

ВОЗМОЖНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ В СТИМУЛЯЦИИ КОЛЛАТЕРАЛЬНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ У БОЛЬНЫХ С ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Казанцев А.В., Корымасов Е.А.

ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Росздрава», Самара,
e-mail: dockazantsev@mail.ru

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 1-й и 2-й группах пациентов, получивших клеточный материал, наблюдается статистически значимое улучшение клинического состояния по сравнению с 3-й группой «плацебо» ($p < 0,001$ по критерию Манна–Уитни).

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

Реконструктивное вмешательство на сосудах является оптимальным способом лечения облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей [3]. Однако такая операция не всегда выполнима из-за грубого поражения дистального русла конечности [4]. Способы непрямого реваскуляризации расширили возможности сосудистой хирургии, но результаты их применения не всегда удовлетворительные [2]. Одним из альтернативных путей решения проблемы может быть использование методов стимуляции неоангиогенеза, из которых наиболее перспективным на сегодняшний момент является применение аутологичных прогениторных клеток [5, 6].

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

Материал и методы исследования

В исследование включены 42 пациента (мужчины) с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей в возрасте от 46 до 69 лет (средний возраст $57 \pm 1,8$ лет). Длительность заболевания составила от 1 года до 16 лет (в среднем $5,8 \pm 4,17$ лет). У всех больных была II Б стадия заболевания по классификации Fontaine (1954), 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, тредмил-тест, трансфеморальную ангиографию нижних конечностей, оценку качества жизни по международной шкале SF-36.

По дизайну данное исследование является рандомизированным, двойным слепым, плацебо-контролируемым, ограниченным клинической апробацией метода. Все пациенты путем рандомизации были распределены в 3 группы по 14 человек. В I группу вошли больные, которым вводились аутологичные прогениторные клетки CD 133+. Во II группу вошли пациенты, которым вводилась лейкоцитарная фракция клеток костного мозга (CD 34+). В III группу (плацебо) включены больные, которым был введен физиологический раствор. Врач и больной не знали, какой препарат применялся для лечения («двойное слепое» исследование). Все пациенты получали одинаковую «базовую» медикаментозную терапию (пентоксифиллин, реополиглокин, никотиновую кислоту).

Забор костного мозга осуществлялся в операционной под наркозом путем пункции передних и задних остей подвздошных костей. Далее костный мозг подвергали обработке методом двойного центрифугирования с целью получения лейкоцитарной фракции клеток костного мозга (CD 34+). Выделение CD 133+ клеток проводили методом иммуно-магнитной сепарации с использованием реагентов Miltenyi Biotec в соответствии с инструкцией производителя. Методом проточной цитометрии выполняли оценку количества CD 34+ и CD 133+ клеток в эксфузате костного мозга до и после выделения клеток (с использованием

реагентов BD Pharmingen, на цитометре Facscanto). 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 CD 133+ клеток в 1 конечность составило $(1,26 \pm 0,12) \cdot 10^6$. Во II группе среднее количество введенных в одну конечность CD 34+ клеток составило $(8,69 \pm 0,34) \cdot 10^6$ и CD 133+ $(1,84 \pm 0,11) \cdot 10^6$.

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

Результаты исследования и их обсуждение

Период наблюдения пациентов составил 12 месяцев. Информация о вводимом препарате была раскрыта после окончания обследования всех пациентов через 6 месяцев. 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 в 2001 г.

Оценка эффективности лечения проводилась отдельно для каждой конечности, в которую был введен препарат. Среди 14 пациентов I группы введение клеточного материала проводилось в 20 конечностей. В 45% случаев (9 конечностей) достигнуто умеренное улучшение клинического статуса, в 35% случаев (7 конечностей) достигнуто минимальное улучшение клинического статуса, в 10% случаев (2 конечности) нет изменений в клиническом статусе, в 10% случаев (2 конечности) наблюдалось незначительное ухудшение клинического статуса.

Среди 14 пациентов II группы введение клеточного материала проводилось в 18 конечностей. Однако оценка проводилась по 17 конечностям, так как 1 больной умер через 4 мес. после операции от инфаркта миокарда. В 47% случаев (8 конечностей) достигнуто умеренное улучшение клинического статуса, в 41,2% случаев (7 конечностей) достигнуто минимальное улучшение клинического статуса, в 5,9% случаев (1 конечность) нет изменений в клиническом статусе, в 5,9% случаев (1 конечность) наблюдалось незначительное ухудшение клинического статуса.

Среди 14 пациентов III группы введение препарата проводилось в 23 конечности. В 4,3% случаев (1 конечность) достигнуто умеренное улучшение клинического статуса, в 17,5% случаев (4 конечности) достигнуто минимальное улучшение клинического статуса, в 56,5% случаев (13 конечностей) нет изменений в клиническом статусе, в 13% случаев (3 конечности) наблюдалось незначительное ухудшение, в 8,7% случаев (2 конечности) наблюдалось умеренное ухудшение.

Таким образом, в I и II группах пациентов, получивших прогениторные клетки, наблюдается статистически значимое улучшение клинического состояния по сравнению с III группой – плацебо ($p < 0,001$ по критерию Манна–Уитни).

