомов стенокардии и улучшение сократительной функции миокарда ЛЖ, а также улучшение перфузии миокарда [93].

С 2009 по 2013 год российскими учеными из НИИ кардиологии (г. Томск) было продемонстрировано улучшение коронарной микроциркуляции и

уменьшение размеров дефектов перфузии после введения ККМ в инфаркт-связанную артерию [94].

В 2016 году Е.Н. Кливер и соавт. провели исследование эффективности эндомиокардиальной клеточной кардиомиопластики у больных с ИБС. Результатами исследования установлено, что в сравнении с больными получавшими только медикаментозную терапию, включение в комплекс лечения метода эндомиокардиальной имплантации моноклеарной фракции аутологичных ККМ способствует улучшению клинико-функционального статуса больных с ишемической дисфункцией ЛЖ и улучшению сократительной функции миокарда, что проявляется приростом фракции выброса (ФВ) ЛЖ, уменьшением его объемных показателей, а также улучшением практически всех аспектов качества жизни в отдаленном периоде наблюдения [27].

С. М. Wang и соавт. провели мета-анализ до 2017 года, в который входило 24 исследования с внутрикоронарным способом введения моноклеарных ККМ у пациентов с ИМ с подъемом сегмента ST. Они сделали вывод, что клеточная терапия не только безопасна для данной группы пациентов, но и уменьшает размер инфаркта, улучшает перфузию миокарда [95].

Однако существуют и противоречивые данные об эффективности клеточной терапии в лечении хронической ИБС и застойной сердечной недостаточности. S.A. Fisher и соавт. провели мета-анализ до 2015 года в который входило 38 рандомизированных контролируемых исследований.

Результаты показали, что лечение ККМ способствует снижению сердечных приступов и аритмий по сравнению с теми, кто не получал клеток. Клеточная терапия, не снижает риск повторной госпитализации, связанной с сердечной недостаточностью и не приводит к каким-либо улучшениям по сравнению со стандартным лечением, это может быть связано с краткосрочным эффектом [96].

Несмотря на некоторые положительные результаты применения ККМ в качестве стимуляции ангиогенеза, существует ряд нерешенных задач, таких как выживаемость клеток, вариабельность выбора популяции клеток, способы их доставки в поврежденный участок миокарда, зрелость ККМ и другое.

1.5 ПОВЫШЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА КЛЕТКИ

Эффективность применения стволовых клеток зависит от популяционного состава и функциональной активности клеточного трансплантата, а функциональная активность клеточного трансплантата, в свою очередь, зависит от микроокружения, в которое они попадают. В частности, окислительный стресс, который значительно снижает жизнеспособность клеток [97; 98]. Для этого необходимо повышать функциональный статус клетки.

Одними из самых распространенных, повышающих активность стволовых клеток, являются факторы роста и цитокины. Так, например, фактор роста фибробластов способствуют дифференцировке стволовых клеток в кардиоподобные клетки [99].

Инкубация с SDF-1 (белок), перед инъекцией, увеличивает способность ЭПК стимулировать ангиогенез, на что указывало усиление образования сети *in vitro* [99]. Z. Pasha и соавт. (2008г.) показали, что трансплантация прекондиционированных SDF-1 МСК, полученных из КМ, крысам с ИМ, улучшает функциональную активность сердца, за счет уменьшения размера инфаркта и фиброза [100]. Повышение эффективности стволовых клеток у крыс также наблюдалось после обработки TGF- α (трансформирующий фактор роста), что приводило к восстановлению постишемической функции миокарда [99].

Также улучшить выживаемость клеток в суровой невааскуляризованной среде миокарда может гипоксическое прекондиционирование клеток [70]. Целью предварительной обработки гипоксии является улучшение способности клеток адаптироваться к неблагоприятным условиям в ишемизированном сердце. Доказано, что прекондиционированные гипоксией МСК ведет к лучшему приживлению, выживанию и дифференцировке, а также увеличивает ангиогенез. Таким образом, в настоящее время это распространенный метод предварительной подготовки клеток к трансплантации в ишемизированный участок миокарда. Однако оптимальные уровни кислорода и время культивирования клеток требуют дальнейшего изучения [70].

Лечение тепловым шоком также стало привлекательным методом увеличения выживаемости клеток. Сообщается, что тепловой шок значительно улучшает выживаемость ККМ в гипоксической среде, а трансплантация этих

клеток значительно снижает апоптоз, фиброз и улучшает функцию сердца при ишемии миокарда [70]. Кроме того, Moloney и соавт. сообщили, что МСК, культивируемые при высокой температуре (43 ° C), секретируют больше белков теплового шока, что может способствовать повышению выживаемости клеток [70]. Однако выбор оптимальной температуры и времени воздействия на клетки предстоит еще выяснить.

1.5.1 Эритропоэтин

Эритропоэтин (ЭПО) – это гемопоэтический гормон, ответственный за пролиферацию, дифференциацию и угнетение апоптоза в чувствительных к нему клетках кроветворной ткани (благодаря имеющимся на их мембране рецепторам ЭПО), оказывает проангиогенное действие, схожее с VEGF и FGF, а также обладает кардиопротективным эффектом [101; 102; 103]. Показано, что ЭПО проявляет антигипоксическое и антиапоптотическое действие, усиливает неоваскулогенез, мобилизует ЭПК и усиливает ангиогенез [98; 104]. Он также является гликопротеином, который продуцируется в основном клетками почек в ответ на гипоксию и стимулирует эритропоэз [97]. Стимулом усиления продукции ЭПО и экспрессии его рецепторов в некроветворных тканях является гипоксия, активирующая функцию комплекса HIF-1 [105]. HIF-1 в присутствии кислорода очень нестойкий и обнаруживается только при низком насыщении кислородом. Таким образом, HIF-1 действует по принципу негативной обратной связи как сенсорная молекула, запускающая синтез ЭПО при гипоксии тканей,

когда требуется повышенное количество эритроцитов для его транспорта и исчезающая, когда количество эритроцитов достаточно для транспорта соответствующего количества молекул кислорода. Соответственно, падает активность синтеза ЭПО [106]. Стимулирующий эффект ЭПО установлен на кардиомиоциты, гладкие мышцы артериальных и венозных сосудов, эндотелиальные клетки и др. [107].

Е. Lipsic и соавт. (2006г.), провели первое рандомизированное клиническое исследование, демонстрирующее безопасность применения эритропоэтина при остром ИМ [108]. В данном исследовании описаны эксперименты *ex vivo* авторов Z. Cai и соавт., G.L. Wright и соавт., P. Van de Meer и соавт., Y Shi. и соавт., P.R. Hanlon и соавт. с 2003 по 2005 года. Авторы использовали изолированные сердца крыс или кроликов и проводили на них эксперименты с применением перфузии Лангендорфа (ретроградная перфузия сердца через аорту). В результате эксперимента авторы сделали вывод, что применение ЭПО, до или после ишемического повреждения, благоприятно влияет на функцию сердечной ткани, улучшает постишемическое повреждение, снижает апоптоз клеток, однако до конца механизм действия оставался неясным [108]. Помимо экспериментов *ex vivo*, были проведены исследования *in vivo* на моделях крыс, кроликов или собак. Такие авторы, как L. Calvillo и соавт. (2003г.), C.J. Parsa и соавт. (2003г.), E. Lipsic. и соавт. (2004г.), A. Hirata и соавт. (2005г.) продемонстрировали, что применение ЭПО во время ишемии/реперфузии

миокарда приводит к ограничению зоны инфаркта и степени апоптоза, а также улучшению функции ЛЖ [108].

Еще одной интересной работой стало исследование S. Brunner и соавт. (2009г.) на мышах с острым ИМ после перевязки левой КА. В этой работе они сделали выводы, что ЭПО положительно влияет на долгосрочную выживаемость, функцию миокарда ЛЖ, усиливает неоваскуляризацию в пограничной зоне инфаркта, приводит к потенцированию хоуминга костномозговых клеток-предшественников в ишемизированный участок и уменьшает апоптоз [10].

Впервые применение инфузии ЭПО в сочетании с интрамиокардиальной инъекцией ККМ на крысах опубликовано D.G Zhang и соавт. в 2006 году. ККМ вводили в область ИМ сразу после лигирования передней нисходящей артерии, а ЭПО в течение 3 дней после и на 14-16 день после ИМ внутривенно. Авторы продемонстрировали значительное уменьшение размера инфарктированного миокарда, увеличение плотности капилляров, уменьшение зоны фиброза, уменьшение полости ЛЖ и улучшение сократимости миокарда [12]. Они показали, что сочетание ЭПО и ККМ более эффективно, чем использование их по-отдельности.

M.R. Ward и соавт. в 2008 году опубликовали в своей работе возможные аутокринные и паракринные эффекты ЭПО на МСК, предполагая, улучшение хемотаксиса МСК и усиливая их терапевтическую функцию [11]. В том же году

I.V. Copland и соавт. применили генно-инженерные МСК секретирующие эритропоэтин. Они пришли к выводу, что это улучшает регенеративную функцию клеток за счет аутокринных и паракринных механизмов [109].

Также был доказан антиапоптотический эффект эритропоэтина в исследовании E. R. Ergun и соавт. (2014г.). Мезенхимальные клетки, полученные из жировой ткани взрослого человека, кондиционировали ЭПО и подвергали апоптозу с помощью перекиси водорода. Авторы пришли к выводу, что preconditionирование эритропоэтином подавляет апоптоз МСК и увеличивает их выживаемость [104].

Российские ученые (2017 г.) продемонстрировали в своем исследовании, что ЭПО улучшает функциональные свойства МНК больных с ХСН после мобилизации стволовых и прогениторных клеток с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора [103]. В исследовании приняло участие 48 человек с ИБС. Пациентам интрамиокардиально под контролем навигационной системы NOGA XR вводили МНК, выделенные из сепарированной крови и предварительно инкубированные с ЭПО. Эффективность интрамиокардиального введения оценили через 6 и 12 месяцев. Результатом стало улучшение класса ХСН и функциональных свойств миокарда ЛЖ [103].

Помимо всех прочих эффектов, ЭПО способен влиять на кардиальные мезенхимальные клетки, запуская ранние регенеративные процессы и

пролиферацию в сердце [110]. Что было продемонстрировано С. Klopsch и соавт. (2018г.) на моделях крыс с ИМ.

Таким образом, можно сделать вывод, что применение ЭПО способно не только защитить стволовые клетки от апоптоза, но и повысить их пролиферативную способность, и, как следствие увеличить их терапевтический потенциал.

1.6 Способы введения стволовых клеток в ишемизированный миокард

Одним из важных вопросов является способ доставки ККМ в миокард. Существует несколько способов введения стволовых в ишемизированный миокард. Каждый из них имеет свои положительные и отрицательные стороны.

1.6.1 Внутривенный метод введения

Внутривенный способ введения ККМ самый простой, однако и самый малоэффективный. При наличии многих патологических состояний таких, как сахарный диабет, ретинопатия, онкогенез, что часто сопутствует ИБС, может оказать нежелательные эффекты. Эндотелиальный фактор роста VEGF-A и моноклеары в эксперименте усиливают формирование атероматозных масс. Внутривенное введение моноклеаров, меченных ³H-тимидином, показало, что накопление клеток в скелетной мускулатуре и миокарде было примерно равным 1–2% от введенной массы клеток «хоуминг» эффект, в то время как интрамиокардиальная инъекция показала сохранение клеточной массы на уровне 30–35% в миокарде даже через сутки [111].

1.6.2 Интракоронарный метод введения

Интракоронарный способ ККМ введения впервые был применен при остром ИМ в 2002 году. Авторы вводили ККМ 10 пациентам при острым ИМ в коронарную артерию после ее стентирования, в бассейне которой произошел инфаркт. Спустя 3 мес выявлено улучшение насосной функции сердца и геометрии без отрицательного эффекта [83].

Китайские ученые провели мета-анализ рандомизированных клинических исследований доставки ККМ внутрикоронарным способом при острым ИМ с подъемом сегмента ST, в период между 2004 и 2017 гг. В мета-анализ входили такие клинические исследования, как TOPCARE – AMI, ASTAMI, BOOST и REPAIR – AMI. Они сделали вывод о том, что внутрикоронарная инфузия приводит к улучшению фракции выброса ЛЖ и снижению систолического объема ЛЖ, что указывает на то, что клеточная терапия оказывает положительное влияние на функцию ЛЖ и может улучшить неблагоприятное ремоделирование ЛЖ, а, следовательно, данный способ доставки ККМ эффективен [112].

Отрицательными моментами внутрикоронарного введения ККМ является то, что во время процедуры необходимо тщательно отслеживать количество клеток и время инфузии чтобы избежать нарушений коронарного кровотока и некроза миокарда. А также, отсутствие контроля за количеством клеток, способных задерживаться в ишемизированном миокарде ставит под сомнение получение положительных результатов.

1.6.3 Трансэндокардиальный метод введения

Трансэндокардиальный метод доставки ККМ возможен с применением электромеханического картирования NOGA. Метод картирования может выявить зоны с отсутствием механической и электрической активности, которые являются зоной нежизнеспособного миокарда, куда показана имплантация клеток [113]. Доставка клеток через эндокард в зону инфарктированного миокарда осложняется тем, что структура поверхности эндокарда неоднородна, так как образована папиллярными мышцами и трабекулами желудочков. Еще одним отрицательным моментом данного способа введения ККМ является возникновение различных нарушений ритма (желудочковая экстрасистолия, желудочковая тахикардия), однако по данным литературы, частота возникновения таких осложнений не превышает 1% [114].

Е.С. Perin и соавт. продемонстрировали в своем исследовании трансэндокардиальное введение 30 миллионов ККМ происхождения 14 пациентам. У всех пациентов была тяжелая сердечная недостаточность ишемического генеза, контрольное обследование выполнялось через 2, 6 и 12 месяцев после имплантации. Было выявлено значительное улучшение в показателях объёмных характеристик ЛЖ и перфузии миокарда по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, исследование включало пациентов с исходной значительной дисфункцией ЛЖ; кроме того, эти результаты могут быть актуальными для группы пациентов с сердечной недостаточностью [115].

Таким образом, эндокардиальная имплантация ККМ с использованием системы картирования NOGA зарекомендовала себя как перспективный, эффективный способ доставки ККМ в ишемизированную область миокарда.

Резюме

Клеточные технологии, несомненно, являются перспективным методом лечения хронической ИБС. Множественные исследования зарубежных и российских авторов доказывают нам эффективность и безопасность их применения, но не дают однозначных ответов на многие вопросы. Ряд проблем, связанных с выбором популяции клеток, апоптозом клеток, количеством клеток, способом их введения, остаются актуальными. Учитывая это, ученым предстоит колоссальная работа для того чтобы получить ответы шаг за шагом. Наше исследование предлагает решение одной из задач, направленное на выживаемость клеток в условиях гипоксии. На сегодняшний день, в современной научной литературе, отсутствуют рандомизированные клинические исследования относительно применение метода интрамиокардиальной имплантации аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином, в хирургии ИБС.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект и дизайн исследования

Клиническая часть рандомизированного исследования по оценке метода интрамиокардиальной имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином в хирургии ИБС, включает в себя анализ 100 пациентов с диффузным и(или) дистальным поражением правой коронарной артерии (ПКА) (невозможность выполнить коронарное шунтирование ПКА). Sample size (мощность исследования – 0,8; alpha – 0,05) рассчитан на основании исследования. Исследование проводилось на базе федерального государственного бюджетного учреждения - «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации совместно с Научно-исследовательским институтом экспериментальной и клинической медицины. Диагноз ИБС был поставлен всем пациентам при госпитализации на основании анамнеза, клиники, объективных методов исследования. Медиана возраста пациентов в группе непрямой реваскуляризации составила 63 [51, 68] года, в группе контроля – 64 [53, 68] года. Группы по возрасту сопоставимы ($p=0,4$). Соотношение мужчины/женщины – 1:2,5 (27%:73%).

После предоперационного обследования пациенты слепым методом рандомизировались на две группы (основная и контрольная группы). В основной группе было выполнено КШ в сочетании с интрамиокардиальной имплантацией аутологичных ККМ, обработанных ЭПО. В контрольной группе было выполнено

изолированное КШ (артерия без дистального русла не шунтировалась). Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

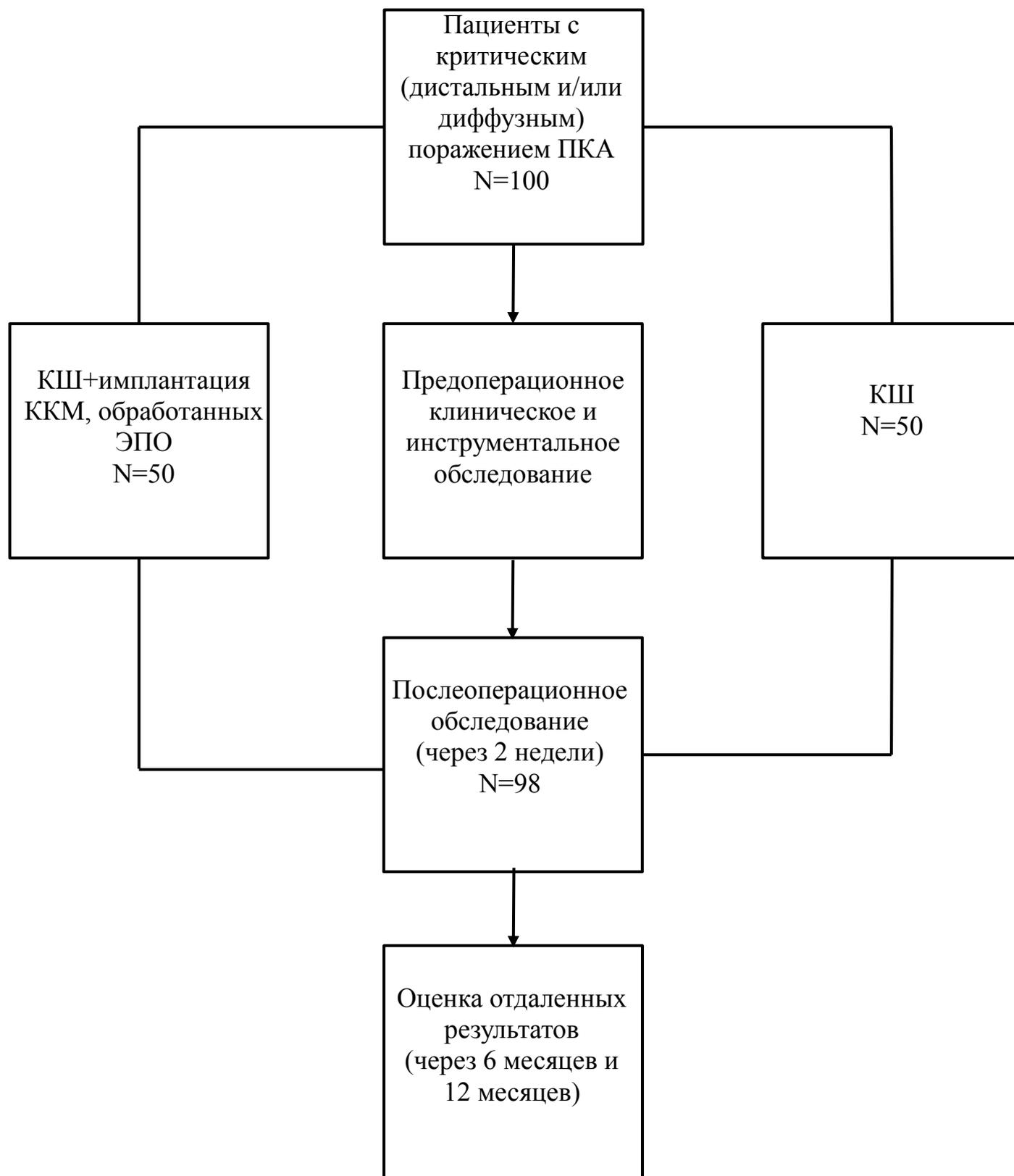


Рисунок 1. Дизайн исследования

2.1.1 Конечные точки исследования

Первичные точки:

- Динамика перфузии миокарда по данным перфузионной ОФЭКТ с Технетрилом.

