Контролируемая иммунокоррекция больного и последующая активирование мононуклеарных клеток костного мозга, улучшают функцию миокарда при хронической ишемической сердечной недостаточности

А.А. Темнов, С.В. Гуреев, Н.А. Онищенко, В.И. Шумаков
Лаборатория биотехнологии стволовых клеток ФГУ НИИ трансплантологии и искусственных органов Росздрава, Москва

Controlled immunocorrection and subsequent activation of bone marrow mononuclear cells improve myocardial function in chronic ischemic cardiac failure

A.A.Temnov, S.V. Gureev, N.A. Onishchenko, V.I. Shumakov
Laboratory of stem cells biotechnology State Scientific Research Institute of Transplantology and Artificial Organs, Russian Ministry of Public Health, Moscow

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) сопровождается иммунной дизрегуляцией, степени тяжесть которой предопределяет отсутствие клинического эффекта от применения аутологичных стволовых клеток костного мозга (ККМ). В работе изучено влияние двухэтапной активации ККМ (сначала in vivo, а затем ex vivo) на улучшение функции левого желудочка (ЛЖ) больных ХСН. В работе исследовали две группы больных с ХСН. В I группе (контроль, n=50) пациентам выполнялась операция аорто-коронарного шунтирования (АКШ). Вторая группа включала больных (n=57), которым во время АКШ интрамиокардиально вводили 200 млн. аутологичных мононуклеарных ККМ. У больных 2-й группы исходно оценивали тяжесть иммунной дизрегуляции, определяя значения индекса стимуляции лейкоцитов крови (ИС) при проведении хемилюминесцентного теста. У 16 больных с ИС>1 и умеренными изменениями иммунограммы мы прогнозировали благоприятный эффект применения ККМ. У 41 больного с ИС <1 и глубокими изменениями иммунограммы прогнозировали неблагоприятный клинический эффект от введения ККМ. 22 больным с ИС<1 предварительно проведен курс иммунокоррегирующей терапии (активация ККМ in vivo). Мононуклеарные ККМ больных (n=38 с ИС>1 и n=19 с ИС <1) культивировали в течение 5–7 суток (активация ККМ ex vivo). Было показано, что при культивировании у пациентов с благоприятным прогнозом наблюдается изменение фенотипического состава культивируемого костного мозга: увеличение CD3, CD4, CD8, CD 25 и др. Контрольное обследование пациентов через 6 мес. после введения аутологичных клеток костного мозга выявило, что достоверная позитивная динамика функции ЛЖ (DКДО, DКСО, DФИ) и индекса физической активности (DASI) наступала у больных с ИС>1. Контролируемая иммунокоррекция, проводимая до забора ККМ, в сочетании с последующей активацией ККМ ex vivo способствовала достоверному улучшению обьемных характеристик ЛЖ через 6 мес. после АКШ по сравнению с контролем. Таким образом, для эффективного применения аутологичных ККМ у больных ХСН следует осуществлять двухэтапную активацию ККМ: сначала in vivo с помощью иммунокорректоров, а затем ex vivo в процессе культивирования.

Ключевые слова: клетки костного мозга, сердечная недостаточность, стресс, иммунокоррекция.

Chronic cardiac failure is accompanied with immune dysregulation which severity predetermines the absence of clinic efficiency of autologous bone marrow stem cells (BMSCs). The effect of two-staged activation of bone marrow stem cells (at first, in vivo, then ex vivo) on left ventricle function promotion in patients with chronic cardiac failure has been studied. Two groups of patients with chronic cardiac failure took part in the investigation. The 1st group patients (control, n=50) underwent cardiopulmonary bypass. To the patients of the 2nd group (n=57) 200 mln autologous mononuclear marrow stem cells were introduced intramyocardially during the cardiopulmonary bypass. In the 2nd group patients the original immune dysregulation severity was assessed by assaying the index of white blood cells stimulation (SI) with a chemoluminescent test. In 16 patients with SI>1 and a moderate alteration of immunoassay_favorable effect of BMSCs was predicted; bone marrow stem cells were predicted to produce unfavorable clinic effect in 41 patients with SI <1 and profound alterations of immunoassay. 22 patients with SI <1 had undergone immunocorrecting therapy (stem cells in vivo activation). Mononuclear stem cells of patients (n=38 with SI>1 and n=19 with SI<1) were cultured for 5–7 days (stem cells ex vivo activation). The research demostrated that BMSCs culturing in patients with favorable prognosis led to the changes of immunophenotype of bone marrow such as CD3, CD4, CD8, CD 25 increase. The control examination of the patients 6 months after autologous bone marrow cells introduction revealed that positive dynamics of the left ventricle function and the physical activity index (DASI) occurred in patients with SI>1. Controlled immunocorrection performed before derivation of BMSCs, in combination with their subsequent ex vivo activation promoted reliable improvement of functional characteristics of the left ventricle 6 months after cardiopulmonary bypass in comparison with the controls. For autologous bone marrow stem cells to be effective in patients with chronic cardiac failure two-staged activation of BMSCs should be performed: at first, in vivo with immunocorrectors, then ex vivo while culturing.

Key words: bone marrow cells, cardiac failure, stress, immunocorrection.

Возможности восстановительной регенерации миокарда с помощью аутологичных клеток костного мозга (ККМ) продолжают оставаться предметом пристального изучения. В последнее время интересы исследователей сместились в область применения этих клеток у больных ишемической хронической сердечной недостаточностью (ХСН), т.к. именно у этой группы больных наиболее выражена потребность в восстановлении сократительной функции миокарда. При этом, – одни исследователи [1–4] сообщают о позитивных результатах применения аутологичных мононуклеарных ККМ (уменьшении объемов ЛЖ, повышении ФИ ЛЖ и регрессии клиники ХСН), тогда как другие не выявили статистически значимого улучшения показателей функции ЛЖ у этих больных [5, 6].

Позитивный эффект терапии аутологичными мононуклеарными ККМ авторы связывают преимущественно с их индуктивными и информационными свойствами: с продукцией проангиогенных и антиапоптических цитокинов [7–10], с регуляцией воспаления и иммунной модуляции в организме [11, 12], с улучшением регенерации кардиомиоцитов и повышением их устойчивости к апоптозу [13–15], с пластичностью стволовых ККМ и их влиянием на пролиферацию «cardiac stem cells» [16].

Отрицательный (и/или недостаточно значимый) результат трансплантации аутологичных ККМ у больных ХСН, возможно, обусловлен изменением состава и нарушением функции стволовых и прогениторных ККМ, возникающих при ХСН и сопутствующих ей заболеваниях, таких, как сахарный диабет, гипертоническая болезнь, почечная недостаточность и др. [17,18]; артериальная гипертензия, атеросклероз, гиперлипидемия [19–23]. Показано, что применение различного типа ККМ от «больных» и/или старых доноров не только не приносит ожидаемого положительного эффекта, но может вызвать ухудшение функции органа–мишени: наступает торможение васкуляризации и заживления кожных ран [24]; прогрессирование атеросклероза и нарушение стабильности атеросклеротической бляшки; ингибирование ангиогенеза [25]; изменение спектра секреции цитокинов с противоспалительных на провоспалительные [26], которое в ряде случаев может индуцировать развитие острой сердечной недостаточности [27]. Создается впечатление, что в клинической практике исследователи применяют ККМ с разными (и даже с противоположными свойствами). Именно этот факт заставляет искать пути оптимизации клеточной терапии в кардиологии и повышения ее безопасности [28].

