



УДК 617.57. 58: 616.13 – 004.6

СТИМУЛЯЦИЯ КОЛЛАТЕРАЛЬНОГО КРОВОТОКА МЕТОДОМ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ С ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ БЕДРЕННО-ПОДКОЛЕННО-БЕРЦОВОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Представлены результаты применения аутологичных прогениторных клеток костного мозга для стимуляции неоангиогенеза у 42 больных с дистальной формой облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей, при невозможности выполнения реконструктивной операции. Пациенты были распределены в 3 группы по 14 человек: I группа – больные, которым вводились аутологичные прогениторные клетки CD 133+; во II группе вводилась лейкоцитарная фракция клеток костного мозга (CD 34+); III группа (плацебо) – больные, которым был введен физиологический раствор. Полученный препарат вводили в мышцы внутренней и внешней поверхности голени. Оценка результатов по шкале Rutherford показала, что в I и II группах пациентов, получивших клеточный материал, наблюдается статистически значимое улучшение клинического состояния по сравнению с III группой «плацебо» ($p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни).

Ключевые слова: хроническая ишемия нижних конечностей, трансплантация стволовых клеток, костный мозг, предшественники эндотелиоцитов.

А.В. Казанцев
Е.А. Корымасов

*Самарский государственный
медицинский университет*

e-mail: dockazantsev@mail.ru

Введение. В последнее время среди больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей увеличивается удельный вес поражения бедренно-подколенно-берцового сегмента [1]. Выбор хирургической тактики у таких пациентов является наиболее трудной задачей современной ангиохирургии, особенно при развитии критической ишемии: применение методов прямой реваскуляризации возможно лишь у 40–70% больных. Основной причиной невозможности выполнения и неудовлетворительных результатов реконструктивных операций является этажность поражения с преимущественной окклюзией артерий голени [1, 2, 3]. Единственным выходом в таких ситуациях являются различные методы непрямо́й реваскуляризации, направленные на развитие коллатерального кровообращения. Одним из перспективных методов стимуляции неоангиогенеза является клеточная терапия [4, 5] и генно-инженерные технологии [3, 6]. Немногочисленные исследования демонстрируют эффективность клеточной трансплантации в плане восстановления кровоснабжения мышц [6, 7, 8].

Цель исследования: изучение эффективности применения аутологичных прогениторных клеток костного мозга у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.

Материалы и методы исследования. В исследование включены 42 пациента (мужчины) с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, в возрасте от 46 до 69 лет (в среднем $57 \pm 1,8$ лет). Длительность заболевания составила от 1 года до 16 лет (в среднем $5,8 \pm 4,17$ лет) (табл.1).

Таблица 1

Длительность анамнеза облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей до начала лечения (с момента постановки диагноза)

| Анамнез заболевания | I группа | II группа | III группа | Всего |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1-2 года | 3 | 3 | 5 | 11 |
| 3-4 года | 1 | 4 | 4 | 9 |
| 5-6 лет | 1 | 6 | 2 | 9 |
| 7-8 лет | 1 | 1 | - | 2 |
| 9-10 лет | 5 | - | 1 | 6 |
| 11 лет и более | 3 | - | 2 | 5 |
| Средняя длительность анамнеза | $6,3 \pm 3,12$ | $4,5 \pm 3,25$ | $5,3 \pm 5,13$ | $5,8 \pm 4,17$ |



У всех больных была II Б стадия заболевания по классификации А.В. Покровского (дистанция безболевого ходьбы 10–50 м), поражение бедренно-подколенного и/или подколенно-берцового сегмента, невозможность выполнения реконструктивной операции. У 15 больных ранее была выполнена поясничная симпатэктомия, реваскуляризирующая остеоперфорация большеберцовой кости, ампутация пальцев стопы (у 3 больных с 2 сторон).