Вторичные точки:

- Клинический статус: ФК стенокардии (CCS); ФК сердечной недостаточности по NYHA; опросник SF36; тест 6-минутной ходьбы.
- Функция левого желудочка (Эхо-КГ, тканевая доплерография).

2.1.2 Последовательность событий и методология исследования

1. Идентификация пациента с показаниями к КШ в бассейне левой коронарной артерии и наличием дистального и (или) диффузного поражения ПКА по данным коронарной ангиографии (КАГ).

2. Оценка пациента на предмет соответствия критериям включения и исключения из исследования.

3. Письменное согласие пациента на участие в исследовании.

4. Выполнение перфузионной сцинтиграфии миокарда с Технетрилом на предмет наличия жизнеспособного (гибернированного) миокарда в области ПКА.

5. Рандомизация происходила с помощью метода запечатанных непрозрачных конвертов. Конверты были подготовлены до начала набора

пациентов в основную или контрольную группы, их количество соответствовало расчетному размеру выборки.

6. Основной группе было выполнено КШ и интрамиокардиальная имплантация аутологичных клеток КМ, обработанных эритропоезином; контрольной группе было выполнено только КШ.

7. Выполнение перфузионной сцинтиграфии миокарда с Технетрилом исходно, через 6, 12 месяцев после оперативного вмешательства.

8. Оценка клинического статуса (ФК стенокардии, ФК сердечной недостаточности, SF-36, тест 6МХ) пациентов исходно, через 6 и 12 месяцев.

9. Инструментальные методы обследования: Эхо-КГ, тканевая доплерография – исходно, через 2 недели, 6 и 12 месяцев после операции; МРТ с контрастированием или ОФЭКТ с MIBG исходно, 6 и 12 месяцев.

10. Анализ выживаемости и неблагоприятных событий на протяжении всего исследования в обеих группах.

2.1.3 Критерии включения и исключения

Пациенты с абсолютными показания к КШ и поражению ПКА, по данным селективной коронарографии, рассматривались для включения в исследование.

Критерии включения:

- Возраст 18-80 лет;
- Гемодинамически значимое поражение левой коронарной артерии;
- Диффузное и(или) дистальное поражение правой коронарной артерии, невозможность ее шунтирования;

- Наличие в области оперативного вмешательства жизнеспособного (гибернированного) миокарда.

Критерии исключения:

- Сопутствующая кардиальная патология, требующая хирургической коррекции;
- Выявление злокачественных опухолей за последние 5 лет;
- ФВ ЛЖ <40%.

2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно заявленному дизайну, выполнялась оценка клинического статуса (ФК стенокардии по классификации CCS, ФК сердечной недостаточности (NYHA), опросник SF-36, тест 6-минутной ходьбы), оценка глобальной и сегментарной сократимости миокарда по результатам эхокардиографии (ЭХО-КГ) и тканевой доплерографии. Выполнялась оценка миокардиальной перфузии по данным двухэтапной сцинтиграфии миокарда с ^{99}Tc (Технетрил), оценка симпатической иннервации миокарда по данным сцинтиграфии с MIBG, а также проводилась оценка сократимости и перфузии миокарда по данным магнитнорезонансной томографии (МРТ) сердца с контрастированием.

2.2.1 Клиническое обследование

Клиническое обследование включало: оценку функционального класса стенокардии по классификации CCS, оценку функционального класса сердечной недостаточности NYHA, качество жизни на основе опросника «SF-36 Health Status Survey», тест 6-минутной ходьбы.

С целью определения ФК стенокардии использовали классификацию Canadian Cardiovascular Society (CCS), таблица 1.

Таблица 1

Классификация стабильной стенокардии Канадского кардиологического общества (CCS)

ФК	Проявления
I	Больной хорошо переносит обычные физические нагрузки. Приступы стенокардии возникают только при нагрузках высокой интенсивности.
II	Приступы стенокардии возникают при ходьбе по ровному месту на расстоянии более 500 м, при подъеме более чем на 1 этаж.
III	Выраженное ограничение обычной физической активности. Приступы возникают при ходьбе в нормальном темпе по ровному месту на расстоянии 100-500 м, при подъеме на 1 этаж, могут возникать редкие приступы стенокардии покоя.
IV	Стенокардия возникает при небольших физических нагрузках, при ходьбе по ровному месту на расстоянии менее 100 м. Характерно возникновение приступов стенокардии в покое.

С целью определения ФК сердечной недостаточности использовали классификацию Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA, 1994), таблица 2.

Классификация хронической сердечной недостаточности Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA, 1994).

ФК	Проявления
I	Ограничений в физической активности нет. Обычная физическая нагрузка не вызывает выраженного утомления, слабости, одышки или сердцебиения
II	Умеренное ограничение физической активности. В покое какие-либо патологические симптомы отсутствуют. Обычная физическая нагрузка вызывает слабость, утомляемость, сердцебиение, одышку и др. симптомы
III	Выраженное ограничение физической активности. Больной комфортно чувствует себя только в состоянии покоя, но малейшие физические нагрузки приводят к появлению слабости, сердцебиения, одышки и т.п.
IV	Невозможность выполнять какие-либо нагрузки без появления дискомфорта. Симптомы сердечной недостаточности имеются в покое и усиливаются при любой физической нагрузке

Тест 6-минутной ходьбы

Тест 6-минутной ходьбы (6МХ) измеряет максимальное расстояние, которое пациент может пройти по плоской твердой поверхности в течение 6

минут. Для проведения теста необходимо: часы с секундной стрелкой, сантиметр/рулетка, заранее размеченное место для проведения теста.

Противопоказаниями для проведения теста 6МХ будут - нестабильная стенокардия или инфаркт миокарда в течение предыдущего месяца; заболевания опорно-двигательного аппарата, препятствующие выполнению пробы.

Относительные противопоказания: - исходная ЧСС менее 50 в минуту или более 120 в минуту, - систолическое АД более 180 мм рт.ст., - диастолическое АД более 120 мм рт.ст.

Тест следует проводить в утренние часы. Пациент должен легко позавтракать за 3-4 часа до проведения теста, не принимать кардиологических препаратов, не курить по меньшей мере 2 часа до теста. Для проведения теста 6МХ в коридоре длиной 30 м намечаются разметки через каждые 3 м дистанции. За 10 минут до проведения теста 6МХ пациент должен отдохнуть. В это время необходимо объяснить пациенту цель и задачи данного теста. Если во время теста появится одышка или слабость, пациент может замедлить темп ходьбы или остановиться и отдохнуть, затем необходимо продолжить ходьбу. По истечении 6 минут следует остановить пациента и измерить пройденное расстояние. Перед началом и в конце теста оценивают переносимость нагрузки по шкале Борга, ЧСС, АД.

• 0 — состояние покоя; • 1 — очень легко; • 2 — легко; • 3 — умеренная нагрузка; • 4 — довольно тяжело; • 5 — тяжело; • 6 — тяжело; • 7 — очень тяжело; • 8 — очень тяжело; • 9 — очень-очень тяжело; • 10 — максимальная нагрузка

У больных с ХСН результаты пробы с 6-минутной ходьбой коррелируют с ФК сердечной недостаточности по NYHA, таблица 3.

Таблица 3

Корреляция теста 6 МХ с ФК СН

Функциональный класс стенокардии	Тест с 6-минутной ходьбой, метры
I	> 551
II	426-550
III	301-425
IV	< 150

Качество жизни ("SF-36 Health Status Survey")

SF-36 относится к неспецифическим опросникам для оценки качества жизни (КЖ), он широко распространен в США и странах Европы при проведении исследований КЖ. Перевод на русский язык и апробация методики была проведена «Институтом клинико-фармакологических исследований» (Санкт-Петербург). 36 пунктов опросника сгруппированы в восемь шкал: физическое функционирование, ролевая деятельность, телесная боль, общее здоровье, жизнеспособность, социальное функционирование, эмоциональное состояние и психическое здоровье. Показатели каждой шкалы варьируют между 0 и 100, где 100 представляет полное здоровье, все шкалы формируют два показателя: душевное и физическое благополучие. Результаты представляются в виде оценок

в баллах по 8 шкалам, составленных таким образом, что более высокая оценка указывает на более высокий уровень КЖ. Количественно оцениваются следующие показатели:

1. Физическое функционирование (Physical Functioning - PF), отражающее степень, в которой физическое состояние ограничивает выполнение физических нагрузок (самообслуживание, ходьба, подъем по лестнице, переноска тяжестей и т.п.). Низкие показатели по этой шкале свидетельствуют о том, что физическая активность пациента значительно ограничивается состоянием его здоровья.
2. Ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием (Role-Physical Functioning - RP) – влияние физического состояния на повседневную ролевую деятельность (работу, выполнение повседневных обязанностей). Низкие показатели по этой шкале свидетельствуют о том, что повседневная деятельность значительно ограничена физическим состоянием пациента.
3. Интенсивность боли (Bodily pain - BP) и ее влияние на способность заниматься повседневной деятельностью, включая работу по дому и вне дома. Низкие показатели по этой шкале свидетельствуют о том, что боль значительно ограничивает активность пациента.
4. Общее состояние здоровья (General Health - GH) - оценка больным своего состояния здоровья в настоящий момент и перспектив лечения. Чем ниже бала по этой шкале, тем ниже оценка состояния здоровья.

5. Жизненная активность (Vitality - VT) подразумевает ощущение себя полным сил и энергии или, напротив, обессиленным. Низкие баллы свидетельствуют об утомлении пациента, снижении жизненной активности.
6. Социальное функционирование (Social Functioning - SF), определяется степенью, в которой физическое или эмоциональное состояние ограничивает социальную активность (общение). Низкие баллы свидетельствуют о значительном ограничении социальных контактов, снижении уровня общения в связи с ухудшением физического и эмоционального состояния.
7. Ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием (RoleEmotional - RE) предполагает оценку степени, в которой эмоциональное состояние мешает выполнению работы или другой повседневной деятельности (включая большие затраты времени, уменьшение объема работы, снижение ее качества и т.п.). Низкие показатели по этой шкале интерпретируются как ограничение в выполнении повседневной работы, обусловленное ухудшением эмоционального состояния.
8. Психическое здоровье (Mental Health - MH), характеризует настроение наличие депрессии, тревоги, общий показатель положительных эмоций. Низкие показатели свидетельствуют о наличии депрессивных, тревожных переживаний, психическом неблагополучии.

Шкалы группируются в два показателя «физический компонент здоровья» и «психологический компонент здоровья»:

1. Физический компонент здоровья (Physical health – PH) Составляющие шкалы: физическое функционирование; ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием; интенсивность боли; общее состояние здоровья.

2. Психологический компонент здоровья (Mental Health – MH) Составляющие шкалы: психическое здоровье; ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием; социальное функционирование; жизненная активность.

2.2.2 Инструментальное обследование

Селективная коронарография

С целью оценки морфологического состояния коронарных артерий, показаний к оперативному лечению у пациентов с ИБС проводилась коронарография (КАГ). Исследование выполнялось на ангиографических установках «Toshiba» (Япония) и «General Electric» (США), под местной анестезией (20 мл 0,5% раствора новокаина) по методу Judkins с введением катетера путем чрескожной пункции лучевой или бедренной артерии по методике Seldinger. В качестве рентгеноконтрастного вещества применяли «Ультравист» или «Визипак».

Для визуализации левой КА записывали шесть стандартных проекций:

- 1) прямая (переднезадняя) проекция без ангуляции;
- 2) правая косая проекция с каудальной ангуляцией;
- 3) правая косая проекция с краниальной ангуляцией;
- 4) левая косая проекция с краниальной ангуляцией;

- 5) левая косая с каудальной ангуляцией («паук»);
- 6) левая боковая проекция.

Для визуализации ПКА, как правило, записывали три проекции:

- 1) левая косая проекция;
- 2) переднезадняя проекция с краниальной ангуляцией;
- 3) правая боковая проекция.

На основании данных КАГ определялась возможность включения пациента в исследование, а именно показания к КШ и наличие дистального и/или диффузного поражения ПКА.

Эхокардиографическое исследование

В рамках исследования, оценивали функцию ЛЖ, наличие или отсутствие нарушений локальной сократимости с помощью Эхокардиографического метода диагностики. Эхо-КГ проводилось на ультразвуковых аппаратах «VIVID-7» и «VIVID-7D» (General Electric, США), имеющих датчики со сменной частотой сканирования от 2,25 МГц до 5,0 МГц. Для визуализации полостей сердца, внутрисердечных структур в двухмерном режиме использовали стандартные позиции ультразвукового датчика (парастернальная длинная ось левого желудочка, короткая ось на уровне митрального клапана, апикальные двух- и четырехкамерную позиции). Деление левого желудочка на 17 сегментов проводилось согласно новой системе номенклатуры осей, стенок и сегментов Американской кардиологической ассоциации, рисунок 2.

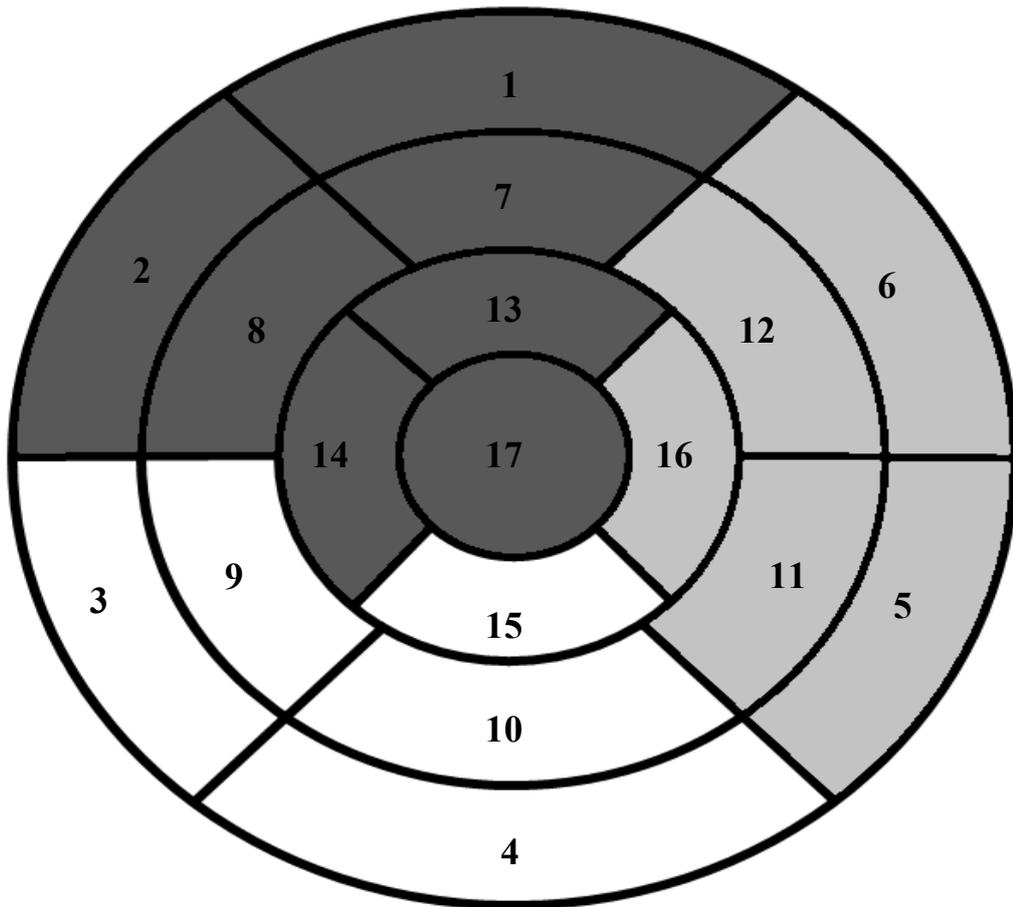


Рис. 2. Сегментарное строение сердца.

Для оценки локальной сократимости оценивали движение миокарда и степень его утолщения. Проводилось сравнение локальной сократимости разных сегментов, с количественной оценкой общей сократимости левого желудочка. Для расчета региональной и глобальной сократимости ЛЖ была использована компьютерная программа Ultra Medic Promed. Далее производили обвод контура ЛЖ по эндокарду в систолу и в диастолу, как вручную, так и автоматически с возможностью улучшения яркости, контрастности и резкости изображения. Нарушение локальной сократимости описывали следующими терминами: гипокинезия (снижение амплитуды движения и утолщения миокарда

исследуемой области), акинезия (отсутствие движения и утолщения), дискинезия (движение противоположное нормальному и отсутствие утолщения).

Помимо показателей глобальной и сегментарной сократимости ЛЖ производилась оценка его объемных показателей, таких как КДО (мл), КСО (мл).

Тканевая доплерография

Для количественной оценки региональной деформации миокарда на основе ультразвуковой деформации (стрейн, Global Longitudinal Strain англ.) и скорости деформации (скорость стрейна, Strain Rate англ.) использовали тканевую доплерографию.

Strain (деформация, или напряжение) — безразмерная величина, которая представляет собой деформацию мышечного волокна (в систолу) относительно его первоначальной длины (в диастолу), выраженная в процентах. Оценивались показатели глобальной и региональной функции ЛЖ (глобальный Strain, региональный Strain). В норме систолический стрейн миокардиального волокна составляет в среднем 20 %. Снижение этого норматива является маркером нарушения деформации.

Strain Rate (скорость деформации, т.е. напряжения) отражает скорость изменения длины мышечного волокна, то есть является скоростным градиентом деформации данного мышечного волокна.