В исследовании результатов трансплантации ККМ, проведенном в нашей клинике у 30% больных ишемической ХСН мы не отметили статистически значимого позитивного эффекта после интракоронарного и/или интрамиокардиального введения аутологичных ККМ [29, 30]. Пытаясь выяснить, причины отсутствия у ряда больных позитивного эффекта от введения мононуклеарных ККМ, мы предположили, что у больных ХСН на фоне системного воспаления и хронической гипоксии, очевидно, формируется функциональная недостаточность гемопоэтических иммунорегуляторных клеток КМ. Основанием для такого предположения послужили работы G. Selye об инволюции органов иммунной системы в условиях хронического стресса, которая сопровождается снижением функциональной активности фагоцитирующих клеток крови [31, 32] и снижением морфогенетической активности лимфоидных клеток, являющихся «переносчиками регенерационной информации» в организме [33]. Выраженность инволюционного процесса в костном мозге как центральном органе иммуногенеза при хроническом стрессе определяется суммарной биологической дозой стресс–повреждающего фактора (тяжесть и длительность заболевания), а также генетическими (врожденными) и фенотипическими (приобретенными) резервами устойчивости клеток КМ (возраст, физические тренировки и др.).

По данным нашей клиники, до 70% больных ХСН имеют признаки вторичного иммунодефицита различной степени выраженности, что указывает на предсуществующее нарушение пролиферативной, миграционной и информационной активности как гемопоэтических ККМ, так и клеток крови.

По мере развития ХСН дизрегуляция иммунной системы прогрессирует особенно среди тех ее звеньев, которые ответственны за регенерацию поврежденных органов. В результате этого лечение хронических процессов становится неразрешимой задачей, т.к. сам организм, создавая иммунный дисбаланс, стремится ослабить проводимую активационную терапию, чтобы затормозить процесс износа и гибели гиперфункционирующих структур жизненно важных поврежденных органов.

Для восстановления иммунного статуса больных ХСН и морфогенетической активности иммуноцитов (лимфоцитов и макрофагов) крови и ККМ мы считали целесообразным до проведения клеточной терапии осуществить предварительную активацию аутологичных ККМ больных в 2 этапа: сначала *in vivo* с помощью иммунокорригирующих препаратов, а затем – *ex vivo*, проводя культивирование выделенных ККМ в питательной среде в течение 5 суток.

Ниже мы представляем результаты предлагаемого нами подхода для повышения эффективности трансплантации аутологичных ККМ у той категории кардиологических больных, у которых исходно снижен активационный (адаптационный и/или регуляционный) потенциал иммуноцитов – мононуклеарных клеток крови и КМ.

Материал и методы

Характеристика больных

Трансплантация ККМ больным ХСН проводится в клинике Института с 2003 года (более 200 трансплантаций). В настоящее исследование включено 107 больных ишемической ХСН, которые поступили в клинику для плановой операции АКШ. Возраст больных колебался от 45 до 62 лет. У 55 обследованных больных установлен III функциональный класс сердечной недостаточности по классификации NYHA. Больные были разделены на 2 группы. В 1–ю группу (контрольную) включено 50 больных, которым выполнялась АКШ по стандартному плану. Во 2–ю группу (группа клеточной терапии) было включено 57 больных, которым во время операции АКШ интрамиокардиально вводили 200 млн аутологичных, предварительно культивированных мононуклеарных клеток КМ. Общая характеристика обеих групп больных представлена в табл. 1.

Таблица 1. **Общая характеристика исходного состояния больных ХСН контрольной и клеточных групп**

Параметр	АКШ+ СК КМ	Контроль. группа	p
Возраст	50 ± 7,4	47±8	0,752714
Мужской пол	100%	100%	1,0
Количество ИМ	1,3±0,57	1,2±0,6	0,683521
ФК ХСН по NYHA	2±0,6	2±0,7	0,372030
ФК стенокардии	3±0,8	2,5±0,8	0,462250
ББИ (безболевая ишемия)	14%	19%	–
Длительность ИБС, мес.	24±14	18±12	0,074204
Длительность ХСН, мес.	15±7	12±6,5	0,075231
Индекс DASI, баллы	36,7±5,8	38,6±6,3	0,22650
Артериальная гипертония, %	60	71	–
Курение сигарет, %	85	76	–
Сахарный диабет, %	39	15	–
Синусовый ритм, %	100	100	1,0
Наджелудочковые экстрасистолы, %	24	29	–
Желудочковые экстрасистолы, %	15	19	–
β-блокаторы, %	100	95	–
Кордарон, %	0	3	–
Диуретики, %	32	38	–
Коронарная ангиопластика в анамнезе, %	8	5	–
Кол-во шунтированных артерий на 1 пациента	2,6 ±0,8	2,8±0,5	0,068
Время пережатия аорты, мин	59±15	69±16	0,07
Время ИК, мин	98±30	110±28	0,06
Операционная летальность, %	0	0	1,0

Во второй группе больных в предоперационном периоде определяли исходный уровень регуляторных резервов иммунной системы. Для этого исследовали активационные резервы мононуклеарных клеток крови этих больных и рассчитывали индекс их стимуляции (ИС). По исходным значениям индекса стимуляции (ИС) все больные группы клеточной терапии были разделены на 2 подгруппы: с исходным ИС>1 (хороший прогноз клеточной терапии; n=16), и с ИС<1 (плохой прогноз; n=41). Некоторым больным (n=22) с низким (ИС<1), был проведен курс иммуномодулирующей терапии (активация in vivo мононуклеарных клеток) одним из иммунокорригирующих индивидуально подобранных препаратов: полиоксидоний, имунофан – синтетический гепатопептид, циклоферон – индуктор интерферона, реаферон в терапевтических дозах. Иммунокоррекция оценивалась позитивно, если через 7–14 суток лечения ИС мононуклеарных клеток крови становился >1. В итоге перед забором ККМ в предоперационном периоде среди больных группы клеточной терапии у 38 больных ИС был больше 1, а у 19 – меньше 1.

Определение активационных (адаптационных) резервов мононуклеарных клеток крови больных

Метод основан на использовании известной зависимости функциональных резервов иммуноцитов от уровня внутриклеточных метаболических процессов, среди которых ключевую роль играет образование ими активных форм кислорода (АФК). Способность мононуклеарных клеток отвечать на воздействие стрессора (интерферон, циклоферон и др.) дополнительным образованием АФК была использована нами для оценки функциональных (регуляторных) резервов мононуклеарных клеток (МНК) и пригодности их для проведения клеточной терапии. Оценка функциональной активности МНК КМ включает в себя следующие этапы.

а). Получение и подготовка лейкоцитарной суспензии.