По результатам тредмил-теста до лечения дистанция безболевой ходьбы в среднем составила $45,2 \pm 11,09$ м. Через 1, 6 и 12 месяцев дистанция безболевой ходьбы увеличилась во всех группах и составила в I группе $111,1 \pm 42,71$ м, $132,1 \pm 85,59$ м, $135,0 \pm 86,27$ м соответственно, во II группе $66,1 \pm 33,64$ м, $125,4 \pm 87,24$ м, $130,0 \pm 88,89$ м соответственно, в III группе – $61,8 \pm 20,90$ м, $64,3 \pm 41,27$ м, $75,0 \pm 43,98$ м. Статистически значимых отличий в динамике безболевой ходьбы между I и II группами не обнаружено. Отмечено статистически значимое отличие – увеличение дистанции безболевой ходьбы у паци-

ентов I и II группы по сравнению с группой «плацебо» ($p < 0,005$).

Ангиография артерий нижних конечностей выполнялась всем пациентам до лечения и через 6 месяцев после введения клеточного материала. В I и II группах пациентов, получивших клеточный материал, наблюдается увеличение развития коллатеральной сети по сравнению с больными III группы.

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).

Терапевтический неопангиогенез представляется важной стратегией лечения больных с ишемией конечности. Проведенные исследования показали, что клетки костного мозга участвуют в неопангиогенезе при заживлении ран и ишемии нижних конечностей, эндотелизации сосудистых протезов, при атеросклерозе, васкуляризации в период постнатального роста и при опухолевом росте [1].

В настоящее время эффективным методом лечения хронической ишемии нижних конечностей признается клеточная трансплантация. Данный метод лечения вступил в фазу клинических испытаний во многих клиниках по всему миру. Первые положительные и обещающие результаты открыли новые горизонты в лечении облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей, хотя точный механизм эффективности окончательно не установлен [7].

Наша работа была одним из первых рандомизированных исследований, в котором использовались группа «плацебо» и двой-

ной слепой контроль при распределении в группы.

Проведенное исследование убедительно подтвердило эффективность способа стимуляции коллатерального кровотока у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей. Сравнительно легкая выполнимость, относительная безопасность, малая травматичность, клиничко-инструментальная эффективность, убедительная доказательная база – свидетельствуют о возможности применения данного способа в клинической практике в качестве метода лечения.

Исходя из небыстрого развития эффекта, этот метод следует рекомендовать на данном этапе 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

Разработанный способ лечения безопасен и эффективен в применении. Его можно рекомендовать для мультицентровых клинических испытаний у пациентов с дистальной формой облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. Использование данного способа целесообразно при невозможности выполнения реконструктивной операции, а также у больных, которым уже была выполнена реконструктивная операция или непрямая реваскуляризация, но отмечается прогрессирование ишемии конечности.

Список литературы

1. Владимирская Е.Б. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / Е.Б. Владимирская, О.А. Майорова, С.А. Румянцев, А.Г. Румянцев. – М.: ИД Медпрактика-М, 2005. – 393 с.
2. Гавриленко А.В. Генно-инженерные технологии стимуляции ангиогенеза в лечении хронической ишемии нижних конечностей / А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов, И.И. Фомичева // *Анналы хирургии*. – 2005. – №4. – С. 5–8.
3. Покровский А.В. Клиническая ангиология: руководство для врачей. – 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. Canizo M.C. Peripheral endothelial progenitor cells (CD133⁺) for therapeutic vasculogenesis in a patient with critical limb ischemia. One year follow-up / M.C. Canizo, F. Lozano, J.R. Gonzalez-Porrás // *Cytotherapy*. – 2007. – Vol. 9, №1. – P. 99–102.
6. Dong-Ik Kim. Angiogenesis facilitated by autologous whole bone marrow stem cell transplantation for Buerger's disease / Kim Dong-Ik, Kim Mi-Jung, Joh Jin-Hyun // *Stem Cells*. – 2006. – № 24. – P. 1194–1200.
7. Ho T.K. Critical Limb Ischemia Classification and Therapeutic Angiogenesis / T.K. Ho, V. Rajkumar, D.C. Black // *International Journal of Angiology*. – 2005. – №14. – P. 49–59.

Рецензенты:

Кривошеков Евгений Петрович, д.м.н., профессор кафедры хирургии института последипломного образования Самарского государственного медицинского университета;

Лебедев Петр Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой терапии института последипломного образования Самарского государственного медицинского университета.

POSSIBILITY OF CELL THERAPY IN STIMULATION COLLATERAL CIRCULATION IN PATIENTS OBLITERATIVE ATHEROSCLEROSIS OF LOWER EXTREMITIES

Kazantsev A.V., Korymasov E.A.

Samara State Medical University, Samara, e-mail: dockazantsev@mail.ru

The results of neoangiogenesis has been studied for the treatment of 42 patients with arterial atherosclerosis occlusive disease of lower extremities who are not candidates for treatment surgical. We studied the results in the 3 groupies 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 was 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