Тканевая доплерография выполнялась на ультразвуковой системе «VIVID-7» (General Electric, США) с использованием матричного секторного фазированного датчика M3S (1,5-4,0 МГц) с синхронизированной ЭКГ от

конечностей. Регистрировали видеоклипы по стандартной методике из апикальной позиции (на уровне 5-,4- и 2-х камер). КДО ЛЖ, КСО ЛЖ и ФВ ЛЖ вычисляли с использованием метода Simpson на уровне 4- и 2-х камерных позиций. Оценивали показатель глобальной деформации и скорости деформации миокарда ЛЖ во время систолы в продольном направлении (Global Longitudinal Stain/Strain Rate). В режиме кинопетли регистрировали три сердечных цикла, а затем выполняли оценку деформационных свойств миокарда ЛЖ в каждом сердечном цикле с помощью новой ультразвуковой технологии – двухмерной Speckle Tracking Imaging. Двухмерные изображения ЛЖ «замораживались» в конце систолы. Проводилось оконтуривание границ эндокарда и автоматически получали кривые Strain (%) от сегментов. По кривым, полученным из апикальной позиции на уровне 5-,4- и 2-х камер рассчитывали глобальную продольную деформацию миокарда (Global Longitudinal Strain) и глобальную скорость деформации миокарда (Global Longitudinal Strain Rate). Так же оценивали показатели деформационных характеристик миокарда в 6 сегментах для каждой позиции.

Перфузионная сцинтиграфия миокарда

Перфузионная однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) миокарда представляет собой внутривенное введение радиофармпрепарата и основана на оценке его включения и распределения в миокарде, которое происходит пропорционально коронарному кровотоку.

99mTc-метокси-изобутил-изонитрилом (Технетрил)

В рамках исследования оценку перфузии и функционального состояния миокарда левого желудочка осуществляли по данным перфузионной сцинтиграфии миокарда с радиофармпрепаратом с ^{99m}Tc -метокси-изобутил-изонитрилом (Сестамиби, МИБИ, в РФ выпускается под торговым названием Технетрил, Диамед) исходно, через 6 и 12 месяцев после хирургического лечения.

Методика выполнения процедуры:

За три дня до исследования отменяли принимаемые пациентом препараты (бета-блокаторы, нитраты, и т.д.), и рекомендовали пациенту исключить из рациона продукты с содержанием кофеина. Исследование проводилось натощак и по протоколу «фармакологический стресс-тест -покой».

Процедура «фармакологический стресс-тест» - в качестве нагрузочной пробы проводили фармакологический стресс-тест с внутривенным введением аденозина со скоростью введения 140 мкг/кг/мин в течение 4 мин. На 2-ой минуте инфузии аденозина внутривенно болюсом вводили 555-740 МБк радиофармпрепарата (РФП). Показатели гемодинамики, контролируемые во время стресс-теста: ЧСС, АД, боль в груди, нарушение ритма, изменение сегмента ST.

Процедура «в покое» - проводили спустя 3–4 часа после инъекции радиофармпрепарата в нагрузку (однодневный протокол). Показатели гемодинамики, контролируемые во время покоя: ЧСС, АД, ЭКГ. Запись

исследований выполнена в ЭКГ-синхронизированном режиме через 60-90 минут после введений РФП.

Сбор данных проводили на гибридной ОФЭКТ/КТ системе Infinia Hawkeye (GE Healthcare, США) через 60–90 мин после введения радиофармпрепарата без коррекции поглощения излучения. При анализе полученных изображений использовали программный пакет Quantitative Perfusion SPECT (Cedars-Sinai Medical Center, США), представленный на рабочей станции Xeleris (GE Healthcare, США). Оценку нарушений перфузии и сократительной функции миокарда ЛЖ выполняли в соответствии с актуальными рекомендациями Европейской Ассоциации Ядерной Медицины (EANM).

Количественную оценку нарушений перфузии проводили с использованием 17 сегментарной модели ЛЖ и 5-балльной шкалы, где: 0 – норма; 1 – сомнительная гипоперфузия; 2 – умеренная гипоперфузия; 3 – выраженная гипоперфузия и 4 – аперфузия. Вычисляли сумму баллов дефектов перфузии миокарда ЛЖ в покое Summed Rest Score (SRS) и после нагрузки Summed Stress Score (SSS), сумму баллов стресс-индуцированного (преходящего) дефекта перфузии Summed Different Score (SDS) с учетом зон улучшения перфузии после нагрузки. Стресс-индуцированное нарушение перфузии устанавливали при улучшении накопления радиофармпрепарата в сегменте миокарда при исследовании в покое, по сравнению с исследованием после стресс-теста. Анализ функционального состояния миокарда ЛЖ включал

в себя определение ФВ. Прицельно вычисляли данные показатели для сегментов миокарда в типичном бассейне кровоснабжения ПКА.

123-I-MIBG (метайодобензилгуанидин)

В качестве оценки интрамиокардиальной имплантации аутологичных клеток котного мозга, обработанных эритропоэтином, на симпатическую иннервацию сердца выполняли ОФЭКТ миокарда с ¹²³I-MIBG (нейротропный радиофармпрепарат ¹²³I-метайодобензилгуанидин). Исследование проводили за 1-2 дня перед оперативным вмешательством и через 6, 12 месяцев после оперативного вмешательства. Сбор данных проводили на гибридной ОФЭКТ/КТ системе Infinia Hawkeye (GE Healthcare, США) через 15 мин (раннее сканирование) и 240 мин (отсроченное сканирование) после введения РФП без коррекции поглощения излучения. При оценке общей симпатической активности сердца использовали планарную сцинтиграфию органов грудной клетки в передней проекции.

МРТ с контрастированием

Для проведения МРТ сердца с контрастированием пациентам рекомендовали за сутки до исследования исключать употребление напитков, (кока-кола, пепси-кола и др.), шоколада, бананов, чая, кофе и какао. Вес пациента не должен превышать 110 кг, в связи с ограниченным диаметром трубы томографа. Пациент должен был быть эмоционально стабилен, не страдать клаустрофобией, способный задерживать дыхание на 10-12 секунд.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) с контрастированием проводилась на томографе Initial Achieva 1,5 T, Philips (Голландия). Все этапы сканирования выполнялись при задержке пациентом дыхания на выдохе длительностью от 6–8 до 12–14 с. Внутривенная инъекция контрастного вещества осуществлялась через 30–35 мин после получения ориентировочных срезов толщиной 8 мм, серий киноизображений и T1-, T2-взвешенных изображений. В качестве контрастирующих агентов для выявления постинфарктных рубцовых изменений в отсроченную фазу применялись препараты на основе хелатных комплексов гадолиния («Гадовист» 1,0). Полученные данные обрабатывались полуавтоматическим методом с помощью специального программного обеспечения Segment v1.9. Полученные изображения позволяли оценить следующие параметры: размеры камер сердца и показатели глобальной сократительной функции ЛЖ (КДО ЛЖ, КСО ЛЖ, ФВ ЛЖ), массу миокарда ЛЖ (ММ ЛЖ), процентное содержание рубцовой ткани ЛЖ, процентное содержание ЖМ ЛЖ, массу ЖМ ЛЖ. Для детальной оценки сократимости и массы миокарда ЛЖ серия срезов в коронарной плоскости обрабатывалась с использованием программ Philips MR Cardiac Explorer или Philips MR Cardiac Analysis.

2.3 РАБОТА С КЛЕТОЧНЫМ МАТЕРИАЛОМ

Основные этапы:

1. Забор костного мозга;
2. Получение целевых клеток из аутологичного костного мозга;
 - 2.1 Выделение моноклеарных клеток (МНК) из аспирата костного мозга;
 - 2.2 Прекондиционирование МНК эритропоэтином;
3. Характеристика МНК для имплантации;
 - 3.1 Определение количества клеток;
 - 3.2 Определение жизнеспособности клеток;
 - 3.3 Определение клеточного состава;
4. Имплантация преко́ндиционированных с эритропоэтином МНК в миокард.

Забор костного мозга

Костный мозг (КМ) получали путем пункции подвздошных костей за 3–4 часа до введения выделенных из костного мозга клеток. Для забора КМ использовали одноразовые иглы для трепанобиопсии длиной 100 мм и диаметром 11-15G с применением одноразового 20 мл шприца, в которые предварительно набирали 1 мл физиологического раствора с гепарином, исходя из расчета - 50ед. гепарина на 1мл получаемого аспирата костного мозга. Далее

полученный аспират КМ транспортировался в лабораторию клеточных технологий НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН для дальнейшей работы с клетками.

Получение и характеристика клеточного трансплантата для введения в миокард

1. Выделение МНК;
2. Подсчет количества МНК и жизнеспособности;
3. Инкубирование МНК с эритропоэтином;
4. Определение фенотипа МНК.

1. Выделение МНК производилось в условиях стерильного бокса. Все основные манипуляции выполнялись в ламинарном шкафу биологической защиты II а класса защиты, при соответствующей экипировке персонала (стерильные перчатки, хирургические костюмы, маски, шапочки, стерильные халаты, бахилы). Полученный аспират костного разводили физиологическим раствором в соотношении 1:3 и пипеткой наслаивали в пробирки, на градиент плотности фиколл/верографин $\rho=1,077$ г/л (Панэко, Россия) в 50 мл стерильные пластиковые культуральные конические пробирки с завинчивающимися крышками (TPP, Швейцария). Соотношение раствора градиента к суспензии КМ 1:2.

Пробирки помещали в центрифугу Eppendorf и центрифугировали при температуре 22 °С 40 минут со значением g (ускорение) равным 400. Далее

собирали «интерфазное кольцо» (облако, в котором сконцентрированы моноклеарные клетки костного мозга) пипеткой на 5 мл, переносили в новые стерильные пробирки на 50 мл и добавляли физиологический раствор с 10% аутологичной сыворотки до 50 мл, осаждали центрифугирование 10 минут с ускорением 400g. После второго отмывания к суспензии клеток добавляли 10 мл физиологического раствора с 10% аутологичной сыворотки.

2. Подсчет количества клеток и жизнеспособности производили с помощью камеры Горяева. Каплю суспензии клеток после предварительного разведения 10 мкл в 190 мкл физиологического раствора подносили к шлифованному краю покровного стекла и заполняли камеру полностью без пузырей. Клеткам давали осесть в течение 1-2 минут. Подсчет клеток был в 100 больших квадратах. Результаты подсчета в больших квадратах суммировали и производили вычисления количества клеток в 1 мкл.

Формула:

$$x = (a * 4000 * b) / 1600$$

x – кол-во клеток в 1 мкл. МФ

a – кол-во клеток в 100 больших квадратах

b – разведение МФ

1600– кол-во малых квадратов

4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл, исходя из объема малого квадрата (1/4000).

Витальная окраска с трипановым синим заключается в следующем. К 10 мкл клеточной суспензии добавляют 1/10 объема 5% раствора трипанового синего в физиологическом растворе. Вносят окрашенную клеточную суспензию в предварительно подготовленную камеру Горяева, подсчитывают процент негативных (т.е. живых, не окрашенных в синий цвет) клеток в 100 больших квадратах. Жизнеспособность МНК составила 99-100%.

3. Инкубирование МНК с эритропоэтином. 1×10^6 клеток вносили в 30 мл физиологического раствора с 10% аутологичной плазмы и ЭПО в дозе 33,4 МЕ/мл, перемешивали, переносили в культуральный флакон Т75 и помещали на 60 минут в CO_2 -инкубатор при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. По истечении времени инкубации моноклеарных клеток костного мозга с ЭПО, содержимое флаконов ресуспендировали и переносили в 50 мл пробирки, осаждали при 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут при 22°C , удаляли надосадочную жидкость, к осадку добавляли физиологический раствор до 2 мл, переносили в стерильный пенициллиновый флакон, пробковали, маркировали и отправляли в клинику в термосумке с фризером.

4. Для определения клеточного состава используется метод иммунофлуоресцентной микроскопии. Все манипуляции с антителами производятся согласно рекомендаций производителя. Для определения клеточного состава, в предварительно подготовленную камеру Горяева вносят суспензию клеток, конъюгированных с флуоресцентно-мечеными антителами, подсчитывают процент позитивных клеток в 100 больших квадратах, таблица 4.

Влияние эритропоэтина на фенотип клеток костного мозга больных
ишемической болезнью сердца (Me; Q1-Q3)

Параметры	Исходно, %	Кондиционирование с ЭПО, %
CD31+/CD184-	15,27 6,0-20,0	13,86 3,1-19,0
CD31+/CD184+	6,13 2,0-8,5	11,48* 5,0-12,0
CD31+/CD34-	21,39 10,0-28,4	24,83 6,4-29,0
CD31+/CD34+	0,94 0,4-1,0	0,92 0,5-1,0
CD34+/CD133-	0,78 0,1-1,0	0,58 0,2-1,0
CD34+/CD133+	0,87 0,5-1,06	0,33* 0,1-0,7
CD34+/VEGFR2-	1,99 0,1-4,0	0,12* 0,1-0,15
CD34+/VEGFR2+	1,09 0,5-1,3	1,51 0,1-2,5
CD34+/CD184-	5,23	1,61

	0,2-7,0	0,1-3,0
CD34+/CD184+	2,46	1,69
	1,0-3,0	0,4-2,0

Имплантация прекондиционированных с эритропоэтином МНК в миокард

Перед имплантацией клеток КМ выполняли КШ в стандартной методике. Хирургический доступ осуществлялся посредством срединной стернотомии. Далее выделялась левая ВГА и большая подкожная вена в качестве аутотрансплантатов. Подключалось искусственное кровообращение. Выполнялась окклюзия аорты и кардиopleгия. Затем накладывались дистальные анастомозы в область бассейна левой коронарной артерии. После этого имплантировали ККМ в область бассейна ПКА (подробное описание ниже). Прекращали полную окклюзию аорты, переходили на частичную. Накладывались проксимальные анастомозы, после чего снимали зажим с аорты. Искусственное кровообращение последовательно отключали. Проводили гемостаз и ушивали послеоперационный доступ.

После выполнения основного метода кардиохирургического вмешательства формировали 3-4 радиально расходящихся из одной точки каналов-депо при помощи волоконного лазера «ИРЭ-Полус 1,56 мкм» (г. Фрязино, Россия) в участках миокарда, где невозможно провести прямую реваскуляризацию как показано на рисунке 3,4.

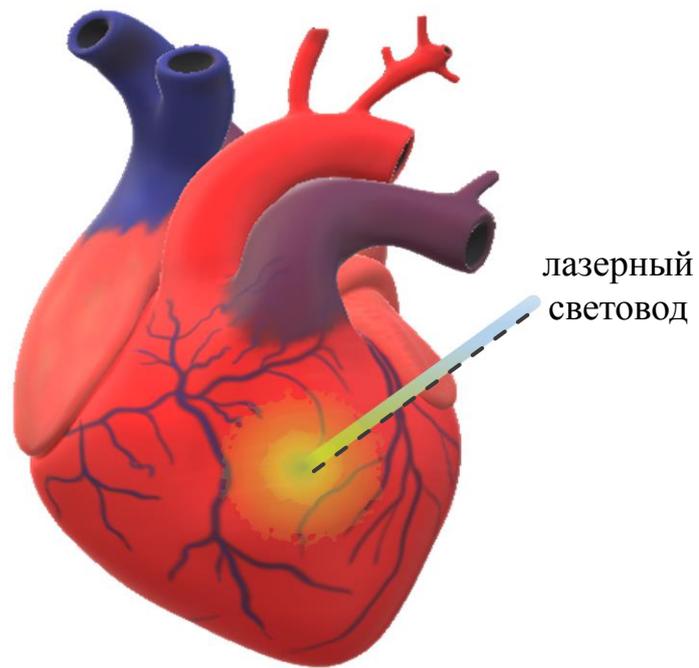


Рис. 3. Лазерный световод

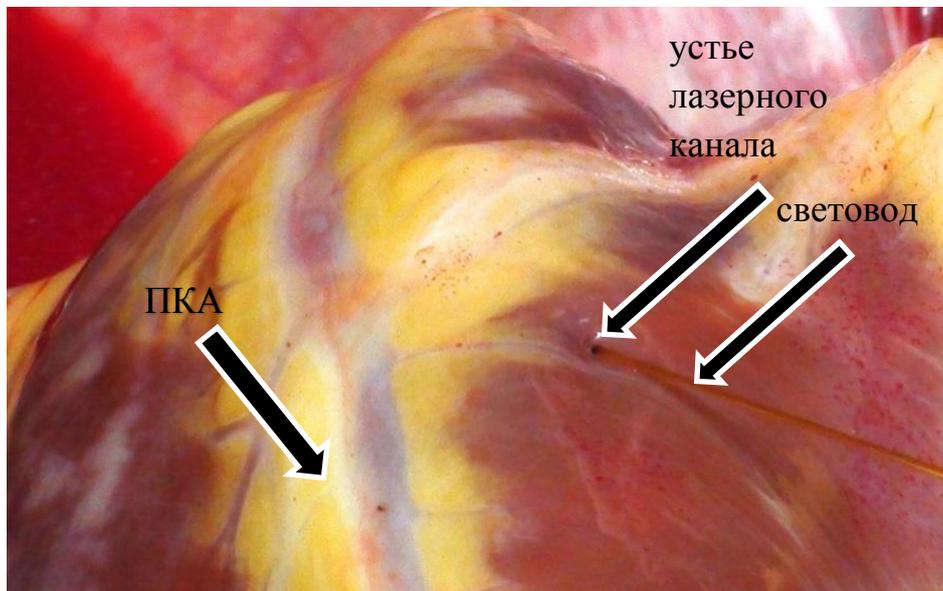


Рис. 4. Выполнение ТМЛР

Далее вводили взвесь клеток КМ, обработанных эритропоэтином, рисунок 5. С целью создания замкнутой полости на устье каналов накладывали кисетный шов. Среднее количество введенных клеток составляло около 80 млн. Система управления установкой находится в педали, при нажатии хирург подает лазерное излучение через кварцевый светодиод диаметром 0,4 мм. в импульсном режиме, мощностью 8 Вт., длительность импульса 20 мс., интервалами 20 мс.

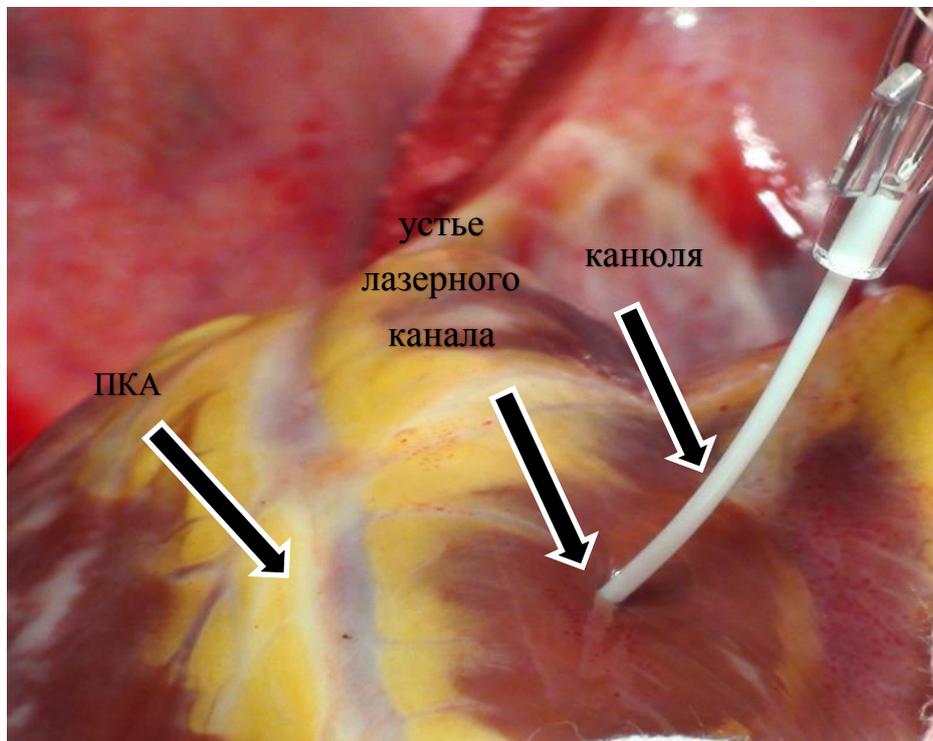


Рис. 5. Имплантация ККМ

2.4 СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫБОР КРИТЕРИЕВ ДОСТОВЕРНОСТИ.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ «STATISTICA 6.0», «Microsoft Excel». Эмпирические распределения данных исследовались на согласие с законом нормального распределения по критерию Шапиро-Уилка. Исследование выявило ненормальное распределение данных, вследствие чего для проверки гипотез о равенстве числовых характеристик выборочных распределений в сравниваемых группах использовались непараметрические критерии: непарный U-критерий Манна-Уитни, парный T-критерий Уилкоксона. При сравнении нескольких зависимых выборок применялся критерий ANOVA Friedman, Friedman SPSS Statistics. Статистические дескриптивные характеристики были представлены в виде медианы [первый квартиль; третий квартиль] для числовых данных.

Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p = 0,05$, то есть различие считалось статистически значимым, если $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В главе представлены исходные, ранние (через 2 недели) и отдаленные (через 6 и 12 месяцев) результаты после оперативного лечения.

3.1 Динамика изменения перфузии миокарда по данным сцинтиграфии с Технетрилом. Анализ первичной конечной точки.

Проведена оценка динамики коронарной перфузии в обеих группах исходно, в ближайший и отдаленный послеоперационный периоды (6, 12 месяцев). Определяющими величинами явились показатели глобальной перфузии миокарда левого желудочка, а также прицельно в области ПКА: стабильный дефект перфузии – (СДП), общий дефект перфузии – (ОДП), переходящий дефект перфузии – (ПДП).

Динамика стабильного дефекта перфузии, характеризующих необратимые рубцовые изменения миокарда и частично гибернирующего миокарда, выглядит следующим образом. В основной группе по результатам двухэтапной сцинтиграфии миокарда с Технетрилом (Тс99) до хирургического лечения средняя величина ОДП составила 9,0 [7,0; 13,5] площади миокарда нижней стенки ЛЖ, что указывает на наличие в миокарде ЛЖ зон постинфарктного кардиосклероза. Наряду с этим средняя величина стресс-индуцированного дефекта перфузии до операции составляла 3,0 [1,0; 12,0] площади миокарда нижней стенки ЛЖ и ПДП 4,0 [2,0; 7,0]. В группе контроля ОДП 16,0 [13,0; 19,0], СДП 9,0 [3,0; 15,0], ПДП 6,5 [4,0; 13,0] исходно.

Через 6 месяцев после хирургического вмешательства наблюдалось значимое улучшение миокардиальной перфузии, при этом имело место уменьшение величины как стойких дефектов перфузии, которые уменьшились в среднем до 2,0 [0,5; 4,2] ($p=0,008$), так и стресс-индуцированных дефектов – до 4,0 [1,5 ;6,3] ($p=0,05$), ПДП до 2,5 [0,5; 4,2], ($p=0,259$) рис. 6, 7, 8.

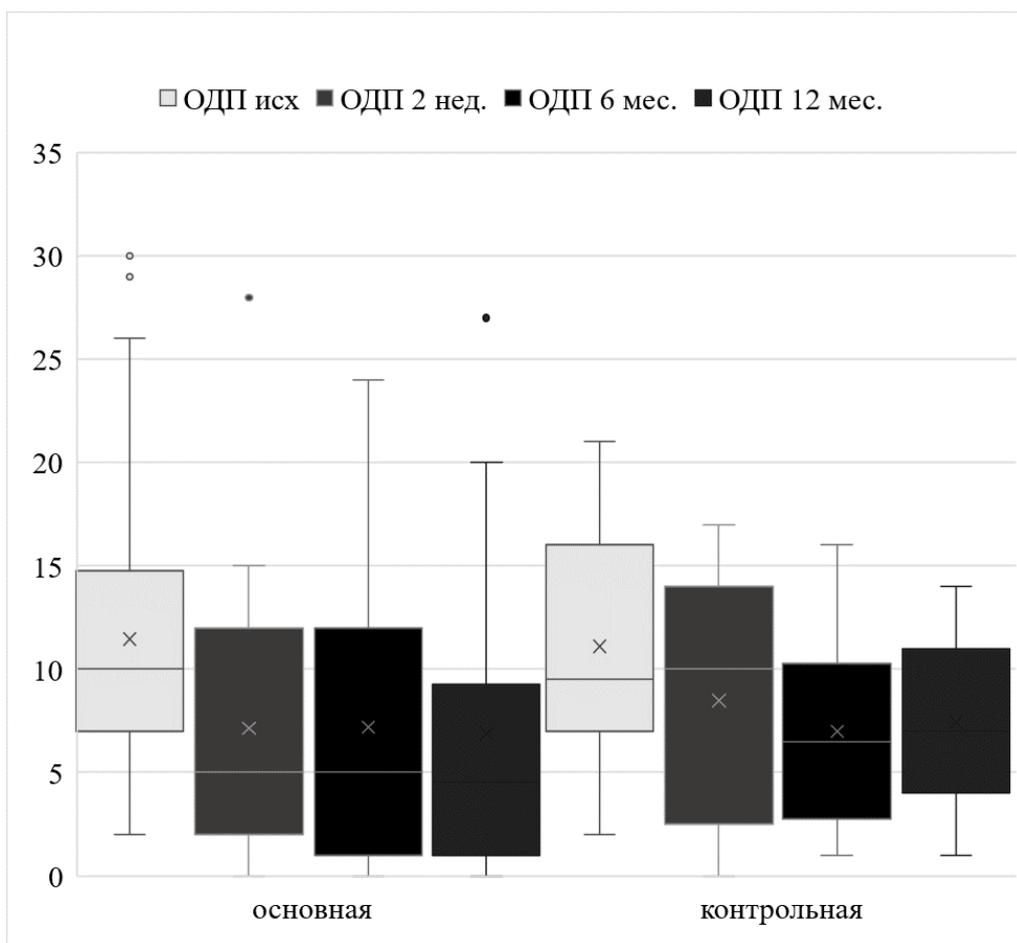


Рис. 6. Динамика общего дефекта перфузии в основной и контрольной группах исследования.

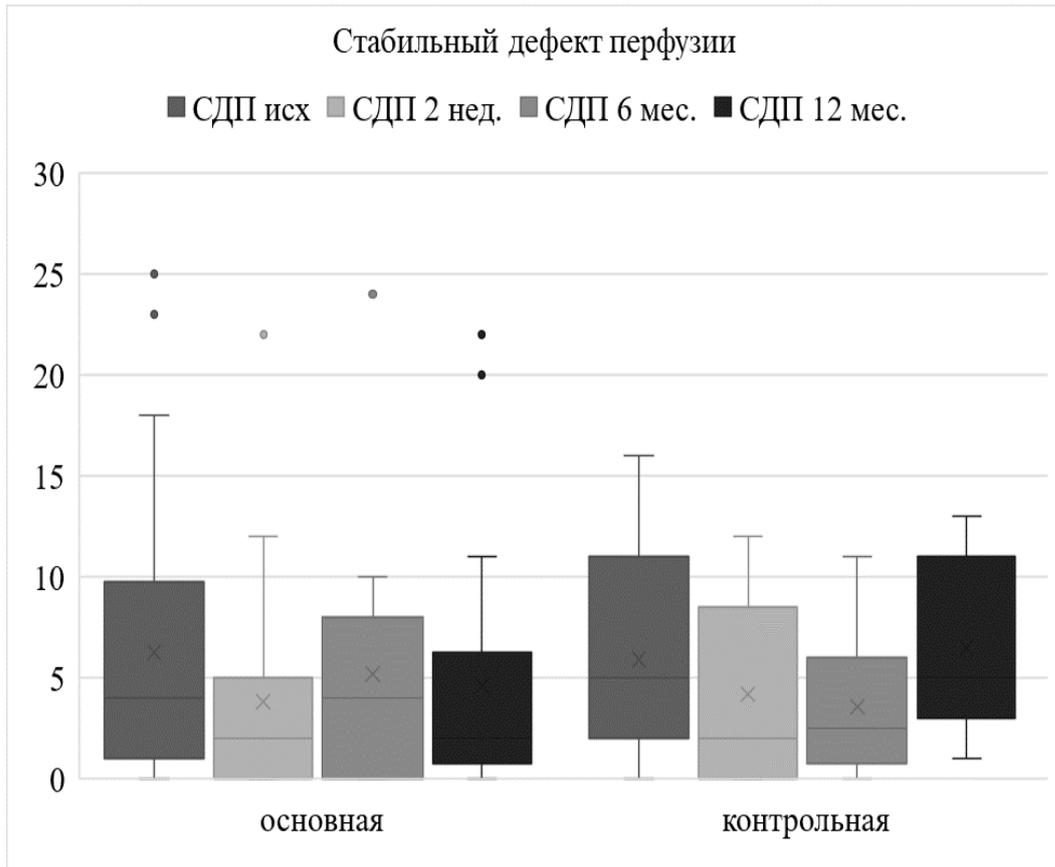


Рис. 7. Динамика стабильного дефекта перфузии в основной и контрольной группах исследования.

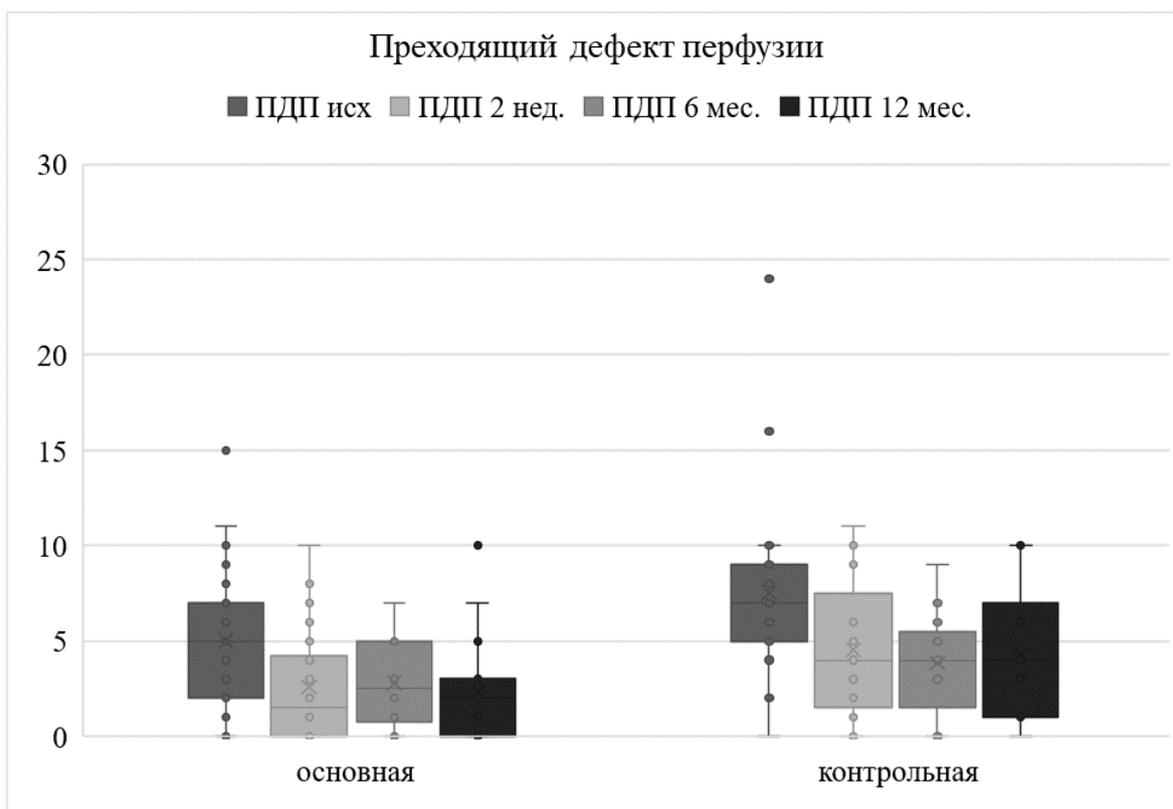


Рис. 8. Динамика преходящего дефекта перфузии в основной и контрольной группах исследования.

В контрольной группе через 6 месяцев значимой динамики перфузии нижней стенки ЛЖ не выявлено: 8,7 [5,3; 10,3] через 6 месяцев. Преходящий дефект 7,3 [6,1; 8,7] % исходно, 6,8 [5,3; 9,1] % через 6 месяцев ($p=0,21$), рис. 6, 7, 8. Томосцинтиграммы миокарда, полученные на пике стресс-теста с аденозином и в покое до и через 6 месяцев после оперативного лечения представлены на рисунке 9.

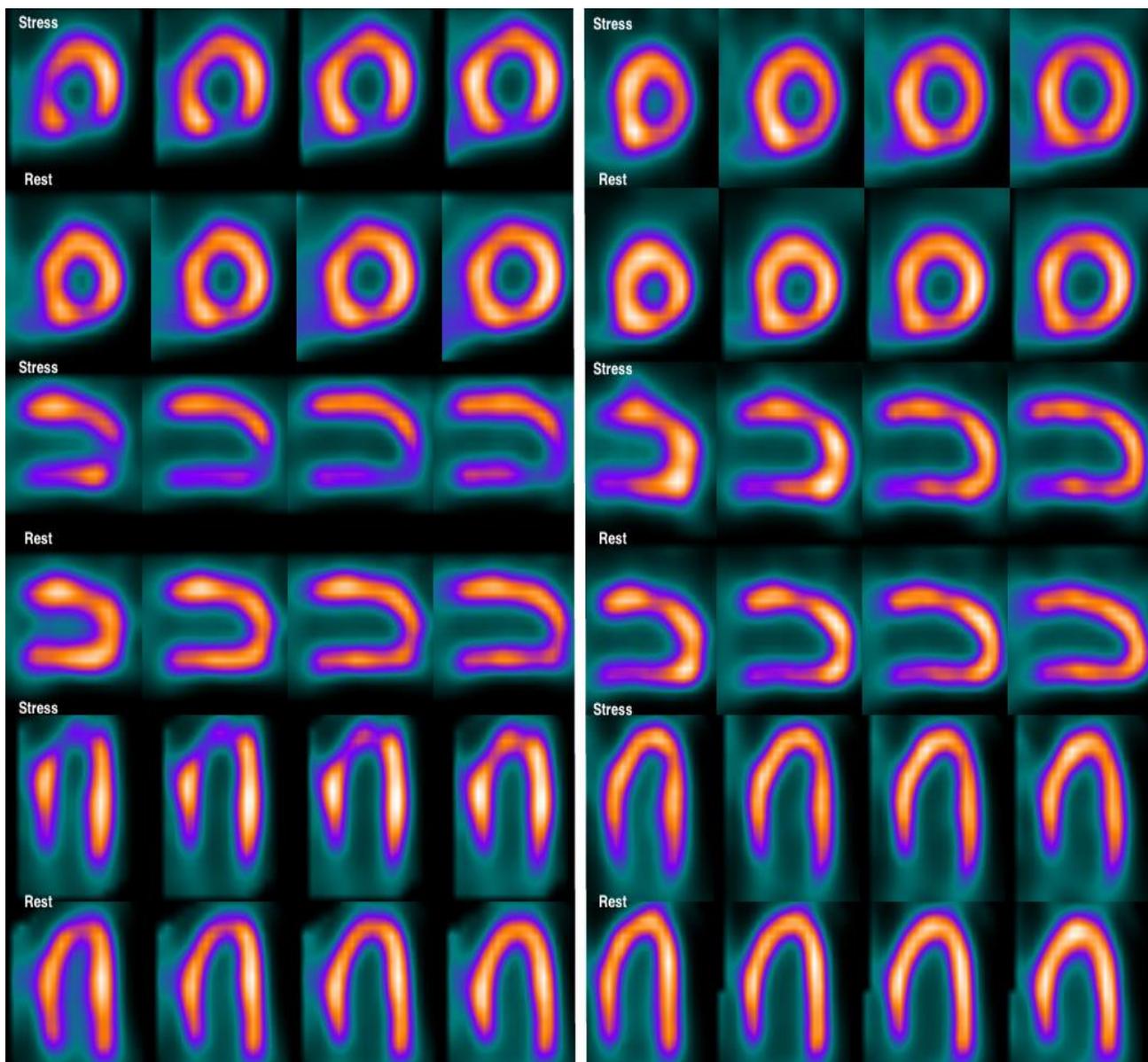


Рисунок 9. Перфузионная сцинтиграфия исходно (слева) и через 6 месяцев (справа).

При контрольном исследовании через 12 месяцев после интрамиокардиального введения ККМ, обработанных ЭПО, выявили значимое уменьшение ОДП как у пациентов из группы исследования с 9,0 [7,0; 13,5] до 5,0 [3,0; 10,5] ($p < 0,01$), так и у пациентов из группы контроля – с 16,0 [13,0; 19,0] до 9,0 [6,0; 13,0] ($p < 0,01$) рис. 6, 7, 8. При этом у пациентов из основной группы исследования также выявили уменьшение СДП с 3,0 [1,0; 12,0] до 2,0 [1,0; 6,5] ($p = 0,01$). У пациентов из группы контроля значимого уменьшения СДП не отмечалось (до лечения 9,0 [3,0; 15,0], через 12 месяцев после – 7,0 [2,0; 10,0], ($p = 0,266$)). ПДП в основной группе незначительно уменьшился с 4,0 [2,0; 7,0] до 2,0 [0,5; 4,0], в группе контроля значимое уменьшение с 6,5 [4,0; 13,0] до 3,5 [2,0; 5,0], ($p = 0,003$). Данные перфузионной ОФЭКТ миокарда с ^{99m}Tc -МИБИ представлены в таблице 5.

Таблица 5

Данные перфузионной ОФЭКТ миокарда с ^{99m}Tc - МИБИ до и после оперативного лечения.