Протокол исследования прошел экспертизу в Комитете по биоэтике и был утвержден Ученым Советом ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава» в рамках комплексной научно-практической программы «Применение стволовых клеток в медицине». У всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Всем больным в соответствии с протоколом выполняли общеклинические лабораторные исследования, биохимический анализ крови, цветное дуплексное картирование артерий нижних конечностей с измерением лодыжечно-плечевого индекса, реовазографию нижних конечностей, тредмил-тест, трансфеморальную ангиографию нижних конечностей, оценку качества жизни по международной шкале SF-36.

По дизайну данное исследование является рандомизированным, двойным слепым, плацебо-контролируемым, ограниченной клинической апробацией метода. Все пациенты путем рандомизации были распределены на 3 группы по 14 человек. В I группу вошли больные, которым вводились аутологичные прогениторные клетки CD133+. Во II группу вошли пациенты, которым вводилась лейкоцитарная фракция клеток костного мозга (CD34+). В III группу (плацебо) вошли больные, которым был введен физиологический раствор. Ни врач, ни больной не знали, какой препарат применяли для лечения («двойное слепое» исследование). Все пациенты получали одинаковую «базовую» медикаментозную терапию (пентоксифиллин, реополиглюкин, никотиновая кислота).

Забор костного мозга осуществлялся в операционной, под наркозом, путем пункции передних и задних остей подвздошных костей. Костный мозг аспирировали шприцем, затем переводили его в строенный пакет «Baxter» с 63 мл антикоагулянта цитрат-фосфат-декстрозы-аденина (CPDA-1). Среднее количество эксфузата, включая антикоагулянт, составило 645,25 мл. Далее костный мозг подвергали обработке методом двойного центрифугирования с целью получения лейкоцитарной фракции клеток костного мозга (CD34+). Выделение CD133+ клеток проводили методом иммуномагнитной сепарации с использованием реагентов «Miltenyi Biotec» в соответствии с инструкцией производителя. Методом проточной цитометрии выполняли оценку количества CD34+ и CD133+ клеток в эксфузате костного мозга до и после выделения клеток (с использованием реагентов «BD Pharmingen» на цитометре «Facsanto»). У пациентов III группы (плацебо) выделенную лейкоцитарную фракцию клеток костного мозга подвергали программному замораживанию и хранили для дальнейшего использования в дьюарах с жидким азотом при температуре -196°C.

Полученный препарат вводили в мышцы по латеральной и медиальной поверхности голени в 10 точек на каждой конечности, по 1,5 мл в каждую точку.

В I группе количество введенных CD133+ клеток на 1 конечность составило $(1,26 \pm 0,12) \cdot 10^6$. Во II группе среднее количество введенных в одну конечность CD34+ клеток составило $(8,69 \pm 0,34) \cdot 10^6$ и CD133+ $(1,84 \pm 0,11) \cdot 10^6$.

Осложнений после общего обезболивания, трепанации подвздошной кости и введения препарата не отмечено ни у одного из пациентов.

Результаты и их обсуждение. Период наблюдения пациентов составил 12 месяцев. Информация о вводимом препарате была раскрыта после окончания обследования всех пациентов через 6 месяцев. В этот же период пациентам III группы была возвращена лейкоцитарная фракция клеток костного мозга (CD34+), забранная во время основного этапа исследования. Оценка клинических исходов проводилась в баллах по шкале Rutherford, в соответствии с «Рекомендуемыми стандартами для оценки результатов лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей», принятыми Российским Консенсусом 2001 г. Оценка эффективности лечения проводилась отдельно для каждой конечности, в которую был введен препарат (табл. 2).