Для получения суспензии МНК 2 мл гепаринизированной крови смешивали с 1 мл подогретого до 37°С 3% раствора желатина и инкубировали в термостате при 37°С в течение 30 мин. После оседания эритроцитов слой плазмы, обогащенный лейкоцитами, отбирали в пластиковые пробирки и отмывали 10-кратным объемом фосфатно-солевого буфера (pH=7,4). Затем лейкоциты центрифугировали в течение 10 мин. при 1000 об/мин, ресуспендировали в растворе Хенкса без $Ca2^{+}$ и $Mg2^{+}$. После подсчета числа лейкоцитов концентрацию клеток доводили до 10^6 кл/мл, и вносили в две кюветы по 40×10^3 клеток. В опытную кювету объемом 200 мкл дополнительно вносили препарат циклоферон (12,5% раствор) – 1,5 мкл. В контрольную кювету вносили 1,5 мкл раствора Хенкса. Контрольную и опытную кюветы с клетками инкубировали в термостате в течение 60 мин при 37°С.

б). Хемилюминесцентный анализ динамики накопления активных форм кислорода (АФК) при воздействии стрессора.

После инкубации лейкоцитарной взвеси проводили запись кривых хемолюминесцентной реакции (ХЛР) в течение 15 мин. с использованием хемилюминометра «Хелюм-200101/01» (Россия) в комплексе с компьютером IBM-PC при температуре счетной камеры 37°С. В качестве усилителя свечения использовали люминол (5-амино-2,3дигидро-1,4фталазиндион, «Sigma», США) в конечной концентрации 10^{-3} М, а в качестве активатора образования АФК – РМА (форбол-12миристат-13 ацетат, «Sigma») в концентрации 10-6М. Суммарную продукцию АФК вычисляли как площадь под кривой ХЛР (рис.1). Рассчитывался индекс стимуляции (ИС) МНК используемым препаратом отношение площади под кривой ХЛР с циклофероном (S циклоферон) к площади кривой ХЛР клеток без добавления циклоферона (S контроль).

Индекс стимуляции >1 свидетельствует о способности МНК больного к накоплению АФК и прогнозирует благоприятный результат введения собственных ККМ данному больному (рис. 2). Индекс стимуляции <1 свидетельствует о неспособности МНК больного отвечать на воздействие стрессора и прогнозирует неблагоприятный результат введения собственных клеток КМ больному (рис. 3).

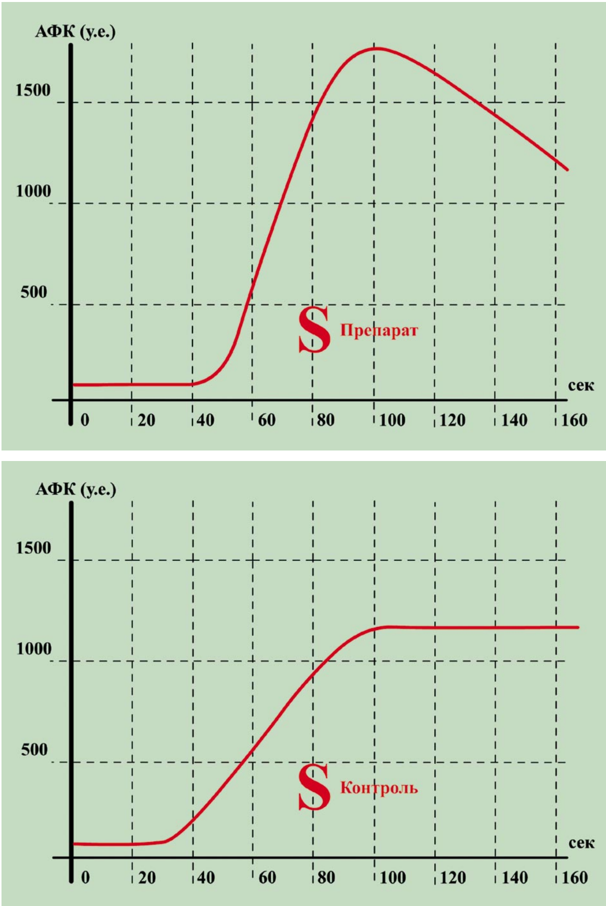

Рис.1. Расчет индекса стимуляции:
А – S препарат – интенсивность ХЛР мононуклеарных клеток в пробе с циклофероном;
В – S контроль – интенсивность ХЛР в контрольной пробе. ИС=S препарат/S контроль

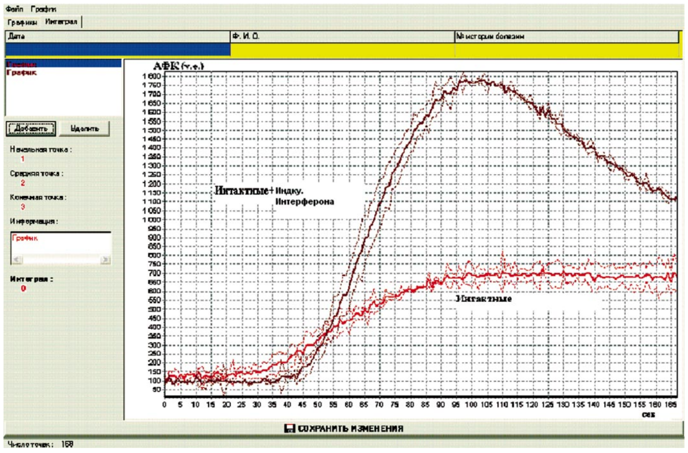

Рис. 2. Пример записи кривых ХЛР мононуклеарных клеток S циклоферон и S контроль, которые прогнозируют позитивный эффект применения собственных ККМ

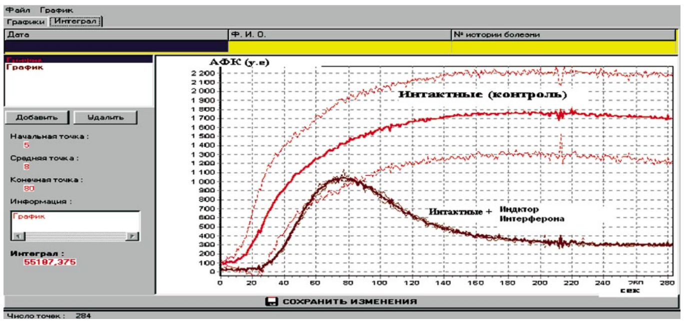

Рис. 3. Пример записи кривых ХЛР мононуклеарных клеток S циклоферон/S контроль, которые прогнозируют неблагоприятный эффект применения собственных ККМ

Аналогичный метод с исследованием ХЛР собственных МНК был использован при индивидуальном подборе препаратов для иммунокоррекции больного перед забором ККМ. Препаратом, пригодным для иммунокоррекции считали тот, индекс стимуляции клеток которым был больше 1,1.

Выделение аутологичных мононуклеарных клеток из КМ больных.

Аспират костномозговой взвеси в количестве 150±25 мл получали путем нескольких пункций обоих крыльев подвздошных костей. Полученный аспират центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин при температуре 18–22°С. В пробирку забирали плазму и интерфазное кольцо. Осуществляли повторное центрифугирование при 1500 об/мин в течение 5 минут при 22°С. К полученному осадку добавляли лизирующий раствор в соотношении 1:10. Лизис эритроцитов проводили в течение 5 мин, затем проводили центрифугирование при 1500 об/мин в течение 5 мин при 22°С.