Показатель	Группа	Исходно	12 мес.	p
ОДП	I	9,0[7,0;13,5]	5,0[3,0;10,5]	<0,001
	II	16,0[13,0;19,0]	9,0[6,0;13,0]	0,001
СДП	I	3,0[1,0;12,0]	2,0[1,0;6,5]	0,011
	II	9,0[3,0;15,0]	2,0[7,0;10,0]	0,266
ПДП	I	4,0[2,0;7,0]	2,0[0,5;4,0]	0,111
	II	6,5[4,0;13,0]	3,5[2,0;5,0]	0,003
ОДП в бассейне ПКА	I	7,0[5,5;10,5]	4,0[1,0;5,5]	<0,001
	II	8,0[6,0;12,0]	5,0[4,0;7,0]	0,003
СДП в бассейне ПКА	I	3,0[0,0;7,0]	1,0[0,0;3,5]	0,003
	II	4,0[1,0;7,0]	2,0[1,0;6,0]	0,133
ПДП в бассейне ПКА	I	3,0[1,0;4,0]	1,0[0,0;2,0]	0,025
	II	2,0[1,0;3,0]	1,0[0,0;2,0]	0,105

Прицельно оценивали перфузию миокарда в бассейне кровоснабжения ПКА у пациентов из основной группы исследования через 12 месяцев выявили уменьшение ОДП ПКА с 7,0 [5,5; 10,5] до 4,0 [1,0; 5,5] ($p < 0,01$), СДП ПКА – с 3,0 [0,0; 7,0] до 1,0 [0,0; 3,5] ($p < 0,01$) и ПДП ПКА – с 3,0 [1,0; 4,0] до 1,0 [0,0; 2,0] ($p = 0,03$) таблица 5. У пациентов из группы контроля в бассейне кровоснабжения

ПКА выявили значимое уменьшение только ОДП ПКА – с 8,0 [6,0; 12,0] до 5,0 [4,0; 7,0] ($p < 0,01$), рисунок 10.

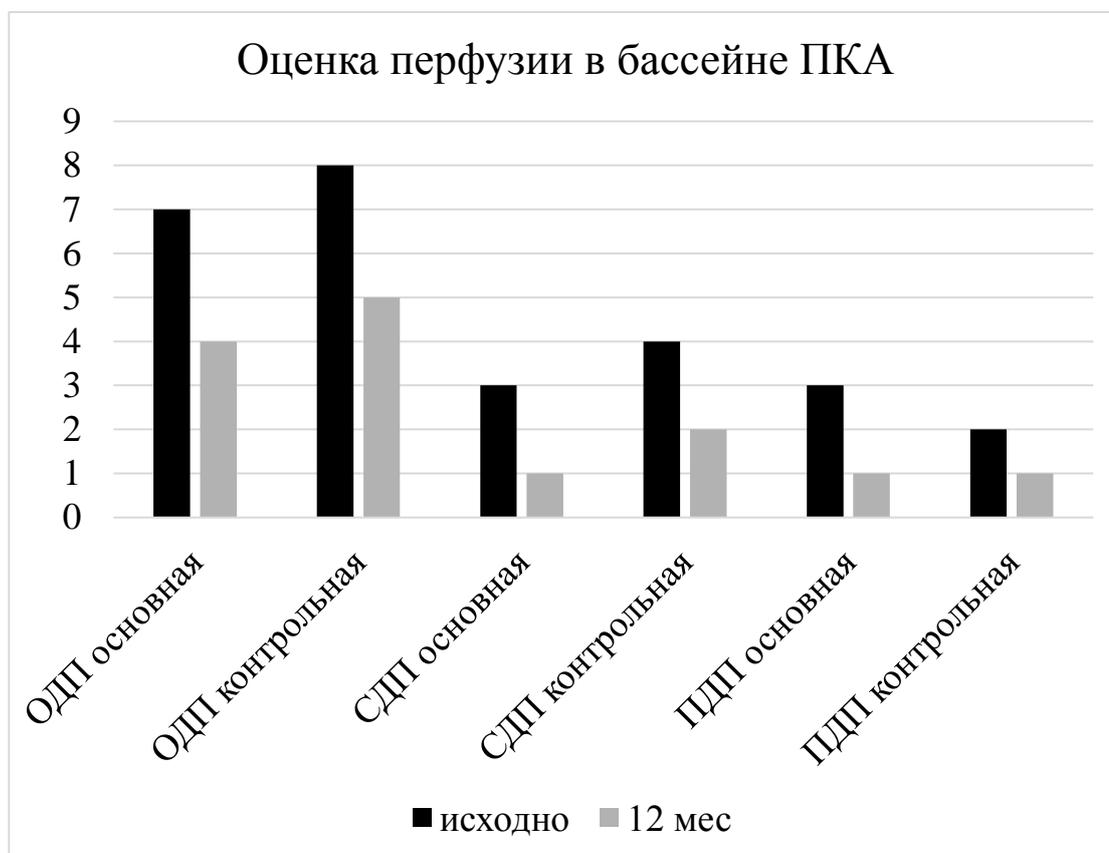


Рис. 10. Динамика данных перфузионной сцинтиграфии до и через 12 месяцев после оперативного лечения.

Пациенты из группы исследования с уменьшением ОДП ПКА $\geq 3,0$ баллов при контрольном исследовании через 12 месяцев после оперативного лечения были определены в подгруппу респондентов, соответственно пациенты с уменьшением ОДП ПКА $\leq 3,0$ баллов – в подгруппу нереспондентов. Значение изменения ОДП ПКА на 3,0 балла для разделения пациентов на подгруппы определено как медиана изменения ОДП ПКА.

3.2 Ближайшие и отдаленные клинические результаты метода интрамиокардиального введения аутологичных клеток КМ, обработанных эритропоэтином, в хирургии ИБС.

Процедура забора аспирата КМ переносилась без осложнений, постпункционных кровотечений, гематом не выявлено. Процедура КШ выполнялась в условиях искусственного кровообращения по стандартной технологии. В послеоперационном периоде не выявлено нарушений сердечного ритма и проводимости. На завершающем этапе операции после прекращения окклюзии аорты у всех пациентов отмечалось самостоятельное восстановление сердечной деятельности. Не было значимой разницы во времени пребывания в палате интенсивной терапии: 22 [19; 24] часов в основной группе и 24 [21; 25] часов в контрольной ($p=0,54$).

Смерть на госпитальном этапе зафиксирована у одного пациента из основной группы (периоперационный ИМ боковой стенки - не в зоне непрямо́й реваскуляризации), у одного пациента из группы контроля, также вследствие периоперационного ИМ. По данным ЭХО КГ обследования в указанные сроки не было обнаружено интрамиокардиальных опухолей и неопластических процессов другой локализации.

Исходно большинство пациентов из обеих групп имели стенокардию напряжения - III ФК и II ФК. При оценке ФК стенокардии (CCS) через 6 месяцев после операции выявлено значимое уменьшение выраженности стенокардии в обеих группах, более выраженное в основной группе ($p=0,032$): 35,7% пациента

имели I ФК (CCS), 64,3% стенокардии не имели. В группе контроля исходно 16,6% пациентов имели II ФК (CCS), 71,2% III ФК, 3,3% IV ФК, 8,9% с нестабильной стенокардией, через 6 месяцев 45,2% пациента имели I ФК (CCS), 54,8% пациентов стенокардии не имели.

Через 12 месяцев после операции выраженность стенокардии в обеих группах осталась практически на том же уровне в обеих группах: 32,5% пациента имели I ФК (CCS), 65% стенокардии не имели, 2,5%(1 пациент) – III ФК (CCS). В группе контроля 45,2% пациента имели I ФК (CCS), 52,3% пациентов стенокардии не имели. В обеих группах выявлен возврат стенокардии у 1 пациента (III ФК), при работающих коронарных шунтах по данным коронарошунтографии, таблица 6.

Таблица 6.

Оценка ФК стенокардии (CCS)

Группы	0 ФК	I ФК	II ФК	III ФК	IV ФК	Нестабильная стенокардия
I исходно	0 (0%)	0 (0%)	16,2%	78,3%	0 (0%)	5,4%
I через 6 мес. p=0,032	64,3%	37,5%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
I через 12 мес. p=0,031	65%	32,5%	0 (0%)	2,5%	0 (0%)	0 (0%)
II исходно	0 (0%)	0 (0%)	16,6%	71,2%	3,3%	8,9%
II через 6 мес. p=0,035	54,8%	45,2%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
II через 12 мес. p=0,033	52,3%	45,5%	0 (0%)	2,5%	0 (0%)	0 (0%)

Выполнялась оценка функционального класса сердечной недостаточности по NYHA. Исходно в основной группе 62,1% пациентов имели II ФК (NYHA), 37,9% - III ФК (NYHA). В контрольной группе 56,6% пациентов имели III ФК (NYHA), 40% пациентов имели II ФК (NYHA), 3,3% имели I ФК (NYHA).

При оценке степени выраженности сердечной недостаточности через 6 месяцев отметили значимое уменьшение ФК (NYHA) в обеих группах (при межгрупповом сравнении разница недостоверна): в основной группе 85% пациентов имели I ФК (NYHA), 15% - II ФК (NYHA) ($p=0,042$); в контрольной – 82,5% пациентов - I ФК (NYHA), 17,5% -II ФК (NYHA) ($p=0,026$). Через 12 месяцев после оперативного вмешательства выраженность сердечной недостаточности в основной группе осталась на прежнем уровне, тогда как контрольная группа продемонстрировала небольшое ухудшение: в основной группе 80% пациентов имели I ФК (NYHA), 17,5% - II ФК (NYHA), 2,5% - III ФК(NYHA) ($p=0,21$); в контрольной - 75% пациентов - I ФК (NYHA), 17,5% -II ФК (NYHA), 7,5% - III ФК (NYHA ($p=0,048$), таблица 7. Достоверной разницы между группами через 12 месяцев не получено.

Оценка сердечной недостаточности ФК (NYHA)

Группы	I ФК (NYHA)	II ФК (NYHA)	III ФК (NYHA)	IV ФК (NYHA)
I исходно	0 (0%)	62,1%	37,9%	0 (0%)
I через 6 месяцев p=0,042	85%	15%	0 (0%)	0 (0%)
I через 12 месяцев p=0,21	80%	17,5%	2,5%	0 (0%)
II исходно	3,3%	40%	56,6%	0 (0%)
II через 6 месяцев p=0,026	81,3%	18,7%	0 (0%)	0 (0%)
II через 12 месяцев p=0,048	75%	17,5%	7,5%	0 (0%)

По данным опросника SF-36 клиническая эффективность исследуемого метода в отдаленном периоде наблюдения проявляется статистически достоверной положительной динамикой интенсивности боли (BP) в обеих группах в сравнении с предоперационными данными. Уровень физической боли, которая влияет на физическую активность и отрицательно сказывается на качестве жизни, значительно снизился, что отразилось в увеличении баллов показателя интенсивности боли (BP) с 41 [35, 44] до 52 [47, 54] (p=0,01) и с 51

[47, 54] до 64 [59, 67] ($p=0,04$) в обеих группах. Также в группах отмечается значительное увеличение возможности выполнения физических нагрузок. Показатель физического функционирования в группе непрямо́й реваскуляризации вырос с 35 до 58 ($p=0,03$), в контрольной группе - с 47 [42, 51] до 62 [58, 65] ($p=0,2$).

Несмотря на возросшую физическую активность и снижение интенсивности боли, в группах пациенты стали более пессимистично воспринимать предшествующее, настоящее состояние здоровья и его перспективы. Количество баллов в основной группе достоверно снизилось с 72 [57;77] до 50 [41, 53] ($p=0,03$), что сопоставимо с данными контрольной группы. Статистически значимой разницы между группами по показателям SF36 не получено. Ниже представлены статистически значимые результаты расчетов ($M \pm m$) изменений показателей качества жизни, таблица 8, 9.

Таблица 8

Результаты расчетов основных показателей качества жизни ($M \pm m$)

Показатель	I исходно	I 6 мес.	I 12 мес.	II исходно	II 6 мес.	II 12 мес.
GH	45,35±14,89	60,57±8,82	53,33±10,22	43,52±13,26	55,88±11,5	61,12±8,37
PF	36,57±27,59	64,54±20,99	65,55±20,49	39,13±17,75	69,41±20,69	73,75±15,13
RP	32,88±19,38	43,18±31,19	65,55±20,37	21,54±15,09	61,76±33,21	65,62±34,37
RE	43,72±20,95	53,01±37,87	44,42±29,62	37,45±24,60	64,72±37,89	66,66±41,66
SF	52,37±10,56	74,45±13,34	75±8,3	47,7±15,28	86,17±12,77	76,56±14,45
BP	54,15±16,60	59,54±20,36	63,15±15,4	49,67±10,87	80,82±16,16	79,5±13,75
VT	45,28±21,64	59,31±14,89	63,33±9,62	48,9±23,1	63,23±11,48	69,37±8,12
MH	57,34±10,43	64,9±10,44	68±8	60,1±9,9	68,47±8,02	71,5±8,372

Таблица 9

Результаты расчетов основных показателей качества жизни по критерию Фридмана

Показатель	P - значение	
	Основная группа	Контрольная группа
GH	0,247	0,58
PF	0,074	0,013
RP	0,678	0,022
RE	0,589	0,040
SF	0,015	0,091
BP	0,04	0,032
VT	0,143	0,538
MH	0,015	0,17

Анализ теста 6-минутной ходьбы выявил достоверное увеличение пройденного расстояния в обеих группах, более выраженное в группе непрямо́й реваскуляризации. В основной группе исходно пройденное расстояние составило 326 [321, 328] метров, через 6 месяцев после операции - 390 [382, 395] метров ($p=0,012$). Соответствующие показатели в группе контроля: 306 [302, 315], 341 [344, 348] ($p=0,001$), рисунок 11. Через 12 месяцев в основной группе пройденное - 378 [318, 411] метров ($p=0,07$), в группе контроля 360 [331, 445] ($p=0,12$).



Рис. 11. Тест 6-минутной ходьбы (метры) $p < 0,05$

3.3 Динамика глобальной и сегментарной сократимости по данным эхокардиографии и тканевой доплерографии.

По данным Эхо-КГ отмечается тенденция к улучшению функциональных показателей ЛЖ, более значимая в основной группе пациентов: ФВ ЛЖ – 54 [51; 58] исходно, через 2 недели 55 [49; 60], через 6 месяцев 58 [57; 63] ($p=0.041$) и 57 [48; 64] через 12 месяцев, в контрольной группе – с исходно 58 [52; 63] и через 2 недели 58 [52; 64] до 56 [52; 61] через 6 месяцев, через 12 месяцев – 57 [49; 63] ($p=0,67$), рисунок 12.

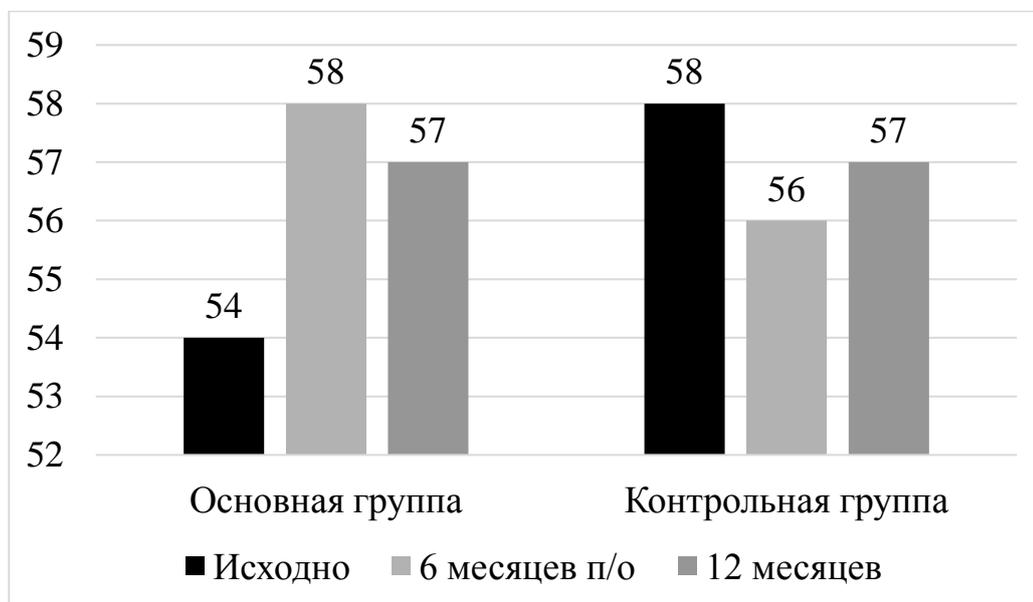


Рисунок 12. Динамика фракции выброса левого желудочка в группа

Локальная сократимость: в основной группе выявлено статистически недостоверное уменьшение количества зон гипокинеза нижней стенки через 6 месяцев после операции. В группе контроля выявлено увеличение зон гипокинеза, получена достоверная динамика (Friedman SPSS Statistics, $p = 0,027$). Достоверной разницы между группами через 12 месяцев не получено.

Среднее значение КДО ЛЖ в основной группе до операции составило $110,13 \pm 30,52$ мл, через 2 недели после операции - $97,76 \pm 21,49$ мл, через 6 месяцев - $111,09 \pm 28,55$ мл и через 12 месяцев - $118,28 \pm 32,96$ мл. Различия внутри группы статистически незначимые (Friedman SPSS Statistics, $p = 0,401$).

В контрольной группе среднее значение КДО ЛЖ до операции - $101,96 \pm 19,15$ мл, через 2 недели после операции - $94,17 \pm 15,19$ мл, через 6 месяцев - $98,84 \pm 16,88$ мл и через 12 месяцев - $102,12 \pm 15,64$ мл. Различия внутри группы статистически незначимые (Friedman SPSS Statistics, $p = 0,606$).

Среднее значение КСО ЛЖ в основной группе до операции составило $49,14 \pm 18,74$ мл, через 2 недели после операции $48,08 \pm 21$ мл, через 6 месяцев $47,8 \pm 19,39$ мл и через 12 месяцев $53,71 \pm 23,31$ мл, статистически значимые различия внутри группы (Friedman SPSS Statistics, $p = 0,035$).

Различия между группами в ближайшие ($p = 0,695$) и отдаленные периоды времени не имеют достоверных различий (Friedman SPSS Statistics, $p = 0,801$).

Различия между двумя группами показателя КСО ЛЖ в ближайший и отдаленные (6, 12 месяцев) периоды также не имели статистически достоверных различий (Friedman SPSS Statistics, $p = 0,655$ и $p = 0,172$ соответственно).

Динамика основных параметров функции ЛЖ ($M \pm m$) в исследуемых группах представлена в таблице 10.

Таблица 10

Показатель	Группа	До операции	Через 2 недели	Через 6 месяцев	Через 12 месяцев	P*
ФВ ЛЖ (%)	I	56,32±6,8 7	54,72±6,0 9	57,77±9,2 1 p=0.041	56,95±7,8 5	0,065
	II	59,12±7,1 8	56,83±6,7	59,31±5,4 9	58,5±6,31	0,656
КДО ЛЖ (мл)	I	110,13±3 0,52	97,76±21, 49	111,09±2 8,55	118,28±3 2,96	0,401
	II	101,96±1 9,15	94,17±15, 19	98,84±16, 88	102,12±1 5,64	0,606
КСО ЛЖ (мл)	I	49,14±18, 74	48,08±21	47,8±19,3 9	53,71±23, 31	0,035
	II	42,62±14, 70	52,71±21, 46	41,7±12,0 8	43,25±11, 46	0,241
Кол-во зон акинеза	I	1,18±1,45	0,96±1,39	1,34±2,5	1,9±1,8	0,457
	II	1,43±1,60	1,33±1,60	1,88±1,67	1,37±1,59	0,151

Кол-во зон	I	1,32±1,43	1,52±1,99	1,83±0,88	1,42±1,37	0,268
гипокинеза	II	0,62±0,82	0,44±0,69	0,77±0,95	1±1	0,027

Анализ тканевой доплерографии показателей продольной деформации Strain нижней стенки левого желудочка (целевой участок миокарда) в основной группе при исходном Strain - 14,7 [14,1;15,2] выявлено небольшое ухудшение показателей непосредственно после операции (через 2 недели) до - 12,6 [12,1; 12,9], с последующим улучшением показателей до 15,6 [15,2;15,8] (p=0,04) через 6 месяцев, через 12 месяцев показатели остались на прежнем уровне - 15,15 [13,07;18,05] (Friedman SPSS Statistics p=0,156) данные представлены на рисунке 13.