Таблица 2

Изменения в клиническом статусе больных по шкале Rutherford

| Критерий шкалы | I группа 20 конечностей | II группа 17 конечностей | III группа 23 конечности |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| +2 умеренное улучшение | 45% 9 конечностей | 47% 8 конечностей | 4,3% 1 конечность |
| +1 минимальное улучшение | 35% 7 конечностей | 41,2% 7 конечностей | 17,5% 4 конечности |
| 0 без изменений | 10% 2 конечности | 5,9% 1 конечность | 56,5% 13 конечностей |
| -1 незначительное ухудшение | 10% 2 конечности | 5,9% 1 конечность | 13% 3 конечности |
| -2 умеренное ухудшение | 0 | 0 | 8,7% 2 конечности |
| Критерий Манн-Уитни | p>0,1 | | p<0,001 |

У пациентов I и II групп, получивших клеточный материал, наблюдается статистически значимое улучшение клинического состояния по сравнению с больными III группы «плацебо» (p<0,001).

По результатам тредмил-теста до лечения дистанция безболевой ходьбы пациентов в среднем составила 45,2±11,09 м. Через 1, 6 и 12 месяцев дистанция безболевой ходьбы статистически значимо увеличилась в I и II группах по сравнению с III группой «плацебо» (p<0,05). Статистически значимых отличий в динамике безболевой ходьбы у пациентов I и II групп не обнаружено (табл. 3).

Таблица 3

Динамика показателей тредмил-теста

| Срок изучения | I группа | II группа | III группа |
|---------------|-------------|-------------------------|-----------------------------------|
| До лечения | 46,4± 9,29 | 40,7±15,42 t1= 1,19 | 48,6±5,35 t2= 0,75 t3= 1,80 |
| Через 1 мес. | 111,1±42,71 | 66,1±33,64 t1=3,09* | 61,8±20,90 t2= 3,80* t3= 0,40 |
| Через 6 мес. | 132,1±85,59 | 125,4±87,24 t1= 0,20 | 64,3±41,27 t2= 2,67* t3= 2,35* |
| Через 1 год | 135,0±86,27 | 130,0±88,89 t1= 0,15 | 75,0±43,98 t2= 2,32* t3= 2,06* |

Примечание: t – критерий Стьюдента; t1 – различия между I и II группой; t2 – различия между I и III группой; t3 – различия между II и III группой; * – p<0,05.

Ангиография нижних конечностей выполнялась всем пациентам до лечения и через 6 месяцев после введения клеточного материала. Оценка ангиограмм проводилась отдельно для каждой конечности в баллах, в зависимости от степени развития коллатеральной сети [8]: 0 (отсутствие развития коллатералей), +1 (незначительное развитие коллатералей), +2 (умеренное развитие коллатералей), +3 (богатое развитие коллатералей).

Среди больных, которым вводили клеточный материал (I и II группы), число пациентов с «незначительным», «умеренным» и «богатым» развитием коллатералей было больше по сравнению с пациентами III группы (различия статистически значимые: p<0,05 по критерию Манна-Уитни).

Оценка результатов лечения по шкале SF-36 выявила статистически значимое улучшение показателей качества жизни пациентов в I и II группах по сравнению с III группой (p<0,05 по критерию Манна-Уитни): физической работоспособности, физического состояния, уменьшения болевого синдрома, общего здоровья, энергичности. Не обнаружено статистически значимой динамики качества жизни по показателям социальная роль, эмоциональное состояние, психическое здоровье (p>0,05 по критерию Манна-Уитни).

Таким образом, проведенное рандомизированное исследование убедительно подтвердило эффективность способа стимуляции коллатерального кровотока у больных облитерирующим атеросклерозом артерий при бедренно-подколенно-берцовом поражении. Сравнительно легкая выполнимость, относительная безопасность, малая травматичность, клинично-инструментальная эффективность, убедительная доказательная база свидетельствуют о возможности применения в клинической практике в качестве метода лечения.

Считается, что главную роль в терапевтическом неоангиогенезе играют эндотелиальные клетки-предшественники экспрессирующие CD34+, и CD133+. После трансплантации в зону ишемии данные клетки могут способствовать неоангиогенезу двумя путями: непосредственно дифференцироваться в эндотелиальные клетки и/или выделять ангиопоэтические факторы, способствующие росту капилляров [9,10]. Проведенное нами исследование показало эффективность применения как CD34+, так и CD133+ фракции клеток костного мозга, причем статистически значимых различий между этими группами не получено. Однако процесс получения CD133+ клеток более трудоемок и дорогостоящ. В дальнейшем для лечения возможно применение только CD34+ фракции костного мозга.