Полученный осадок клеток ресуспендировали в ростовой среде DMEM, содержащей эмбриональную сыворотку, инсулин, гентамицин. Клетки высевали на чашки Петри и культивировали при 37°С в атмосфере с 5% CO_2 и при 95% влажности в течение 5–7 суток. Общее количество клеток, используемых для лечения одного пациента, составило 200 млн в 5 мл физиологического раствора.

В табл. 2 представлена фенотипическая характеристика свежевыделенной фракции мононуклеарных ККМ больных группы клеточной терапии в сравнении со здоровыми донорами (контроль).

Фенотипическая характеристика гемопоэтической фракции стволовых и прогениторных костного мозга

Отдельные популяции гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток костного мозга выявляли на проточном цитофлуориметре FAScan фирмы Becton Dickinson (USA) с использованием комбинации моноклональных антител (МАТ), изготовленных НПЦ – «МедБиоСпектр» и «Сорбент» (Россия), меченных FITC и фикоэритрином (PE). Исследовали популяции лимфоцитов: CD3, CD4, и CD8; рассчитывали индекс CD4/CD8, содержание CD16, CD34+CD45+ и В-лимфоцитов CD19 до и после культивирования.

Экспрессию адгезивных молекул определяли с помощью МАТ к CD54 и CD 11b, количество апоптотических клеток – с помощью МАТ к CD95 (FAS/APO-1 антиген). Функциональную активность клеточного звена иммунитета оценивали по количеству клеток, экспрессирующих на поверхности рецептор к IL 2 (ILR) – CD3, CD25 и HLA-DR антигену, а также по числу активированных клеток ($CD71^+$,$CD38^+$) и активированных NK ($CD8^+$, $CD16^+$).

Методы оценки клинического состояния больных и функции сердца

Оценку клинического состояния пациентов до операции АКШ и через 1 и 6 мес. после нее осуществляли с помощью 6-минутного теста и по субъективной методике, основанной на учете мнения пациента – определение индекса активности (The Duke Activity Status Index – индекс DASI); качество жизни пациентов определяли с помощью Миннесотского опросника качества жизни больных ХСН (Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire – MLHFQ). Информационными показателями для оценки изменения функции сердца после клеточной терапии были выбраны КДО ЛЖ, КСО ЛЖ и ФИ ЛЖ, которые оценивались с помощью эхокардиограммы, выполняемой в «М» и двухмерном режимах, одним и тем же специалистом до операции АКШ и через 1 и 6 мес. после нее. У части больных (n=25) с целью контроля данных ЭХОКГ выполняли ЯМР – томографии миокарда и/или радиоизотопную вентрикулографию.

АКШ выполнялось в условиях искусственного кровообращения на остановленном сердце по обычной методике. Взвесь клеток вводили в миокард до снятия зажима с аорты 10–15 инъекциями по 0,3–0,5 мл каждая.

Статистическая обработка материала проводилась с помощью программы обработки данных «Статистка 6.0» (Statsoft, США, 2003 г.), средствами которой выполнялось также графическое представление данных. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали по методу Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса и Шапиро-Уилка. Динамика изменения исследуемых параметров связанных групп, по сравнению с исходными, оценивалась по формуле: $\Delta = (A0-A1)/A0\times100\%$, где А0 – исходное значение параметра, А1 – последующее его значение [34]. Статистическая значимость различий рассчитывалась по методу Wilcoxon и/или Mann-Whitney.

Результаты

Проведенный нами ранее [29, 30] анализ результатов клеточной терапии аутологичными ККМ у больных ХСН ишемического генеза позволили выделить две группы больных, различающихся по характеру восстановления функции сердца: группу больных с отчетливым клиническим и функциональным эффектом, и группу больных со слабо выраженным эффектом.

Таблица 2. **Фенотипическая характеристика фракции свежевыделенных мононуклеарных ККМ больных клеточной группы в сравнении со здоровыми донороми КМ в %**

Группы больных	CD34+CD45+, %	CD16+, cells/мкл	CD19+, cells/мкл	CD4+, cells/мкл	CD8+, cells/мкл	CD4/CD8	Лимфоциты, cells/мкл
2-я группа (больные ХСН)	2,2 ± 0,5	120±30	110±68	680±35	1140±50	0,6±0,2	1560±560
Здоровые доноры (контроль#)	2,6 ± 0,3	350±56	157±50	1110±40	500±26	2,2±0,9	2200±420

Примечание: # – группу здоровых доноров составили профессиональные спортсмены, n=20.

Полагая, что причиной выявленных различий в реакции больных на клеточную терапию может быть предсуществующая дизрегуляция иммунной системы, мы провели исследование иммунного статуса больных ИБС, поступивших в клинику для АКШ. Оказалось (рис. 4), что практически у всех больных ишемической ХСН в предоперационном периоде имеют место различные по направлению и выраженности отклонения в показателях клеточного (рис. 4А), гуморального и фагоцитарного (рис. 4В) звеньев иммунитета, при этом тяжесть нарушения коррелировала со степенью выраженности ХСН.

Эти данные указывали на тот факт, что поступающие на лечение больные ИБС имеют сформировавшуюся в процессе заболевания дисфункцию иммунной системы как по лимфоцитарному (Т- и В-лимфоциты), так и по моноцитарно-макрофагальному звеньям, обеспечивающим, как известно, адекватную регуляцию клеточных взаимодействий в иммунном ответе и в индукции процессов восстановительной регенерации поврежденной ткани [33].

Различные варианты отклонения отдельных показателей иммунного статуса и их сочетание требовало для оценки регуляторных возможностей клеток иммунной системы использовать обобщенный показатель ИС, суммарно оценивающий резервы функциональной активности всей популяции лейкоцитов крови (метод описан в разделе «материал и методы»). Разделив всех больных 2-й группы (клеточной терапии) на подгруппы в зависимости от значения ИС (ИС<1 и ИС>1), мы выявили скрытые ранее различия в усредненной карте иммунной системы этих больных (табл. 3).

