

МЕСТО КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМИ ФОРМАМИ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Мишалов В. Г., Литвинова Н. Ю.

Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев, Украина

В последние годы возрастает роль клеточной терапии в лечении пациентов с тяжелыми формами ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза на фоне безуспешности стандартных методов хирургического и медикаментозного лечения в 25% случаев.

Целью нашей работы было сравнить эффективность применения NV1FGF и собственных стволовых клеток полученных из подкожного жира у пациентов с тяжелыми формами КИНК.

Материалы и методы. В исследование вошли 24 пациента. Все пациенты по результатам обследования, страдали неоперабельным поражением дистального артериального русла или анатомо-функциональной недостаточностью коллатеральных путей кровотока. У всех пациентов были тяжелые формы ишемии нижних конечностей – 3–4 ст. по Покровскому-Фонтейну. Пациенты были разделены на 2 группы по 12 человек в каждой.

12 пациентов первой группы получили NV1FGF по схеме – 8 внутримышечных инъекции в мышцы пораженной конечности (4 в бедро, 4 в голень) трижды с интервалом в неделю.

У пациентов второй производился забор собственной жировой ткани, после выделения и культивации аутологических мезенхимальных стволовых клеток в лабораторных условия их вводили так же трижды – в 8 точек аналогично введению NV1FGF и еще дважды в 4 точки на голени и внутривенно капельно в физиологическом растворе с интервалом в 2 недели.

Результаты и обсуждение. В обеих группах отмечалась тенденция к увеличению проходимой дистанции до появления болей. К концу исследования прирост показателя составил более 120%. Также в обеих группах отмечалась тенденция к постепенному снижению интенсивности болей покоя (в среднем на $4,56 \pm 2,07$ см), показатель ЛСК повышался после лечения во второй клинической группе на 55,12%, в первой группе также наблюдался прирост показателя, однако всего на 30,14%. Анализ динамики данного показателя выявил достоверное отличие между группами ($p=0,005$). Показатель ЛПИ повышался после лечения в 2й группе на 15,41%, в то время, как в первой группе на 7,8% ($p=0,012$).

В динамике изменения площади язвенно-некротических поражений у больных 1й группы регистрировалось уменьшение площади язв до 50% от исходного, во второй группе этот показатель был выше – до 20–30% в среднем, хотя и заживление шло медленнее, чем в первой группе.

Количество основных нежелательных явлений было выше у пациентов 1-й группы – 3 из 12 выполнены высокие ампутации нижней конечности, 2 – малые ампутации, во второй группе за период наблюдения (до 1 года) ампутаций не было.

У пациентов обеих группы по результатам применения опросника качества жизни SF36 установлено статистически значимое улучшение физического компонента здоровья и наблюдается тенденция к улучшению психологического компонентов здоровья ($P=0,2$).

Выводы. Клеточная терапия позволяет улучшить эффективность лечения пациентов с тяжелыми формами ишемии нижних конечностей. По результатам нашего исследования введение как NV1FGF, так и аутологических мезенхимальных клеток позволяет уменьшить боли покоя, площадь некротических поражений кожи, увеличить дистанцию безболевого ходьбы, физического компонента здоровья. Введение аутологических мезенхимальных клеток позволяет значительно снизить количество ампутаций у пациентов с тяжелыми формами ишемии нижних конечностей.

Ключевые слова. Атеросклероз, критическая ишемия нижних конечностей, клеточная терапия, факторы роста, мезенхимальные стволовые клетки.

При системном характере атеросклероза, разные сосудистые бассейны поражаются неодновременно и неравномерно. По распространенности и медико-социальной значимости первое место занимает атеросклероз коронарных артерий, облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей (ОАСНК) занимает третье

место. В старшей возрастной группе частота ОАСНК может достигать 23%, среди которых у 20–40% развивается КИНК, достигая 600–800 на 1 млн. жителей. Более 90% больным с КИНК в течение первого года после установления диагноза выполняются инвазивные вмешательства либо ампутации. На протяжении первого года с

момента установлення діагноза КИНК високої ампутації кінцівки потребують 25% больних і ще 25% умирають.

Лечення критическої ішемії нижніх кінцівок (КИНК), котра в структурі облітеруючих захворювань артерій нижніх кінцівок займає около 15–20%, остається актуальною проблемою. Согласно європейської статистики захворюваність КИНК складає 500–1000 випадків на 1 млн. населення, в Скандинавських країнах – 800 на 1 млн. жителів, з них 200 больним виконують високі ампутації кінцівок. За п'ять років, при відсутності адекватного лікування, вдається зберегти нижні кінцівки лише у 30% больних, 52% виконуються ампутації кінцівки, 18% больних умирають від ускладнень КИНК.

К сожалению, навіть при своєчасній діагностиці і адекватному лікуванні, остаються суттєві проблеми, котрі знижують ефективність заходів по запобігненню інвалідизації таких больних. Цьому сприяє дифузний характер атеросклерозу, периферическа повна оклюзія судин, поєднання КИНК з діабетом, хвороба Бюргера. Після установлення діагнозу КИНК тільки у 50% пацієнтів, можливо виконати реваскуляризацію, 25% підлягають медикаментозній терапії, а 25% необхідно ампутувати. Через рік після лікування покращення настає тільки у 25% пацієнтів, у 20% пацієнтів прогресує КИНК, ампутація потребує 30% пацієнтам, а 25% пацієнтів умирають.