Исходя из небыстрого развития эффекта, применение данного метода возможно только для больных со II Б стадией облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. В дальнейшем возможны научные разработки и у больных с хронической критической ишемией нижних конечностей.

Заключение. Применение аутологичных прогениторных клеток костного мозга эффективно и безопасно у больных со II Б стадией облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. Применение данного метода лечения возможно у пациентов с дистальной формой облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей, у которых нет условий выполнения реконструктивной операции, а также у больных, которым уже была выполнена реконструктивная операция или непрямая реваскуляризация, но отмечается прогрессирование ишемии конечности.

Литература

1. Клеточные технологии в лечении терминальной стадии хронической ишемии нижних конечностей / А.Б. Смолянинов[и др.]// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т.2. – №3. – С. 40-46.
2. Отдаленные результаты лечения хронической ишемии нижних конечностей с использованием генно-инженерных конструкций с геном ангиогенина/ Б.А. Константинов [и др.] // Анналы хирургии. – 2005. – №3. – С.23-26.
3. Покровский, А.В. Клиническая ангиология: руководство для врачей / А.В. Покровский. – М.: Медицина. – 2004. – 888 с.
4. Савельев, В.С. Патогенез и консервативное лечение тяжелых стадий облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей / В.С. Савельев, В.М. Кошкин, А.В. Каралкин. – М., 2010. – 216 с.
5. Шевченко, Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии / Ю.Л. Шевченко// – СПб.: Наука. – 2006. – 287 с.
6. Эффективность и безопасность комплексного метода лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных индукторов ангиогенеза / А.В. Гавриленко[и др.]// Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания. – 2008. – Т.9. – № 6. – С. 291.
7. Angiogenesis facilitated by autologous whole bone marrow stem cell transplantation for Buerger's disease / Kim Dong-Ik (et al.) // Stem Cells. – 2006. – № 24. – P. 1194-1200.
8. Peripheral endothelial progenitor cells (CD133+) for therapeutic vasculogenesis in a patient with critical limb ischemia. One year follow-up / M.C. Canizo (et al.) // Cytotherapy. – 2007. – Vol.9. – № 1. – P. 99-102.
9. Critical Limb Ischemia Classification and Therapeutic Angiogenesis / T.K. Ho [et al.] // International Journal of Angiology. – 2005. – № 14. – P. 49-59.
10. Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs / A. Kawamura [et al.] // J. Artif. Organs. – 2006. – № 9. – P. 226-233.



11. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclears in patients with thromboangiitis obliterans / K. Miyamoto [et al.] // *Circ.* – 2006. – № 114. – P. 2679-2684.

STIMULATION COLLATERAL BLOOD METHODS OF CELL THERAPY IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS OBLITERANS OF THE FEMORAL-POPLITEAL-TIBIAL LOCALIZATION

A.V. Kazantsev
E.A. Korymasov

Samara State Medical University

e-mail: dockazantsev@mail.ru

The results of neoangiogenesis have been studied for the treatment of 42 patients with arterial atherosclerosis occlusive disease of lower extremities who are not candidates for surgical treatment. We studied the results in the 3 groups including 14 patients in the each. Autological progenitor cells (CD 133+) were transplanted in I-st group. Leucocytes bone marrow cells (CD 34+) were transplanted in II group. The patients of III group were injected isotonic solution as a placebo. All of solutions were injected in internal and external muscles of shin. We appreciated our clinical results in Rutherford's scale. In conclusion, we observed what the improvement of clinical condition in patients (with a transplantation of CD 133+ and CD 34+ of I and II groups) was trustworthy by Mann-Whitney's criterion.

Keywords: chronic ischemia of the lower extremities, stem cells transplantation, bone marrow, endothelial progenitors.