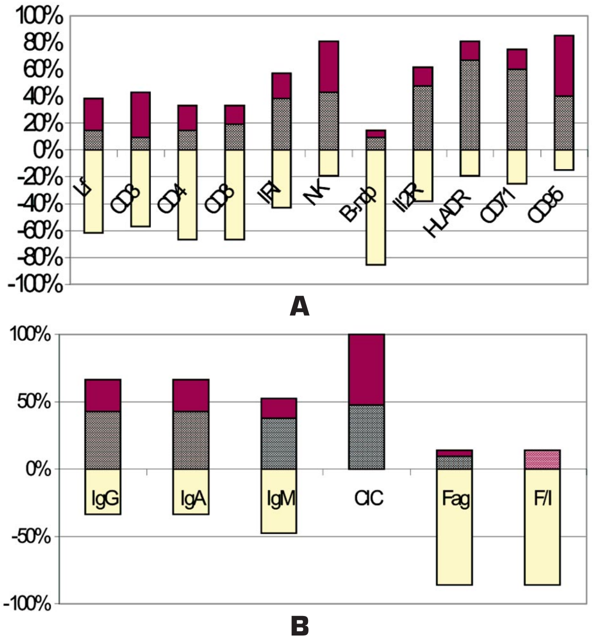

Рис. 4. Распределение больных (%) с ишемической ХСН (n=97) по отклонениям показателей клеточного (А), гуморального и фагоцитарного (В) звеньев иммунитета в предоперационном периоде. Обозначение: желтая часть столбика – меньше N; серая часть столбика – N; красная часть столбика – больше N

Таблица 3. **Исходные показатели иммунограммы кардиохирургических больных 2-й группы в зависимости от индекса стимуляции их мононуклеарных клеток**

Показатель	Здоровые доноры крови# (n=20) ИС 2,0-2,5	Кардиохирургические больные		
		Общая группа (n=57)	Группа с ИС>1,0 (n=16)	Группа с ИС <1,0 (n=41)
Лимфоциты, %	32,5±4,8	28,1±3,0	34,0±3,6	16,4±4,7 ↓*+
Т-лимфоциты, % в мкл ($CD3^+$)	67,5±4,6 1550±240	52,4±13,4 1410±190	70,5±6,6 1860±110	37,5±11,0 ↓*+ 460±110
Т-хелперы, % в мкл ($CD4^+$)	43,9±3,7 670±65	30,2±3,3 548±49	48,4±5,4 ↑ 940±120	22,4±7,5 ↓*+ 340±70
Т-цитотоксические,% в мкл ($CD8^+$)	28,1±3,6 330±55	23,0±2,4 290±45	25,2±3,5 540±78	22,0±4,9 ↓ 155±30,5
В-лимфоциты, % в мкл ($CD20^+$)	10,1±1,5 150±43	10,4±1,5 130±50	12,1±1,1 320±84	8,9±1,0 75±15
NK-клетки ($CD16^+$), %	13,9±1,6	12,2±1,4	15,9±3,2	10,0±1,4 ↓*+
HLA-DR	11,5±3,5	14,2±3,4	20,1±2,7 ↑*+	13,1±2,2
IL2-R+-кл. ($CD25^+$)	3,2±1,6	4,1±1,1	6,7±1,3 ↑*+	3,8±2,0
CD71+	3,0±0,5	3,1±0,2	4,5±0,5 ↑*+	2,5±0,1
IgG, г/л	13,0±0,9	17,1±1,3*	16,5±1,1 ↑*	18,3±2,0 ↑ *+
IgA, г/л	2,5±0,4	2,1±0,2	2,4±0,1	2,0±0,2
IgM, г/л	1,5±0,2	2,2±0,2	2,4±0,3 ↑*+	2,1±0,3 ↑*
ЦИК, у.е.	153,0±40,1	490,0±20,2*	370,0±42,2 ↑*+	599,4±60,7 ↑*+
Фагоцитарный индекс, %	75,5±3,5	51,7±2,9*	52,3±2,8*	50,9±3,0*
Фагоцитарное число, у.е.	5,5±1,7	3,5±0,3*	3,8±0,2*	3,1±0,2*

Примечание: * – достоверное различие по сравнению с показателями здоровых доноров крови ($p<0,05$);
+ – достоверное различие по сравнению с показателями больных с нормальной продукцией АФК ($p<0,05$);
↑, ↓ – повышение/снижение показателя по сравнению с группой здоровых доноров крови;
– группу здоровых доноров составили профессиональные спортсмены, n=20.

В усредненной иммунограмме по всей 2–й группе больных (n=57) выявлялись достоверные различия с группой здоровых доноров только по функциональным показателям фагоцитирующих клеток и В–лимфоцитов (уровень Ig и ЦИК). Разделив этих же больных в подгруппы с ИС>1 и ИС<1, мы смогли установить не только качественные, но и количественные различия в иммунограммах этих больных (см. табл. 3). Различия состояли в том, что хотя у больных с ИС>1, и выявлялись различия в функциональной активности клеток, но уже можно было отметить повышение количества активированных клеток (HLA–DR, IL–2–R, CD71⁺), что указывало на сохраняющиеся потенциальные резервы иммунной системы и возможность ее иммунокомпетентных клеток участвовать в адаптивных реакциях. В группе больных с ИС<1 удается выявить достоверное снижение общего числа лимфоцитов, Т–лимфоцитов и их популяций (Т–хелперы, Т–цитотоксические); отмечается тенденция к снижению количества В–лимфоцитов, NK – клеток, а также функциональной активности В–лимфоцитов и фагоцитов периферической крови. Достоверно более низкие значения показателей иммунограммы у больных с ИС<1 свидетельствуют о состоянии исходного стрессорного повреждения иммунной системы и костного мозга, снизившего продукцию иммунокомпетентных клеток в периферическую кровь. О снижении функциональной активности мононуклеарных ККМ у больных с ИС<1 свидетельствуют результаты изучения фенотипического состава ядерной фракции ККМ до и после их культивирования (рис. 5). Из рис. 5 видно, что процедура культивирования (*ex vivo* активирования) ККМ в питательной среде с добавлением субстратов и ростовых факторов у больных с ИС<1 приводила не к повышению, а к снижению количества клеток, несущих маркеры важнейших иммунокомпетентных клеток. В то же время культивирование ядерной фракции ККМ больных с ИС>1 приводило к увеличению количества клеток различного фенотипа.

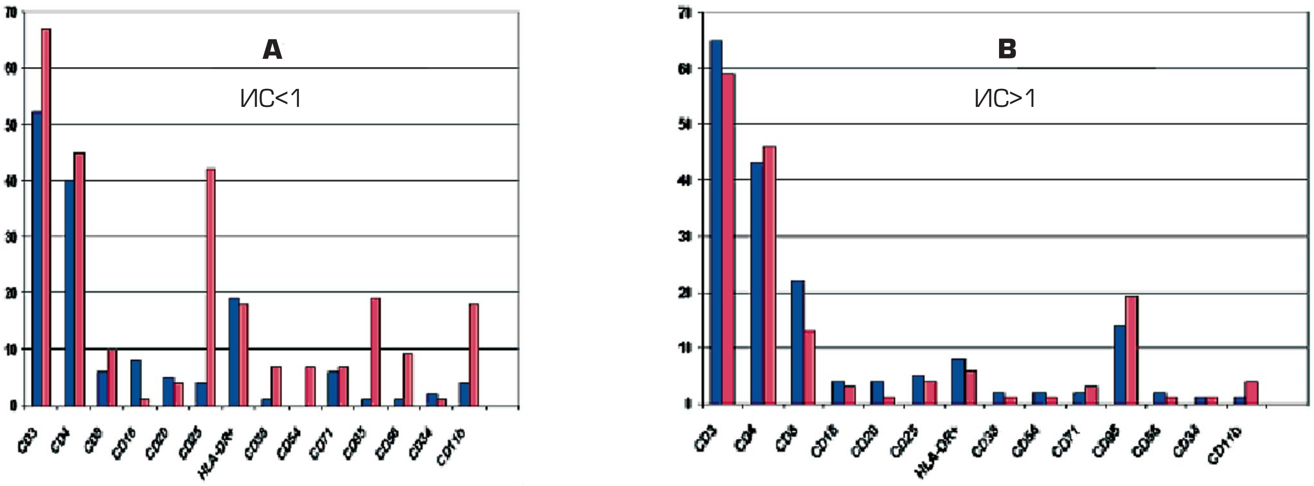

Рис. 5. Изменение фенотипического состава ядерной фракции клеток костного мозга после ex vivo активирования (культивирования) у больных с разным исходным значением индекса стимуляции (ИС) мононуклеарных клеток крови. Синие столбики – до культивирования; красные столбики – после культивирования