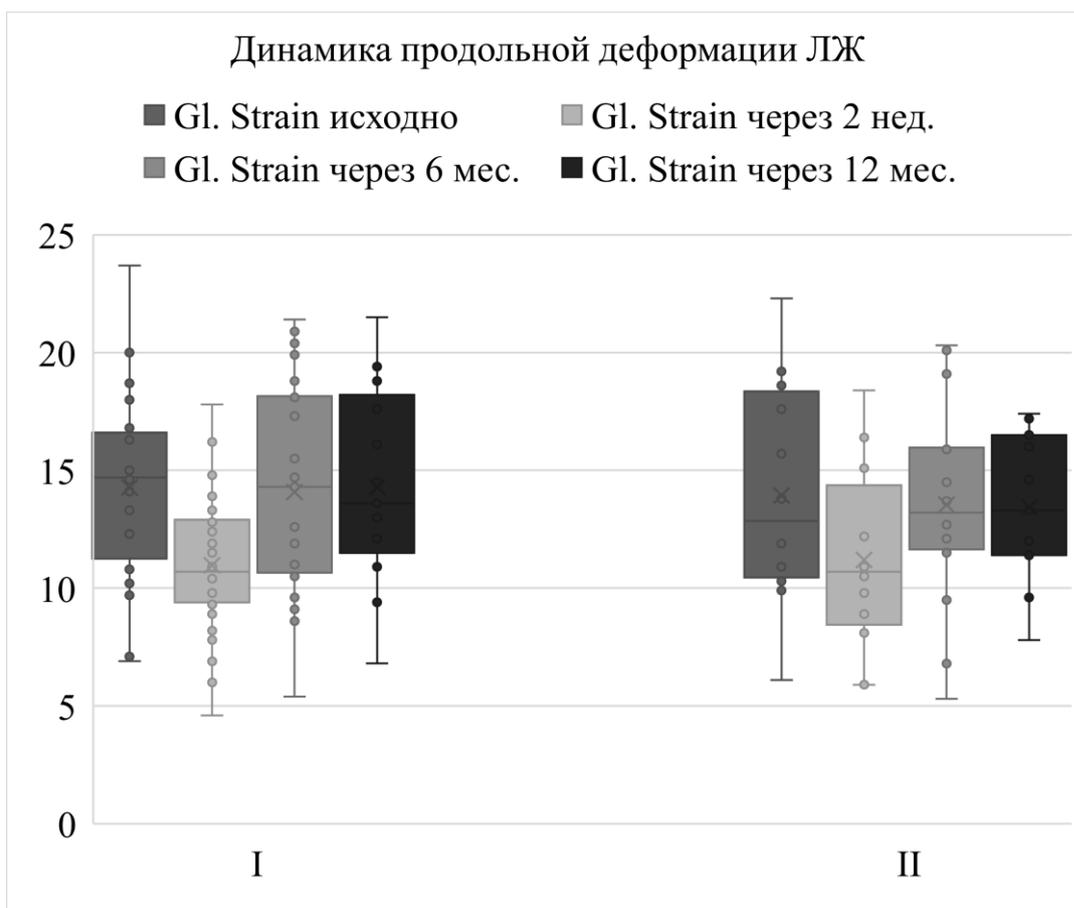


Рисунок 13. Динамика продольной деформации ЛЖ.

В контрольной группе при ухудшении показателей через 2 недели после операции с 16,5 [16,2;16,8] до 13,06 [12,7;13,3], через 6 месяцев показатели возвращаются к предоперационным данным: 16,18 [15,7, 16,3], через 12 месяцев показатели остаются прежними. Анализ индекса скорости деформации нижней и задней стенок Strain Rate в обеих группах значимой динамики не выявил, данные представлены на рисунке 14,15.

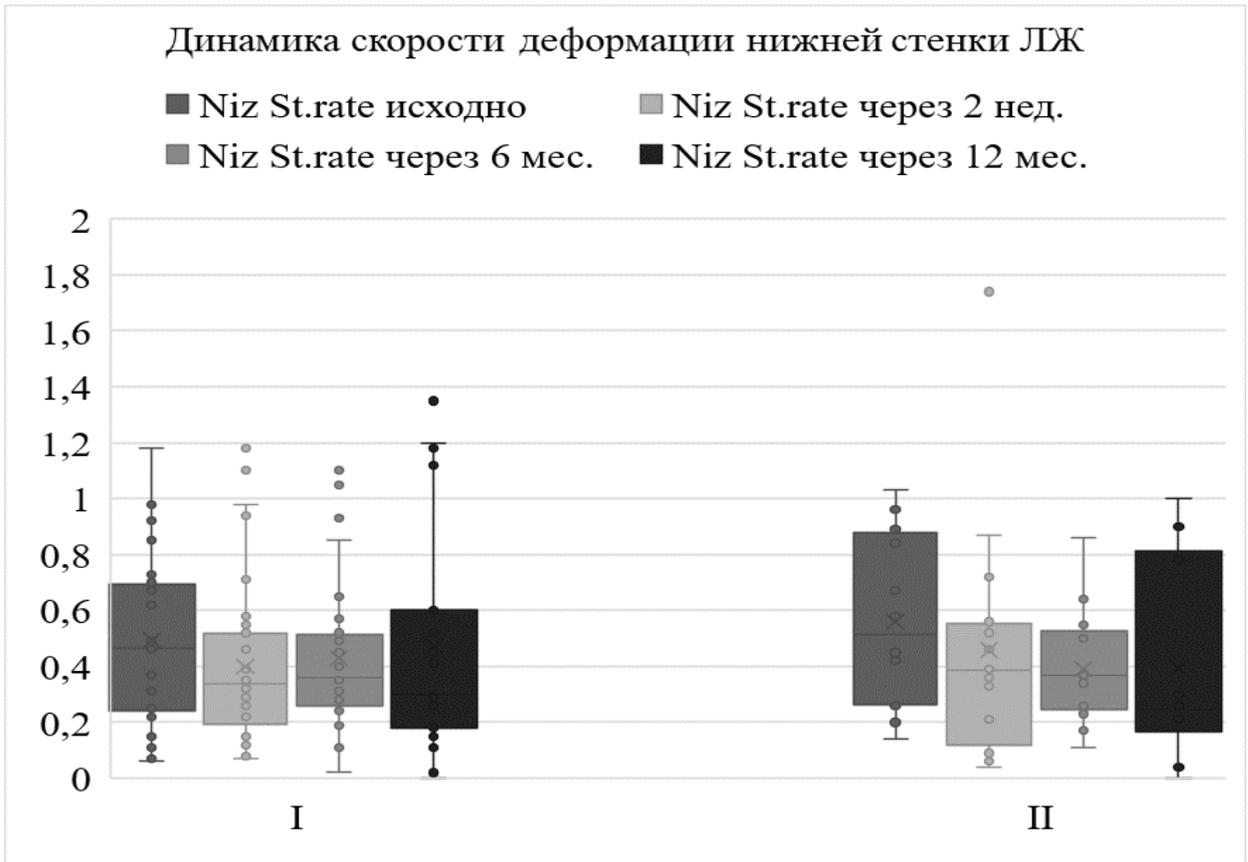


Рисунок 14. Динамика скорости деформации нижней стенки ЛЖ

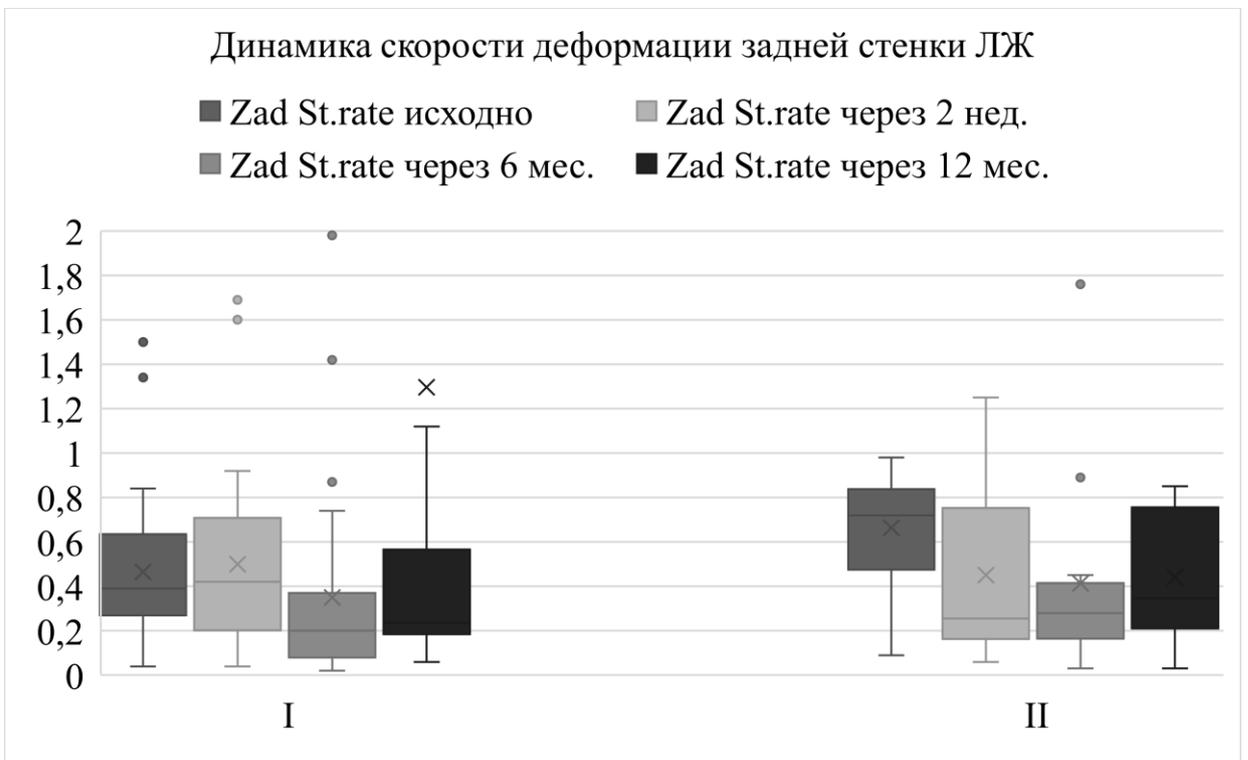


Рисунок 15. Динамика скорости деформации задней стенки ЛЖ

3.4 Параметры жизнеспособности миокарда по данным МРТ сердца с контрастированием и ОФЭКТ с 123-I-MIBG.

С целью определения жизнеспособного миокарда пациентам в группе с интрамиокардиальной инъекцией стволовых клеток проводилось МРТ сердца с контрастным усилением до хирургического лечения, через 6 и 12 месяцев после операции. При анализе данных МРТ сердца с отсроченным контрастированием рассчитывали показатель нежизнеспособного миокарда (МНМ) в граммах. В ходе исследования рассчитаны объемы показателей и сократимости миокарда ЛЖ.

Через 6 месяцев наблюдения в группе клеточной терапии отмечалось недостоверное уменьшение абсолютной массы нежизнеспособного миокарда (МНМ) на 4 грамма, и относительная МНМ снизилась также недостоверно на 5% (с 45 [37; 51] % до 40 [34; 48] %) по сравнению с дооперационными значениями. В ходе наблюдения ФВ ЛЖ статистически значимо возросла на 6% (с 39 [36; 42] % до 45 [35; 49] %). В группе контроля достоверной динамики также выявлено не было. Также не получили достоверной разницы между показателями до операции и через 6 мес.

При оценке через 12 месяцев наблюдения функционального состояния и структуры миокарда ЛЖ статистически значимых изменений фракции выброса, ударного, конечно-диастолического и конечно-систолического объемов, а также объема и процентного содержания рубцовой ткани в миокарде ЛЖ, по данным МРТ, сердца не выявили, как в группе исследования, так и в группе контроля.

Вместе с тем, у всех обследуемых наблюдалась положительная динамика со стороны функциональных показателей, а также уменьшение степени захвата контрастного вещества, что может свидетельствует о наличии минимально выраженного ангиогенеза.

Симпатическая иннервация миокарда

Состояние симпатической активности (иннервации) миокарда оценивали через 4 часа после внутривенного введения ^{123}I -МИБГ. Региональную симпатическую иннервацию определяли по площади дефекта накопления радиофармпрепарата в сегментах нижней стенки левого желудочка, если таковой имел место. Площадь дефекта иннервации (ПДИ), отражающую распространенность нарушения симпатической активности, рассчитывали в процентах от площади миокарда левого желудочка.

Результаты сцинтиграфии с МИБГ демонстрируют значимое уменьшение ПДИ в сегментах нижней стенки ЛЖ через 6 месяцев после операции в основной группе: с 15,4 [14,2, 16,3] % до 11,7 [9,3, 13,2] % ($p=0,045$). В контрольной группе выявлено недостоверное уменьшение ПДИ: 14,3 [10,2, 17,3] % исходно, 13,8 [9,1, 14,2] % через 6 месяцев ($p=0,14$), рисунок 16. Через 12 месяцев при оценке симпатической иннервации миокарда ЛЖ до и после оперативного вмешательства по данным сцинтиграфии с ^{123}I -МИБГ не выявили статистически значимых изменений показателей симпатической активности, как

в группе исследования, так и в группе контроля, рисунок 16.

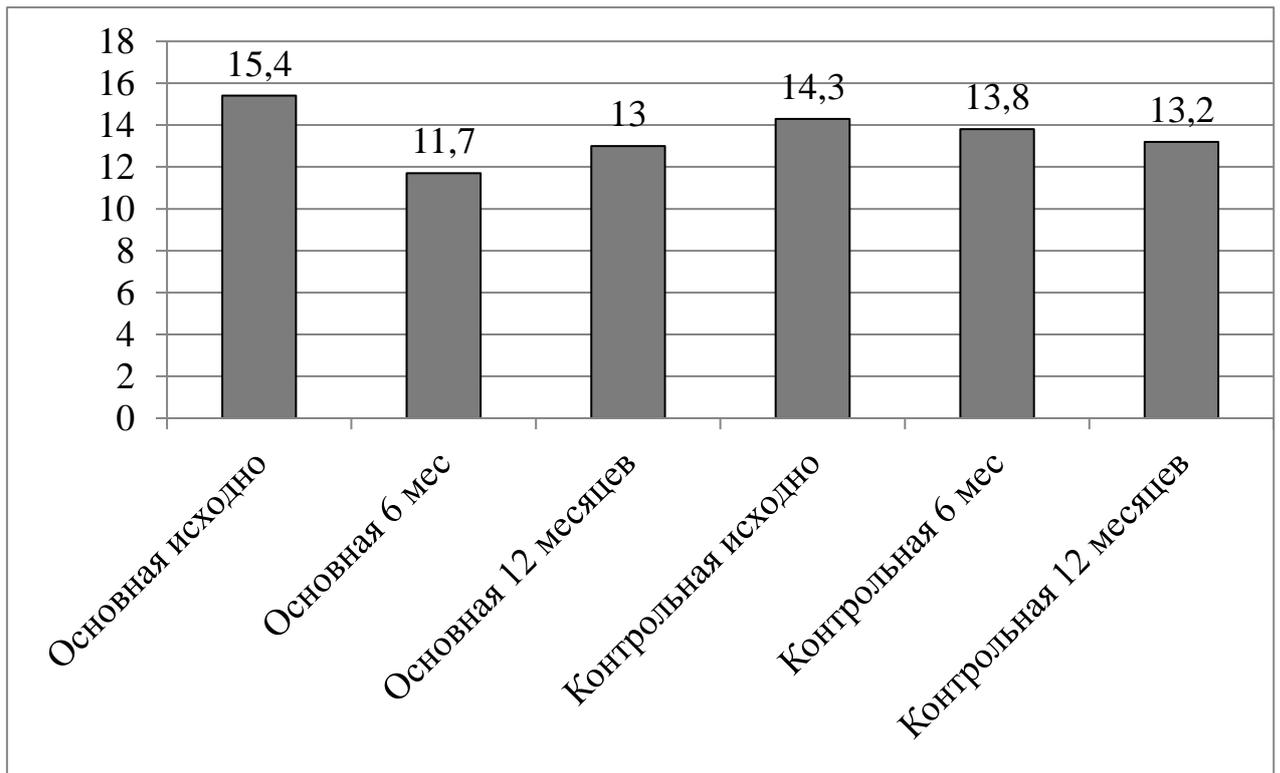


Рисунок 16. Площадь дефекта иннервации.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Резюмируя все вышеизложенное, можно сделать вывод, что метод интрамиокардиальной имплантации аутологичных ККМ, обработанных эритропоетином, эффективен в отношении улучшения перфузии и функционального состояния миокарда, а также клинического статуса пациентов. Однако, оценка симпатической иннервации миокарда, параметры тканевой доплерографии и показатели МНМ не показали убедительной положительной динамики.

Долгие годы ИБС является одним из самых распространенных заболеваний и одной из основных причин смертности взрослого населения (Стабильная ишемическая болезнь сердца, 2020 г.). Попытки лечения и восстановления утраченной функции миокарда были, начиная уже с конца 19-го века до тех пор, пока не был выверен «золотой стандарт» хирургического лечения ИБС – коронарное шунтирование. Однако, со временем стало ясно, что прямая реваскуляризация миокарда не всегда технически возможна, и в ряде случаев не позволяет достичь полной реваскуляризации миокарда. Диффузное и/или дистальное поражение коронарных артерий, артерии малого диаметра, случаи сложного поиска артерий при повторном шунтировании – все это проблемы коронарной хирургии. Встречаемость диффузного и дистального поражения коронарных артерий растет с каждым годом. У таких пациентов ИБС протекает с тяжелой стенокардией, часто рефрактерной к медикаментозной терапии [4]. Не мало пациентов с коронарными артериями малого диаметра (менее 1 мм),

шунтирование которых не всегда возможно даже с применением такого высокотехнологичного устройства как операционный микроскоп. Коронарные артерии в таких ситуациях остаются не оперированными, и проблема ИБС у пациента не решается.

Именно поэтому, на современном этапе лечения ИБС, возлагается надежда на клеточные технологии. Клеточная трансплантация является одним из самых обсуждаемых методов лечения поврежденной ткани миокарда. Подтверждением тому является большое количество работ, опубликованных в мировых изданиях по клиническому применению клеточных технологий при остром инфаркте миокарда, хронической сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца и ряде других патологий сердечно-сосудистого профиля.