Установленные факты показывают, что при культивировании мононуклеарной фракции клеток от больных с ИС>1 действительно достигается эффект *ex vivo* активации и при использовании таких клеток у больных ХСН можно рассчитывать на позитивный клинический результат. Тогда как у больных с ИС<1 рассчитывать на благоприятный клинический результат нельзя. Именно эти больные, по нашему мнению, нуждаются в предварительной реадаптации, которая в условиях сформировавшегося иммунодефицита может быть достигнута с помощью курса индивидуально подобранной иммунокорригирующей терапии.

Наши исследования показали (табл. 4), что после курса терапии одним из подобранных иммунокорректоров уже на 10–14–е сутки происходит достоверно благоприятное изменение большинства изученных нами показателей; часть показателей достигала значений, присущих значениям здоровых доноров. О возникающей реадаптации мононуклеарных ККМ у больных с ИС<1, подвергшихся иммуномодуляции (*in vivo* активация клеток иммунной системы), свидетельствует восстановление продукции цитокинов этими клетками в процессе их культивирования (*ex vivo* активация мононуклеарных клеток).

Об определяющей роли исходного функционального состояния клеток иммунной системы, используемых для клеточной терапии, свидетельствуют результаты исследования объемных характеристик и функции сердца у больных ИБС через 6 мес. после трансплантации аутологичных мононуклеарных ККМ (табл. 5).

Корреляционный анализ влияния на эффективность клеточной терапии ИБС следующих факторов: функциональной активности аутологичных ККМ (ИС), возраста больного, длительности ХСН, количества введенных клеток (с одной стороны) и дельтой изменения КДО, КСО ЛЖ и ФИ ЛЖ у анализируемых больных через 6 мес. после операции (с другой)позволил выявить существование сильной корреляции только в следующих парах: ИС/ΔКДО ЛЖ – Spearman R=0,78, p=0,000545; ИС/ΔКСО ЛЖ – R=0,57, p=0,00074; ИС/Δ индекс DASI, Spearman R=0,45, p=0,0445; ИС/ΔФИ ЛЖ – Spearman R=0,45, p=0,007; длительность и тяжесть ХСН/ ΔКСО ЛЖ – Spearman R=0,73, p=0,043. Корреляционная связь отсутствовала между дельтой изменения исследуемых нами информационных показателей и возрастом пациента, количеством вводимых ККМ, количеством перенесенных инфарктов миокарда, а также интраоперационными данными (время искусственного кровообращения, время пережатия аорты, показателями интраоперационного мониторинга внутрисердечной гемодинамики).

Разделив больных на две группы в зависимости от значения ИС, мы подтвердили наши предположения о том, что именно от исходного функционального состояния ККМ зависит эффект их клинический применения (табл. 5).

Таблица 4. **Изменение иммунологических показателей у больных 2-й группы после курса иммунокорригирующей терапии (n=22)**

Иммунологические показатели, %	Контроль# (здоровые доноры) (n=20)	Больные до иммунокоррекции и после нее (n=22)	
		до коррекции	через 14 дней
Лимфоциты	32,5±4,8	24,2±2,2	30,0±2,0 ↑*
Т-лимфоциты (CD3+)	67,5±4,6	58,4±3,4ˣ	69,8±2,5 ↑*
Т-хелперы (CD4+)	43,9±3,7	32,0±3,1ˣ	45,5±2,4 ↑*
Т-цитотоксические CD8+)	28,1±3,6	16,7±2,2ˣ	25,7±2,0 ↑*
В-лимфоциты (CD20+)	10,1±1,5	6,3±1,1	8,6±0,9 ↑*
NK-клетки (CD16+)	13,9±1,6	19,5±2,9ˣ	16,5±2,0 ↓
HLA-DR	11,5±3,5	17,6±2,1ˣ	15,7±1,7 ↓
IL2-R+-кл. (CD25+)	3,2±1,6	5,6±0,9	3,3±0,1 ↓*
CD71+	3,0±0,5	8,7±2,0ˣ	11,0±2,8 ↑ˣ
IgG, г\л	13,0±0,9	15,5±0,9	16,0±1,8
IgA, г\л	2,5±0,4	2,5±1,1	3,6±0,3 ↑*
IgM, г\л	1,5±0,2	2,7±0,4ˣ	1,6±0,4 ↓*
ЦИК, у.е.	153,0±40,1	588,0±155,3ˣ	350,5±55,3 ↓*
Фагоцитарный индекс, %	75,5±3,5	52,7±2,8ˣ	65,6±4,2 ↑*
Фагоцитарное число, у. е.	5,5±1,7	3,1±0,2ˣ	5,0±0,8 ↑*+

Примечание: ˣ – достоверное различие по сравнению с группой здоровых доноров (p<0,05);
* – достоверное различие с исходным уровнем (до иммунокоррекции) (p<0,05);
↑, ↓ – повышение/снижение показателя по сравнению с исходным уровнем;
\# – группу здоровых доноров составили профессиональные спортсмены, n=20.

Таблица 5. **Значения параметров ремоделирования и функции сердца у больных ишемической ХСН через 6 мес. после операции АКШ с интрамиокардиальным введением культивированных клеток костного мозга**

Параметры	Больные ИБС		
	Исходный ИС<1 (n=11)	Исходный ИС>1 (n=17)	*p* Манна-Уитни
КДО ЛЖ, мл	169,3±21,7	179,1±26.8	0,06
Δ КДО ЛЖ, %, 6 мес.	–1,9±4,1	–9,21±4,6	0,0006
Δ ФИ ЛЖ, %, 6 мес.	9,1±2,9	21,2±10,7	0,7
КСО ЛЖ, мл	85,7±24,2	97,03±11,6	0,19
Δ КСО ЛЖ,%, 6 мес.	–9,2±18,08	–24,6±21,26	0,049
ΔУО ЛЖ, мл, 6 мес.	–5,05±6,9	–18,7±14,2	0,01
Δ Индекс DASI	6,3±1,9	9,5±3,1	0,04

Обозначение: *p* – коэффициент достоверности различий между несвязанными группами, по критерию Манна-Уитни; КДО ЛЖ – конечно-диастолический объем; ФИ ЛЖ – фракция изгнания левого желудочка; КСО – конечно-систолический объем; УО – ударный объем; DASI – индекс физической активности; Δ – дельта изменений, рассчитывалась по О.Ю. Ребровой (2002).