Но и сама клеточная терапия неидеальна и требует доработок. Несмотря на положительные результаты многих крупных исследований (TOPCARE – AMI, ASTAMI, BOOST, REPAIR – AMI и т.д.) [7; 112], подтвердивших выполнимость и безопасность процедур введения клеток, улучшение функции левого желудочка, остается ряд вопросов и проблем, с которыми сталкивается клеточная терапия. Основные причины – разные способы доставки клеток; количество и возраст пациентов; вариабельность выбора популяции клеток; доступное количество фракционированных клеток, происходящих из КМ, невелико; репликативная способность взрослых СК *in situ* ограничена по сравнению с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) и индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК) [99; 116]. Еще одним важным

вопросом, который мы и пытались решить, является выживаемость и жизнеспособность введенных клеток КМ в агрессивную для них среду (окислительный стресс).

Новосибирский «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России обладает положительным опытом применения клеточной терапии у больных с ИБС начиная с 2008 года [27; 35]. Усовершенствованием уже известных методик, стало применение эритропоэтина в качестве повышения функционального статуса вводимых ККМ.

В настоящей работе на основании комплексного клинико-инструментального обследования, включая инвазивные методы, всем пациентам установлен диагноз хроническая ИБС и наличие диффузного и/или дистального поражения бассейна ПКА, а также наличие доказанного скintiграфическим исследованием жизнеспособного (гибернированного) миокарда в области ПКА. Рандомизация происходила с помощью метода запечатанных непрозрачных конвертов на две группы. В первую вошли 50 пациентов, которым было выполнено КШ и интрамиокардиальное введение аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином. В группу 2 (контрольную) было включено 50 пациентов, которым было выполнено только КШ. Период наблюдения составил 6 и 12 месяцев.

В данном исследовании была оценена безопасность интрамиокардиального введения аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином, по результатам которой: забор аспирата КМ переносился

хорошо, постпункционных кровотечений и гематом выявлено не было; в местах формирования трансмиокардиальных лазерных каналов кровотечений не было; не выявлено нарушений сердечного ритма и проводимости. На завершающем этапе операции после прекращения окклюзии аорты у всех пациентов отмечалось самостоятельное восстановление сердечной деятельности. Не было значимой разницы во времени пребывания в палате интенсивной терапии: 22 часов в основной группе и 24 часов в контрольной ($p=0,54$). Послеоперационный период протекал без осложнений. По результатам ЭХО-КГ не было зарегистрировано интрамиокардиальных опухолей или неопластических процессов. На госпитальном этапе у одного пациента из основной группы зафиксирован летальный исход в результате периоперационного инфаркта миокарда боковой стенки - не в зоне непрямой реваскуляризации. Учитывая, то что любое кардиохирургическое вмешательство несет за собой определенные риски (периоперационный инфаркт миокарда, летальность) связать это именно с введением в миокард ККМ, обработанных эритропоэтином, очень сложно. Подтверждение тому, выводы о безопасности клеточных технологий в заболеваниях сердечно-сосудистого профиля [27; 35; 89; 90; 91; 92; 96], а также применение самого эритропоэтина [103; 108; 110].

При проведении оценки данных перфузионной сцинтиграфии с Технетрилом в двух группах, исходно и через 6 и 12 месяцев после рандомизации, нами были получены следующие результаты: через 6 месяцев наблюдалось статистически значимое улучшение миокардиальной перфузии,

при этом имело место уменьшение величины как стойких дефектов перфузии, так и стресс-индуцированных дефектов, тогда как в контрольной группе показатели оставались прежними. Через 12 месяцев показатели стресс-дефекта и стабильного дефекта перфузии в основной группе улучшились с 7.0 до 4.0 и 3.0 до 1.0 соответственно. Тогда как у пациентов в контрольной группе выявили значимое уменьшение только стресс-дефекта с 8.0 до 5.0, $p < 0.01$).

Таким образом, на основании полученных результатов исследования можно заключить, что интрамиокардиальная имплантация аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином улучшает общую и сегментарную коронарную перфузию в отдаленном периоде наблюдения. Следует отметить, что во многих работах именно ОФЭКТ является одним из ведущих методов исследования. Так, например, Ramshorst и соавт. в своем двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании, с участием 50 пациентов с хронической ИБС, отметили статистически значимое улучшение перфузии миокарда по сравнению с группой плацебо [117]. Улучшение миокардиальной перфузии продемонстрировали Lee JW и соавторы, с участием 80 пациентов с ОИМ через 6 месяцев после интракоронарного введения клеточного материала [118]. Однако, некоторые исследования не применяли ОФЭКТ или же не получили статистически значимых и долговременных результатов [119].

Улучшение клинического статуса пациентов за счет значимого уменьшения выраженности стенокардии и сердечной недостаточности в обеих группах через 6 месяцев (через 12 месяцев достоверной разницы не получено).

Большинство уже имеющихся исследований доказывает эффективность в отношении улучшения клинического состояния пациента. Существенную положительную динамику наблюдали в изменении функционального класса стенокардии Бокерия и соавторы [92]. По данным TOPCARE – AMI, ASTAMI, BOOST, REPAIR – AMI выявлено достоверное снижение ФК сердечной недостаточности и ФК стенокардии [112].

По данным объективного 6-минутного теста ходьбы толерантность к физической нагрузке возросла (достоверное увеличение пройденного расстояния в обеих группах), лучше в основной группе. Результаты рандомизированного исследования PROTECT-CAD [120] также продемонстрировали улучшение толерантности к физической нагрузке и повышение фракции выброса у 19 пациентов с ХИБС спустя 1 год после интрамиокардиального введения ККМ по сравнению с группой плацебо. Однако, в данном исследовании не было выявлено разницы в улучшение перфузии между сравниваемыми группами пациентов.

Клиническая эффективность по результатам опросника SF-36 проявилась статистически достоверной положительной динамикой, однако не имела разницы между двумя группами.

По данным Эхо-КГ более значимая в основной группе пациентов: ФВ ЛЖ – 54 исходно, 58 ($p=0.041$) через 6 месяцев и 57 контрольной группе – с 58 до 56 через 6 месяцев, через 12 месяцев – 57 ($p=0,67$). Достоверной динамики в отношении уменьшения количества зон гипокинеза нижней стенки через 6 и 12 месяцев после операции не получено в обеих группах. Примерно такие же

результаты получили и многие другие исследования [112]. Так мета-анализ, проведенный в 2012 году, показал, что интракоронарная терапия КМК после ОИМ привела к умеренному, но значительному улучшению фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ) через 6 месяцев после лечения (2,87%). Также были сделаны аналогичные тенденции для конечного систолического объема и конечного диастолического объема. Другой мета-анализ, проведенный в 2014 году, также показал умеренное увеличение ФВЛЖ за весь период (2,10%) и снижение ФВЛЖ. В мета-анализ 2015 года были отобраны данные отдельных пациентов из 12 рандомизированных клинических испытаний, и сообщалось об отсутствии положительного эффекта при последующем наблюдении в течение 1 года в отношении функциональных показателей ЛЖ.

Результаты оценки симпатической активности не продемонстрировали статистически значимого улучшения основных индикаторов захвата ^{123}I -МИБГ. Лишь у 3 пациентов из группы клеточной терапии было отмечено улучшения захвата радиофармпрепарата, преимущественно на отсроченных сцинтиграммах. Наиболее широко радиоизотопный метод оценки функционального состояния симпатической активности в сердце с помощью ^{123}I -МИБГ применяется в настоящее время у больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) как ишемической, так и не ишемической природы. У этих пациентов отмечается достоверное уменьшение поглощения МИБГ и увеличение скорости его выведения из сердца в сравнении со здоровыми лицами, а также по мере прогрессирования проявлений ХСН, оцениваемой с помощью

функциональных классов по классификации NYHA. Подтверждением этому служат данные, полученные при изучении показателей поглощения и вымывания ¹²³I-MIBG из сердца у больных с постинфарктным кардиосклерозом разделённых на группы в зависимости от величины фракции выброса (ФВ) левого желудочка. Исследуемые показатели у пациентов с ФВ более 50% достоверно отличались от полученных результатов в группах с ФВ от 50 до 35% и менее, различия между которыми оказались недостоверными. Прямые эффекты имплантации клеток костного мозга на активность вегетативной нервной системы были отмечены в ряде экспериментальных исследований с использованием моделей диабетической нейропатии. В частности, восстановление двигательной и сенсорной нервной проводимости наблюдались после инъекции моноклеарной фракции клеток костного мозга [121], предшественников эндотелиоцитов [122] и мезенхимальных стволовых клеток [123].

Систолическая функция ЛЖ и объем нежизнеспособного миокарда при оценке функционального состояния и структуры миокарда ЛЖ статистически значимых изменений фракции выброса, ударного, конечно-диастолического и конечно-систолического объемов, а также объема и процентного содержания рубцовой ткани в миокарде ЛЖ, по данным МРТ, сердца не выявили, как в группе исследования, так и в группе контроля.

Суммируя данные полученные от множества исследований, связанных с клеточной терапией сердечной патологии, невозможно сделать однозначный

вывод, скорее, остается больше вопросов чем ответов. Но несмотря на это, клеточная терапия развивается и дает определенные эффективные результаты. Опыт нашего исследования показал, что метод повышения функционального статуса ККМ, путем кондиционирования их эритропоэтином, улучшает функциональный статус клетки и как следствие повышает устойчивость к агрессивному микроокружению в миокарде. В свою очередь – это приводит к улучшению миокардиальной перфузии, функции миокарда и клинического статуса пациентов.

Ограничения исследования.

Проведенное исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, отсутствие плацебо-контролируемой группы исследования. В нашей работе в группу контроля входили пациенты, которым было выполнено только коронарное шунтирование. Во-вторых, для каждого пациента не была определена индивидуальная зона для введения клеточного трансплантата. Всем пациентам в основной группе имплантировали клетки в лазерные каналы, которые формировали по передней стенке сердца в бассейн правой коронарной артерии отступя от нее 1,5, 2 см. В-третьих, не анализировался клеточный состав костного мозга у каждого пациента индивидуально.

ВЫВОДЫ

1. Метод интрамиокардиального введения аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином, является безопасным способом лечения пациентов с ИБС при дистальном и диффузном поражении коронарных артерий.
2. Метод интрамиокардиального введения аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином, уменьшает выраженность стенокардии напряжения и сердечной недостаточности и, как следствие, улучшает клиническое состояние пациента.
3. Интрамиокардиальная имплантация ККМ, обработанных эритропоэтином, в сочетании с КШ достоверно улучшает перфузию миокарда, способствует улучшению сегментарной сократимости ЛЖ.
4. Разработанный метод непрямой реваскуляризации миокарда способом интрамиокардиальной трансплантации ККМ, обработанных эритропоэтином, позволяет улучшить результаты хирургического лечения больных ИБС с диффузным и дистальным поражением коронарного русла.

Практические рекомендации

1. Интрамиокардиальная имплантация аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином, может быть рекомендована как самостоятельный метод непрямой реваскуляризации миокарда у пациентов с критическим (дистальным и/или диффузным) поражением коронарного русла в хирургии ишемической болезни сердца.
2. Для определения показаний к интрамиокардиальной имплантации аутологичных клеток костного мозга, обработанных эритропоэтином, необходимо учитывать данные перфузионной сцинтиграфии миокарда, а именно наличие зон гипоперфузии в планируемой области реваскуляризации.
3. Интрамиокардиальную имплантацию аутологичных ККМ, обработанных эритропоэтином, рекомендовано выполнять на остановленном сердце после завершения формирования дистальных анастомозов.

1. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

2. Троицкий, А.В. Непосредственные результаты хирургического лечения ишемической болезни сердца у пациентов с диффузным поражением коронарного русла / А.В. Троицкий, А.С. Зотов, В.И. Терещенко, С.В. Воронин и др. // *Анналы хирургии*. – 2018. – №. 3. – С. 159-166.
3. Bokeria, L.A. Minimally invasive surgery of the heart / L.A Bokeria // *Medicine*. - 1998. – С. 92.
4. Salomon, N.W. Reoperative coronary surgery. Comparative analysis of 6591 patients undergoing primary bypass and 508 patients undergoing reoperative coronary artery bypass / N.W. Salomon, U. Page, J.C. Bigelow et al. // *Journal thoracic cardiovascular Surgery*. – 1990. – Т. 100. – С. 250-260.
5. Акчурина, Р.С. Диффузное поражение коронарных артерий в коронарной хирургии (аналитический обзор) / Р.С. Акчурина, А.А. Ширяев, В.П. Васильев и др. // *Клиническая и экспериментальная хирургия*. – 2018. – Т.6. – С. 75-81.
6. Roger, V.L. Heart disease and stroke statistics 2012 update: a report from the American Heart Association / V.L. Roger, A.S. Go, D.M. Lloyd-Jones et al. // *Circulation*. – 2012. – Т.125. - №. 1. – С. e2-e220.
7. Беришвили, И.И. Выполнение ТМЛР в сочетании с АКШ у больных ИБС с диффузными изменениями в коронарных артериях / И.И. Беришвили, М.Х. Семенов, Ю.В. Игнатъева и др. // *Лазерная медицина*. – 2015. - Т. 19(2). - С.4-10.
8. Assmus, B. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI) / B. Assmus, V. Schachinger, C. Teupe et al. // *Circulation*. – 2002. – Т.106. - №. 24. – С. 3009-3017.
9. Wollert, K.C. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial / K.C. Wollert, G.P. Meyer, J. Lotz et al. // *Lancet*. –2004. – Т. 64. – С. 141-8.

10. Lykov, A.P. Effect of intramuscular injection of mesenchymal stem cells and erythropoietin on angiogenesis in critical lower limb ischemia / A.P. Lykov, N.A. Bondarenko, O.V. Poveschenko et al. // KTBM. – 2018. – Т.165. - №. 1. - С. 121–126.
11. Brunner, S. Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis / S. Brunner, J. Winogradov, B.C. Huber et al. // FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2009. – Т. 23. - №.2 – С. 351-361.
12. Ward, M.R. Erythropoietin and mesenchymal stromal cells in angiogenesis and myocardial regeneration: one plus one equals three / M.R. Ward, D.J. Stewart // Cardiovascular research. – 2008. – Т. 79. - №.3. – С. 357-359.
13. Zhang, D.G. Erythropoietin enhances the therapy potency of autologous bone marrow stromal cells in a rat heart infarction model via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway / D.G. Zhang, F.M. Zhang, Y.Q. Zhang et al. // Zhonghua xin xue guan bing za zhi. – 2006. - Т. 34. - №.10. - С.912-916.
14. Wang, J.A. A prospective, randomized, controlled trial of autologous mesenchymal stem cells transplantation for dilated cardiomyopathy / J.A. Wang, X.J. Xie, H. He, Y. Sun et al. // A Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. Chinese. – 2006. – Т. 34. №. 2. – С. 107-110.
15. Островский, Ю.П. Хирургия сердца: учебное пособие / Ю.П. Островский. - 2007. - 576 с.
16. Heidenreich, P.A. Forecasting the Future of Cardiovascular Disease in the United States A Policy Statement From the American Heart Association / P.A. Heidenreich, J.G. Trogon, O.A. Khavjou et al. // Circulation. – 2011. – Т.123. – С. 33-944.
17. Семченко, А.Н. Краткая история коронарной хирургии: учебное пособие / А. Н. Семченко. – 2016. -150 с.

18. Бокерия, Л.А. Очерки истории коронарной хирургии / Бокерия Л.А. – М.: Изд-во НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. - 2002. - 244 с.
19. Бокерия, Л. А. История научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева / Бокерия Л. А - РАМН под ред. Л. А. Бокерия. –2006. - 682с.
20. Vineberg, A.M. Development of an anastomosis between the coronary vessels and a transplanted internal mammary artery / A.M. Vineberg // Canadian Medical Association journal. – 1946. -Т. 55. - №.2. - С.117-9.
21. Николенко, Е.С. История хирургического лечения ишемической болезни сердца за рубежом / Е.С. Николенко // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – 2016. - №.4. - Т. 3. - С.15.
22. Семченко, А.Н. 50 лет первой операции маммарокоронарного шунтирования с применением микрохирургической техники и операционного микроскопа в клинике (джордж грин, 1968) / А.Н. Семченко, И.И. Кошкин // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2018. - №.3. - Т. 22. - С. 86-94.
23. Аверина, Т.Б. Искусственное кровообращение / Т.Б. Аверина // Анналы хирургии. – 2013. - №.2. - С.5-12.
24. Рuzматов, Т.М. МАЙКЛ ДЕБЕЙКИ / Т.М. Рuzматов // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. - №.1. - Т. 19. - С. 118-120.
25. Шуляковская, А.С. Первое коронарное шунтирование человеку / А.С. Шуляковская, Г.Р. Низамова // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – 2020. - Т. 1. №.28. - С. 42-45.
26. Ryan, T.J. Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Subcommittee on Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty) / T.J. Ryan, D.P. Faxon, R.M. Gunnar // Circulation. – 1988. - №.2. - Т. 78 - С.486–502.

27. Kandzari, D.E. Advanced coronary artery disease: Appropriate ends for trials of novel therapies / D.E. Kandzari, L.C. Lam, E.L. Eisenstein et al. // American heart journal. – 2001. - №.5. - Т. 142 - С. 843-851.
28. Фомичев, А.В. Клинико-морфологическая оценка метода трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации в сочетании с имплантацией моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в хирургии ИБС: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.44 / Фомичев Алексей Вячеславович. – М., 2008. – 161 с.
29. Айткожин, Г.К. История развития трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации миокарда у больных с ишемической болезнью сердца / Г.К. Айткожин, Т.Ж. Егембердиев, В.К. Исраилова, Н.Б. Байжигитов // Вестник хирургии Казахстана. – 2010. - №.2. - Т. 22 - С. 46-48.
30. Ишенин, Ю.М. Актуальные вопросы реконструктивной и восстановительной хирургии / Ю.М. Ишенин. - Иркутск - 1986. -С. 257-258.
31. Naprstek, Z. Some laser applications in cardiovascular research / Z. Naprstek, R.J. Rockwell // Int. Congr. Med. Eng. Session. - 1969. - Т.1. - С. 34-36.
32. Бокерия, Л.А. Трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация: опыт 230 операций / Л.А. Бокерия, В.Я. Панченко, И.И. Вершивши., Ю.И. Бузиашвили и др. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2003.- №.1. - С. 5-10.
33. Fisher, P.E. Histologic analysis of transmyocardial channels / P.E. Fisher, T. Khomoto, C.M. DeRosa et al. // The Annals of thoracic surgery. -1997. -Т. 64. - С. 466-472.
34. Kohmoto, T. Evidence of vascular growth associated with laser treatment of normal canine myocardium / Т. Kohmoto, С.М. DeRosa, N. Yamamoto et al. // The Annals of thoracic surgery. -1998. -Т. 65. -С. 1360-1367.
35. Чернявский, А.М. Направленный ангиоваскулогенез при хирургическом лечении ишемической болезни сердца // А. М. Чернявский, П. М.