Там, где исходно ИС>1,0, через 6 мес. происходит достоверно выраженное благоприятное уменьшение КСО ЛЖ и увеличение ФИ ЛЖ по сравнению с группой реципиентов, у которых ИС<1,0. Полученные нами данные свидетельствовали о позитивном изменении функции сердца в группе с ИС>1,0 и об отсутствии достаточного позитивного клинического эффекта при использовании клеток у больных с ИС<1,0. Именно за счет существования больных ХСН с ИС<1 в целом по группе клеточной терапии в сравнении с контрольной группой не всегда обнаруживались статистически значимые различия (рис. 6 , табл. 6).

Исходя из того, что исходное состояние иммунной системы является определяющим фактором эффективности применения аутологичных ККМ, наша работа по стабильному улучшению результатов клеточной терапии стала включать несколько этапов: предварительную оценку исходного состояния иммунной системы по значениям ИС; активацию мононуклеарных клеток крови и ККМ *in vivo* индивидуально подобранными иммунокорректорами, если значения ИС<1 для достижения значения ИС>1; активация *ex vivo* выделенных ККМ в процессе 4–5 дневного культивирования. Результаты трансплантации ККМ предварительно активированных *in vivo* и *ex vivo*, представлены в табл. 6.

Проведение активации мононуклеарных ККМ последовательно *in vivo* и *ex vivo* позволило нам повысить эффективность трансплантации аутологичных ККМ у больных ХСН, что привело к более значимым положительным изменениям КСО, КДО и ФИ ЛЖ в сравнении с контрольной группой (рис. 6).

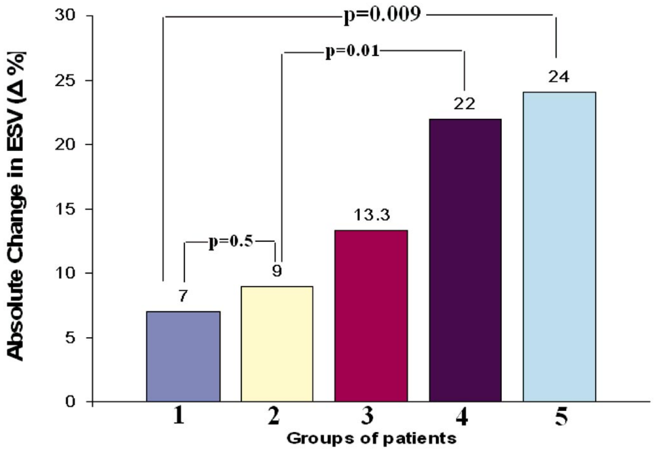

Рис. 6. Абсолютные изменения (уменьшение) КСО ЛЖ через 6 мес. после трансплантации аутологичных ККМ при применении различного типа ККМ:
Группа 1 – АКШ; группа 2 – АКШ +ККМ с ИС<1;
группа 3 – АКШ + ККМ с ИС<1, активированные ex vivo;
группа 4 – АКШ + ККМ активированные in vivo и ex vivo;
группа 5 – АКШ + ККМ с ИС >1, активированные in vivo и ex vivo

Из рис. 6 видно, что ΔКСО ЛЖ у больных с ИС<1, – статистически значимо не отличается от контрольной группы больных, перенесших АКШ, тогда как изменения КСО ЛЖ у больных, которым АКШ дополнялось введением ККМ с ИС>1 и активированными последовательно *in vivo* и *ex vivo*, различия становились достоверно более выраженными.

Обсуждение

ХСН как биологическая категория представляет собой хронический стресс, который развивается в результате уменьшения массы функционирующих структур миокарда, возрастания объема сократительной функции (т.е. энергозатрат) на единицу структуры органа и развития компенсаторной гипертрофии сохранившихся структурных элементов. Для пролонгирования стадии компенсаторной гипертрофии, торможения дистрофии и гибели оставшихся в органе сократительных структур из-за дефицита энергии, необходимой для пластических и регуляторных процессов, организм переходит на новый, менее интенсивный уровень жизнедеятельности. На этой стадии развивается иммунная дизрегуляция – снижается индукционная и информационная активность лимфоцитов и других мононуклеарных клеток, нарушается продукция ими цитокинов и регуляторных пептидов, резко ослабляется или прекращается миграция гемопоэтических клеток из костного мозга в кровоток, нарушается популяционный состав клеток периферической крови, а также снижается реактивность клеток (снижение пролиферативного ответа на митогены) [21, 22].

Подтверждением развития иммунной дизрегуляции служат наши данные о более низкой реактивности мононуклеарных клеток ККМ в условиях культивирования (изменения фенотипического состава клеток, продукция цитокинов – TGF-β, G-CSF и IL-10 на фоне развития тяжелой иммунной недостаточности (ИС<1) у больных ХСН. Изъятие и введение ККМ в зоны повреждения миокарда позволяет компенсировать дефицит миграционной активности ККМ, но эта процедура не повышает их функциональную активность, связанную с метаболизмом, продукцией тканевых медиаторов и регуляторных пептидов. Очевидно, такая ситуация характеризуется отсутствием выраженного клинического эффекта от применения ККМ. Использование аллогенных ККМ от здоровых доноров или клеток пуповинной крови может оказаться целесообразным, однако трансплантация аллогенного биологического материала имеет свои недостатки.

В соответствии с изложенной нами концепцией, наиболее действенным способом повышения регенераторной активности иммунной системы может стать предложенный нами метод двухэтапной активации ККМ: сначала *in vivo* с помощью иммунокорректоров, а затем *ex vivo* на этапе культивирования клеток. Обнадеживающим в этой методике является тот факт, что двухэтапная активация ККМ способствует более значимому уменьшению полости ЛЖ у больных ишемической ХСН в группе клеточной терапии в сравнении с контрольной группой, так как не только (или не столько) жизнеспособность миокарда определяет отдаленные результаты хирургического лечения ишемической ХСН, но и степень дилатации ЛЖ. Аналогичные результаты получены также при лечении острого инфаркта миокарда [35].

Так как исходная степень дилатации ЛЖ в наибольшей степени влияет на отдаленную выживаемость больных ишемической ХСН, перенесших АКШ, то можно предположить, что применение ККМ у больных ишемической ХСН будет способствовать повышению отдаленной выживаемости больных ишемической ХСН.

Мы полагаем также, что предложенный метод двухэтапной активации ККМ может быть полезен при лечении любого хронического заболевания, например, сахарном диабете 2-го типа, т.к. патогенез дисфункции ККМ имеет схожие черты при любой хронической патологии.