- Ларионов, А. М. Караськов; отв. ред. И. И. Семенов; Новосибирский научно-исслед. ин-т патологии кровообращения им. Е. Н. Мешалкина. Новосибирск. - 2011. - 148 с.
36. Кливер, Е.Н. Диссертационная работа: Клинико-функциональный анализ эффективности эндомиокардиальной клеточной кардиомиопластики у больных с ишемической дисфункцией миокарда: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.05 / Кливер Елена Николаевна. – М., 2016. – 219 с.
37. Ройтберг, Г.Е. Внутренние болезни. Сердечно-сосудистая система: учеб. пособие / Г.Е. Ройтберг, А.В. Струтынский. - 3-е издание. – М: МЕДпресс-информ. - 2013. – 896 с.
38. Порядина, Г.В. Методическая разработка для самостоятельной работы студентов лечебного и педиатрического факультетов: учебное пособие / Г.В. Порядина, Ж.М. Салмаси, Н.И. Бережнова. - Москва 2014.
39. Silvestre, J.S. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications / J.S. Silvestre, D.M. Smadja, B.I. Lévy // *Physiological reviews*. – 2013. – Т. 93. – С. 1743–1802.
40. Karamysheva, A.F. Mechanisms of angiogenesis / A.F. Karamysheva // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. - №.7. - Т.73. - С.751-762.
41. Повещенко, В.И. Механизмы и факторы ангиогенеза / А.Ф. Повещенко, В.И. Коненков // *Успехи физиологических наук*. – 2010. – Т.41. - №.2. - С. 68-89.
42. Коненков, В.И. Физиологические и цитологические основы клеточной регуляции ангиогенеза / Коненков В.И., А.Ф. Повещенко, О.В. Повещенко // *Успехи физиологических наук*. – 2012. – Т.43. - №. 3. - С. 48-61.
43. Шамитова, Е.Н. Механизмы и факторы ангиогенеза / Е.Н. Шамитова, И.С. Сымулова, М.М. Леванова, Э.А. Кашеварова // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. - 2019. – №.9. –С.30-34.
44. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. / G.L. Semenza // *Cell*. – 2012. – Т. 148. -№.3. - С. 399-408.

45. Аллилуев, И.А. Транскрипционный фактор HIF-1: механизмы регуляции при гипоксии и нормоксии / И.А. Аллилуев // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. - 2014. - №.3- С. 181.
46. Иванов, А.Н. Факторы, регулирующие ангиогенез / А.Н. Иванов, М.О. Куртукова, И.О. Бугаева, // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №. 5. – С.246.
47. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress / N. Ferrara // *Endocr. Rev.* — 2004. — Т. 25. — С. 581–611
48. Чехонин, В. П. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза / С. А. Шеин, А. А. Корчагина, О. И. Гурина // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2012. - № 2. — С. 23–34.
49. Leung, D.W. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen / D.W. Leung, G. Cachianes, W.J Kuang et al. // *Science*. -1989. – Т. 246. -№ 4935. - С.1306-1309.
50. Хмельницкая, К.А. Современные представления о клеточно-молекулярных механизмах ангиогенеза / К.А. Хмельницкая, А. Я. Гудкова, Е. В. Шляхто // Ученые записки СПбГМУ им. И. П. Павлова. – 2015. – Т. 22. -№ 1. - С.6-13.
51. Ferrara, N. The biology of vascular endothelial growth factor / N. Ferrara, T. Davis-Smyth // *Endocrine reviews*. – 1997. – Т.18. - №1. – С.4-25.
52. Чехонин, В. П. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза/ В.П. Чехонин, С. А. Шеин, А. А. Корчагина, О. И. Гурина // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. –Т.67. - № 2. – С.23-34.
53. Muller, W. A. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes / W. A. Muller // *Circulation research*. – 2009. – Т. 105. - №3. – С.223–230.
54. Schwartzberg, S. Comparative analysis of the predictive power of different endothelial progenitor cell phenotypes on cardiovascular outcome / S. Schwartzberg, A. Afek, G. Charach et al. // *World journal of cardiology*. - 2010. – Т.2. - №9. С. 299–304.

55. Wang, C. Y. Mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates angiogenesis and fracture healing in diabetic rats / C. Y. Wang, H. B. Yang, H. S. Hsu, et al. // Journal of tissue engineering and regenerative medicine. – 2012. – Т. 6. - №7. - С.559–569.
56. Chavakis, E. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy / E. Chavakis, C. Urbich, S. Dimmeler // Journal of molecular and cellular cardiology. - 2008. – Т. 45. - №4. - С.514–522.
57. Si, Y.L. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns // Y.L. Si, Y.L. Zhao, H.J. Hao et al. // Ageing Res. Rev. – 2011. - Т.10. – С.93–103.
58. Орехов, П.Ю. Стволовые клетки костного мозга в лечении критической ишемии нижних конечностей: биологические аспекты и клиническое применение / П.Ю. Орехов, Ма. Коноплянников, В.П. Баклаушев, В.А. Кальсин, А.В. Аверьянов и другие. // Гены и клетки. – 2018. - Т. 13. - № 1. – С.20-34.
59. Оспанова, М.Е. Гемопоэтические стволовые клетки / М.Е. Оспанова, И.Р. Рамильева, А.А. Турганбекова // Клиническая медицина Казахстана. – 2011. – Т. 20. - №1. – С.78-82.
60. Третьяк, Н.М. Гематология: учебное пособие / Н. М. Третьяк. – 2005. – 240с.
61. Медведев, С. П. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: проблемы и перспективы применения в заместительной клеточной терапии / С. П. Медведев, А. И. Шевченко, С. М. Закиян // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2010. - Т. 2. - № 2. – С.18-28.

62. Гулевский, А. К. Клеточная трансплантация в кардиомиопластике при ишемическом повреждении сердца / А. К. Гулевский, И. И. Щенявский, Е. С. Абакумова // *Biotechnologia Acta*. – 2011. – Т. 4. – №1. – С. 060-073.
63. Peichev, M. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors / M. Peichev, A.J. Naiyer, D. Pereira D, et al. // *Blood*. – 2000. – Т. 95. – №3. – С.952–958.
64. Urbrich, C. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology / C. Urbrich // *Circulation Research*. — 2004. — Т. 95. — С. 343–353.
65. Caiado, F. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs / F. Caiado, S. Dias // *Fibrogenesis & tissue repair*. – 2012. – Т.52.
66. Мичурова, М. С. Роль эндотелиальных прогениторных клеток в развитии осложнений сахарного диабета / М. С. Мичурова, В. Ю. Калашников, О. М. Смирнова, И. В. Кононенко, О. Н. Иванова // *Сахарный диабет*. – 2015. – Т. 18. – №1. – С.24-32.
67. Werner, N. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes / N. Werner, S. Kosiol, T. Schiegl et al. // *The New England journal of medicine*. – 2005. – Т. 353. – №10. С.999–1007.
68. Fadini, G.P Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature / G.P Fadini, C. Agostini, A. Avogaro // *Atherosclerosis*. - 2010. - Т. 209. - №1. - С.10-7
69. Liangpeng, L. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart/ L. Liangpeng, C. Xiongwen, W. Wei et al. // *Stem Cells International*. – 2016. - Article ID 9682757. – 14 с.

70. Singh, A. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015) / A. Singh, D. Sen // *Stem Cell Res Ther.* – 2016. - T. 7. - №1. - C.82.
71. Mariusz Ratajczak, Z. *Stem Cells.* // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Stem Cell Institute at James Graham Brown Cancer Center University of Louisville Louisville // Z. Mariusz Ratajczak - KY, USA. – 2019. – C.195-214.
72. Cambria, E. Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types / E. Cambria, F. Pasqualini, P. Wolint et al. // *NPJ Regen Med.* – 2017. – T. 2. - №17.
73. Chengwei, J. Transplantation of Cardiac Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promotes Repair in Ischemic Myocardium/ J. Chengwei, S. Yan, M. Gengshan et al. // *Journal of Cardiovascular Translational Research.* – 2018. – T.11. - №5. – C.420–42.
74. Kim, Y. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia / Y. Kim, H. Kim, H. Cho et al // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2007. – T.20 – C.867–76.
75. Quaini, F. End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes / F. Quaini, E. Cigola, C. Lagrasta et al // *Circulation Research.* — 1994. — T. 75. - №5. - C.1050–1063.
76. Beltrami, A.P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction / Beltrami A.P., Urbanek K., Kajstura J. et al. // *The New England journal of medicine.* – 2001. — T. 344. - №23. - C.1750–1757.
77. Hsieh, P.C. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury / P.C. Hsieh, V.F. Segers, M.E. Davis et al. // *Nature Med.* – 2007. — T. 13. - №8. - C.970–974.

78. Маслов, Л. Н. Гипоксическое preconditioning стволовых клеток как новый подход к повышению эффективности клеточной терапии инфаркта миокарда / Л. Н. Маслов, Ю. К. Подоксенов, А. Г. Портниченко, А. В. Наумова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. - Т. 68. - №12. - С.16-25.
79. Шевченко, Ю. Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии: научная и учебная литература / Ю. Л. Шевченко. – Санкт-Петербург. – 2006. – 286 с.
80. Makino, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro / S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi et al. // The Journal of clinical investigation. – 1999. - Т. 103. - №5. - С.697–705.
81. Balsam, L. V. Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart / L. V. Balsam, R. C. Robbins // Clinical science (London, England : 1979). – 2005. - Т. 109. - №6. - С. 483–492.
82. Шумаков, В.И. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов / В.И. Шумаков, Н.А. Онищенко, М.Е. Крашенинников и другие // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2002. Т.4. – С. 336.
83. Потапов, И.В. Влияние пересадки эмбриональных кардиомиоцитов и мезенхимальных клеток костного мозга на сократительную функцию сердца при экспериментальном инфаркте миокарда // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2002. Т.3. – С.88-89.
84. Strauer, B.E. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans / B.E. Strauer, M. Brehm, T. Zeus, M. Kostering et al. // Circulation. - 2002. - Т. 106. - №15. - С. 1913–1918.
85. Devesa, L. Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases / L. Devesa, J. Choi, F. Yang // Theranostics. – 2012. - Т. 2. - №8. - С.801-814.

- 86.Orlic, D. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium / D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti et al. // Nature. - 2001. - Т. 410. - №6829. - С.701-705.
- 87.Anversa, P. Cardiac regeneration / P. Anversa, A. Leri, J. Kajstura // Journal of the American College of Cardiology. — 2006. — Т. 47. — С. 1769-76.
- 88.Alvares-Dolado, M. Fusion of bone marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes / M. Alvares-Dolado, R. Pardal, J.M. Garcia-Verdugo et al. // Nature. — 2003. — Т. 425. — С. 968-73.
- 89.Terada, N. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion / N. Terada, T. Hamazaki, M. Oka et al. // Nature. — 2002. — Т. 416. — С. 542-545.
- 90.Hamano, K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results / K. Hamano, M. Nishida, K. Hirata et.al. // Japanese circulation journal. — 2001. — Т. 65. — - №9. - С. 845-847.
- 91.Шумаков, В.И. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда / В.И. Шумаков, Э.Н. Казаков, Н.А. Онищенко, С.В. Гуреев и другие // Российский кардиологический журнал. – 2003. - №5. - С.42-50.
- 92.Бокерия, Л. А. Возможность применения моноклеарных клеток костного мозга в терапии сердечной недостаточности на фоне ишемической болезни сердца / Л. А. Бокерия, Ю. И. Бузиашвили, С. Т. Мацкеплишвили, Д. Х. Камарджов, М. Б. Ушерзон и другие // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2005. — № S2. - С.45a-46.
- 93.Bockeria, O.L. Long-term results of isolated transmyocardial laser revascularization in combination with the intramyocardial autologous bone marrow stem cells injection / O.L. Bockeria, A.D. Petrosyan, V.A. Shvartz et al. // Lasers Med Sci. — 2020. — Т.35. - С. 1111–1117.

94. Beeres, S. L. Effect of intramyocardial injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells on perfusion, function, and viability in patients with drug-refractory chronic ischemia / S.L. Beeres, J.J. Vax, P. Dibbets et al. // *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. – 2006. – Т.47. - №4. - С. 574–580.
95. Веснина, Ж.В. Радионуклидная оценка распределения стволовых клеток у пациентов с острым инфарктом миокарда / Ж.В. Веснина, С.И. Сазонова, А.Л. Крылов, В.В. Рябов, Т.Е. Суслова, В.В. Саушкин и другие // *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, Клиническая медицина*. – 2011. – Т.9. - №1. - С.71-76.
96. Wang, C. Impact of bone marrow mononuclear cells therapy on left ventricular function in patients with ST-elevated myocardial infarction: A meta-analysis / C. Wang, X. Han, Y. Li, B. Zhang // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – Т.97. - №16. – С.e0359.
97. Fisher, S.A. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure / S.A. Fisher, C. Doree, A. Mathur, D.P. Taggart, E. Martin-Rendon // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2016. – Т.12. - №12. – С.CD007888.
98. Лыков, А.П. Влияние эритропоэтина на костномозговые мононуклеары / А.П. Лыков, М.А. Суровцева, О.В. Повещенко, А.М. Чернявский, А.В. Фомичев, Н.А. Бондаренко, И.И. Ким // *Медицинская иммунология*. – 2020. - №1. – С.135-142.
99. Лыков, А.П. Влияние эритропоэтина на продукцию цитокинов стволовыми клетками / А.П. Лыков, М.А. Суровцева, О.В. Повещенко, А.М. Чернявский, А.В. Фомичев, Н.А. Бондаренко, И.И. Ким // *Медицинская иммунология*. – 2019. – Т.21. - №5. – С.861-868.

100. Lemcke, H. Recent Progress in Stem Cell Modification for Cardiac Regeneration / H. Lemcke, N. Voronina, G. Steinhoff et al. // *Stem Cells Int.* – 2018. - Т.2018. -1909346.
101. Pasha, Z. Y. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium / Z. Pasha, Y. Wang, R. Sheikh, D. Zhang, T. Zhao, M. Ashraf // *Cardiovascular Research.* – 2008. - №1. – С.134–142.
102. Pagonopoulou, O. Erythropoietin and growth factors exhibit differential angiogenic potential in mouse heart / O. Pagonopoulou, A. Efthimiadou, M. Lambropoulou et al. // *In Vivo.* – 2008. - №22. – С. 587-591.
103. Lykov, A.P. Phenotype of bone-marrow mononuclear cells before and after short-time precondition with erythropoietin from patients with ischemic heart failure / A.P. Lykov, O.V. Poveshchenko, A.M. Cherniavsky et al. // *Russian Open Medical Journal.* - 2018. - Т.7. - №2. – С. e0202.
104. Повещенко, О.В. Эритропоэтин-опосредованная активация функциональных свойств мононуклеаров периферической крови у больных с хронической сердечной недостаточностью / О.В. Повещенко, Н.А. Бондаренко, И.И. Ким, А.П. Лыков и другие // *Гены и клетки.* - 2017. - Т.12. - №2. – С.82-87.
105. Ercan, E. In vitro protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin / E. Ercan, A.G. Bagla, A. Aksoy, G. Gacar et al // *Acta Histochem.* - 2014. - Т.116. - №1. – С.117-125.
106. Захаров, Ю.М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина / Ю.М. Захаров // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* - 2007. - Т. 93. - № 6. - С.592–608.
107. Делягин, В. М. Эритропоэтин: история и перспективы исследования / В. М. Делягин, А. А. Джумагазиев // *Астраханский медицинский журнал.* - 2013. - Т. 8. - № 2. - С.18-23.

108. Захаров, Ю.М. Цитопротекторные функции эритропоэтина / / Ю.М. Захаров // Клиническая нефрология. - 2009. - № 1. - С.16-21.
109. Lipsic, E. Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside // E. Lipsic, R.G. Schoemaker, P. van der Meer et al. // Journal of the American College of Cardiology. – 2006. -Т. 48. - № 11. - С. 2161-2167.
110. Copland, I.B. Coupling erythropoietin secretion to mesenchymal stromal cells enhances their regenerative properties / I.B. Copland, E.M. Jolicoeur, M.A. Gillis, J. Cuerquis et al // Cardiovascular research. – 2008. – Т. 79. - №3. – С. 405-415.
111. Klopsch, C. Intramyocardial angiogenic stem cells and epicardial erythropoietin save the acute ischemic heart // C. Klopsch, A. Skorska, M. Ludwig, H. Lemcke et al. // Dis Model Mech. – 2018. – Т. 11. - №6. – С.dmm033282.
112. Лазарев, С.М. Клеточная терапия в лечении ишемической болезни сердца / С.М. Лазарев, К.В. Фетисов // Вестник хирургии имени И. И. Грекова. – 2007. – Т. 166. - №1. – С.106-111.
113. Zhang, J. Bone Marrow Mononuclear Cells Transfer for Patients after ST-Elevated Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of Randomized Control Trials / J. Zhang, L. Lin, W. Zong // Yonsei medical journal. – 2018. – Т. 59. - №5. – С. 611-623.
114. Smits, P.C. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up / P.C. Smits, R.J. van Geuns, D. Poldermans et al. // Journal of the American College of Cardiology. – 2003. – Т. 42. - №12. – С.2063-2069.
115. Van Ramshorst, J. Bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: the past and the future / J. Van Ramshorst, S.F. Rodrigo, M.J. Schaliij, S.L. Beeres et al // Journal of cardiovascular translational research. – 2011. – Т. 4. - №2. – С.182-191.

116. Perin, E.C. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure / E.C. Perin, H.F.R. Dohmann, R. Borojevic // *Circulation*. - 2003 – T.107. - C. 2294–2302.
117. Strauer, B.E. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice / B.E. Strauer, G. Steinhoff // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2011. -T. 58. - № 11. - C.1095-1104.
118. Van Ramshorst, J. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial / J. Van Ramshorst, J.J. Bax, S.L. Beeres, P. Dibbets-Schneider et al // *JAMA*. – 2009. -T. 301. - № 91. - C.1997-2004.
119. Mathiasen, A.B. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with ischaemic heart failure: final 4-year follow-up of the MSC-HF trial / A.B. Mathiasen, A.A. Qayyum, E. Jørgensen, S. Helqvist et al // *European journal of heart failure*. – 2020. -T. 22. - № 5. - C. 884-892.
120. Lee, J.W. A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction / J.W. Lee, S.H. Lee, Y.J. Youn, M.S. Ahn et al // *Journal of Korean medical science*. – 2014. -T. 29. - № 1. - C.23-31.
121. Tse, H.F. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial) / H.F. Tse, S. Thambar, Y.L. Kwong, P. Rowlings et al. // *European heart journal*. – 2007. -T. 28. - № 24. - C.2998-3005.
122. Jeong, J.O. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy / J.O. Jeong, M.O. Kim, H. Kim, M.Y. Lee et al / *Circulation*. - 2009. -T. 119. – C.699–708.
123. Shibata, T. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats / T. Shibata, K. Naruse, H. Kamiya, M. Kozakae et al // *Diabetes*. - 2008. -T. 57. – C.3099–3107.

124. Kim, H. Bone marrow mononuclear cells have neurovascular tropism and improve diabetic neuropathy / H. Kim, J.S. Park, Y.J. Choi, M.O. Kim et al // Stem Cells. – 2009. -T. 27. – C.1686–1696.