Таблица 6. **Объемные показатели ЛЖ через 6 мес. после АКШ у больных без (контрольная группа) и с применением клеточной терапии (основная группа). Для клеточной терапии использовали клетки после их *in vivo* и *ex vivo* активации**

Параметр	До лечения			Через 6 мес.,			Δ изменений, %		
	АКШ+ККМ n=38 *Me*	АКШ n=40 *Me*	*P**	АКШ+ККМ n=50 *Me, p1*	АКШ n=50 *Me, p1*	*P**	АКШ+ККМ *Me*	АКШ *Me*	*P**
КСО ЛЖ, мл	80	76	0,36	650,03	700,046	0,09	–21,3	–7	0,01
ФИ ЛЖ, %	49,5	51,5	0,33	560,017	550,021	0,3	27,9	9,2	0,02
Индекс DASI	36,7	39,1	0,29	490,006	460,005	0,12	38	18	0,04
КДО ЛЖ, мл	165	162	0,18	1420,120	1520,056	0,06	–16	–4	0,01

Обозначения: АКШ – аортокоронарное шунтирование; ККМ– клетки костного мозга; *Me* – медиана; *P** – коэффициент достоверности различий между несвязанными группами (контрольная группа и группа клеточной терапии), по критерию Манна-Уитни; *p*1 – коэффициент достоверности различий между связанными группами, по критерию Вилкоксона; КСО – конечно-систолический объем; ФИ ЛЖ – фракция изгнания левого желудочка; DASI – индекс физической активности; КДО ЛЖ – конечно-диастолический объем.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Patel A.N., Geffner L., Vina R.F. et al. Syrgical treatment for congestive heart failure using autologius adult stem cell transplantation. Heart and lung trans. 2004; 23(№2s): 61.

2. Perin E.C., Geng Y.–J., Willerson J.T. Adult stem cell in perspective. Circ. 2003; 107: 935–8.

3. Perin E.C.; Dohmann Hans F.R., Borojevic R. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. Circ. 2003; 107: 2294–302.

4. Gao L.R., Wang Z.G., Zhu Z. M. et al. Effect of Intracoronary Transplantation of Autologous Bone Marrow–Derived Mononuclear Cells on Outcomes of Patients With Refractory Chronic Heart Failure Secondary to Ischemic Cardiomyopathy. Am J. Cardiol. 2006; 98(5): 597–602.

5. Kuethe F., Richartz B., Kasper Ch. et al. Autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in chronic ischemic cardiomyopathy in humans. Int. J. Cardiology 2005; 100(3): 485–91.

6. Rosenzweig A. Cardiac cell therapy—mixed results from mixed cells. N. Engl. J. Med. 2006; 355: 1274–7.

7. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S. et al. Marrow–derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytikines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. Circ. Res. 2004; 94: 687–2.

8. Stefanie D., Spyridopoulos I., Haendeler J. et al. Statins Enhance Migratory Capacity by Upregulation of the Telomere Repeat–Binding Factor TRF2 in Endothelial Progenitor Cells. Circ. 2004; 110: 3136–42.

9. Dimmeler S., Zeiher A.M. Wanted! The best cell for cardiac regeneration. J. Am. Coll. Cardiol. 2004; 44(2): 464–6.

10. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J. et al. Neovascularisation of ishemic myocardium by human bone–marrow derivated angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat. Med. 2001; 7: 430–6.

11. Dewald O., Zymek P., Winkelmann K. et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein–1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. Circ Res. 2005; 96: 881–9.

12. Thum T., Bauersachs J., Poole–Wilson P.A. et al. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. J. Am. Coll. Cardiol. 2005; 46: 1799–802.

13. Minatoguchi S., Takemura G., Chen X.H. et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colonystimulating factor treatment. Circul. 2004; 109: 2572–80.

14. Trial J., Rossen R.D., Rubio J., Knowlton A.A. Inflammation and Ischemia: Macrophages Activated by Fibronectin Fragments Enhance the Survival of Injured Cardiac Myocytes. Exp. Biol. Med. 2004; 229(6): 538–45.

15. Chazaud B., Sonnet C., Lafuste P. et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. J. Cell. Biol. 2003; 163: 1133–43.

16. Anversa P., Susman M. Molecular Genetic Advances in Cardiovascular Medicine. Circ. 2004; 109: 2832–8.

17. Awad O., Dedkov E.I, Chunhua J. et al. Differential Healing Activities of CD34+ and CD14+ Endothelial Cell Progenitors. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006; 26: 758–64.

18. Rota M., LeCapitaine N., Hosoda T. Diabetes Promotes Cardiac Stem Cell Aging and Heart Failure, Which Are Prevented by Deletion of the p66shc Gene. Circ. Res. 2006; 99: 42–52

19. Rauscher F.M., Goldschmidt–Clermont P.J., Davis B.H. et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. Circul. 2003; 108: 457–63.

20. Messina E., Giacomello A. Diabetic Cardiomyopathy A "Cardiac Stem Cell Disease" Involving p66Shc, an Attractive Novel Molecular Target for Heart Failure Therapy. Circ. Res. 2006; 99: 1–2.

21. Karra R.S., Vemullapalli C., Dong E.E. et al. Stem Cells of Aging Donors – Insufficient Capacity to Repair Causes Progression of Atherosclerosis in the Recipient: Molecular Evidence for Arterial Repair in Atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005; 102: 16789–94.

22. Karra R., Vemullapalli S., Dong C, Herderick EE, Song X, Slosek K, Nevins JR, West M, Goldschmidt–Clermont PJ, Seo D. Molecular evidence for arterial repair in atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:16789 –16794

23. Lehrke S., Mazhari R., Durand D.J. et al. Aging Impairs the Beneficial Effect of Granulocyte Colony–Stimulating Factor and Stem Cell Factor on Post–Myocardial Infarction Remodeling. Circ. Res. 2006; 99(5): 553–60.

24. Schatteman G.C., Ma N. Old Bone Marrow Cells Inhibit Skin Wound Vascularization. Stem Cells 2006; 24(3): 717–21.

25. Sata M. Role of Circulating Vascular Progenitors in Angiogenesis, Vascular Healing, and Pulmonary Hypertension. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006; 26: 1008–14.

26. Epstein S.E., Stabile E., Kinnaird T. et al. Janus Phenomenon The Interrelated Tradeoffs Inherent in Therapies Designed to Enhance Collateral Formation and Those Designed to Inhibit Atherogenesis. Circul. 2004; 109: 2826–31.

27. Nagashima H., Kawashira–Hirata N., Imamura K. et al. Congestive heart failure after peripheral blood stem cells transplantation, role of cytokines. Jpn. Circ. J. 2000; 64: 382–4.

28. Boyle A.J., Schulman S.P., Hare J., Oettgen P. Cardiac Stem Cell Therapy: Need for Optimization of Efficacy and Safety Monitoring. Circul. 2006; 114: 339–52.

29. Шумаков В.И., Казаков Е.Н., Онищенко Н.А., Гуреев С.В. Первый клинический опыт использования стволовых клеток костного мозга для восстановления насосной функции сердца. Росс. кардиологический журнал 2003; 5: 42–6.

30. Гуреев С.В., Казаков Е.Н., Онищенко Н.А. Трансплантация клеток костного мозга для лечения сердечной недостаточности. Вестник трансплантологии и искусственных органов 2004; 4: 27–34.

31. Hasper D., Hummel M., Kleber F.X. Systemic inflammation in patients with heart failure. European Heart J. 1998; 19: 761–5.

32. Levine T.B., Levine A.B., Bolenbaugh J., Green P.R. Reversal of heart failure remodeling with age. Am. J. Geriatr. Cardiol. 2002; 11(5): 299–304.

33. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. М.: Медицина 1985: 256.

34. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: Медиа Сфера 2003:

35. Uemura R., Xu M., Ahmad N., Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. Circ. Res. 2006; 98: 1414–21.