Незважаючи на досягнуті успіхи в виробництві протезів артеріальних судин, і покращення техніки їх наложення, остається актуальною проблема тромбування шунтів (недостаточність дистального кровотоку в нижній кінцівці, труднощі з підбором антикоагулянтної терапії, незадовільне ведення таких больних в амбулаторному періоді, небезпечність самих больних) і майже нерозв'язною остається проблема неінтимальної гіперплазії, котра веде до непрохідності шунта. Повторне шунтування, тромбоз шунта, видалення неінтимальних ускладнень для пацієнта і погіршує, як правило, результат операції реваскуляризації. Серйозно обмежує можливість хірургіческо-го втручання і діаметр ділянки судини, на котрій накладається дистальний анастомоз з шунтом. При малому діаметрі технічно складно, а зазвичай і неможливо накласти анастомоз без звуження діаметра, що загрожує створенням умов для наступного тромбозу. В більшості клінік трьохлітня проходимость шунтів складає 85% для аутовени і всього 40% для синтетических протезів. Застосування чужорідних ендосудинних втручань при КИНК суттєво обмежується мультифокальним характером ураження судин.

Всі введені в медичну практику пре-

парати для медикаментозного лікування КИНК не можуть запобігти наступній ампутації у пацієнтів з цим захворюванням, а лише віддалити її, оскільки не вирішують головну проблему – відсутність адекватного кровопостачання в дистальних тканинах ураженої кінцівки. Більшість з них направлено на покращення мікроциркуляції, реологіческих властивостей крові, зниження запальних процесів в тканинах. Решта препаратів направлено на усунення симптоматических проявів КИНК. Успіх консервативної терапії наближається всього до 25–49% при наявності незаживаючих виразок і до 50–70% при болях спокою.

Прогноз при КИНК залежить від кількості залучених в патологіческий процес басейнів і ступеня їх ураження. Все вищеозначене переконливо свідчить про доцільність активного застосування існуючих і розроблених нових методів реваскуляризації при КИНК.

В даний час інтереси ангіології зосереджені на «терапевтическому ангіогенезі», котрий ще називають біологіческим шунтуванням. Його мета – забезпечення реваскуляризації ішемізованих тканин за рахунок стимуляції природних процесів формування і росту судин. Стратегія ангіогенної терапії включає в себе постачання ішемізованих тканин екзогенними факторами росту в формі рекомбінантних білків або генетических конструкцій, стволовими або прогениторними клітинами, мобілізацію ендогенних стволових і прогениторних клітин з кісткового мозку або тканинного депо, а також поєднання цих впливів.

Деякі фактори росту, які мають проангіогенну активність, застосовують в генній терапії з метою стимуляції ангіогенезу при ішемії нижніх кінцівок. Серед них – фактор росту фібробластів (non-viral fibroblast growth factor, NV1FGF), котрий викликає ріст, проліферацію і міграцію фібробластів, стимулює, таким чином, ріст нових капілярів, регулює (стимулює при ішемії) синтез і звільнення оксиду азоту (NO) ендотелієм судин, забезпечує вазодилатуючий ефект, інгібує процес апоптозу. Фактор є хемоаттрактантом і мітогеном для клітин мезенхімального (фібробласти, клітини ендотелію судин) і нейроектодермального походження. ФРФ стимулює формування нових кровеносних судин. NV1FGF грає важливу роль в процесі ангіогенезу.

Останні роки показали, що у мезенхімальних стволових клітин (МСК) є вроджена здатність до самооновлення, проліферації, і диференціювання в зрілу тканину в залежності від мікросередовища, в котрому вони перебувають. Такі особливості, котрі визначають їх як стволові клітини, роблять їх перспективними для їх застосування в регенеративній медицині. Спочатку вважалося, що ці МСК знаходяться виключно в кістковому мозку, але клітини

с подобными характеристиками были найдены и в других зрелых тканях (в периферической крови, жировой ткани). Лечение КИНК введением таких клеток основано на использовании способности стволовых клеток вырабатывать факторы, стимулирующие рост новых капилляров (ангиогенез) и сосудов (васкулогенез).

Целью нашей работы было сравнить эффективность применения NV1FGF и собственных стволовых клеток полученных из подкожного жира у пациентов с тяжелыми формами КИНК.

Материалы и методы

Работа проведена на базе Центрального военного госпиталя МО Украины и Александровской клинической больницы г. Киева. В исследование вошли 24 пациента. Все пациенты по результатам обследования, проведенного перед включением в исследование, страдали неоперабельным поражением дистального артериального русла или анатомо-функциональной недостаточностью коллатеральных путей кровотока. У всех пациентов были тяжелые формы ишемии нижних конечностей – 3–4 ст. по Покровскому-Фонтейну. Пациенты были разделены на 2 группы по 12 человек в каждой. Обе группы по клиническим и демографическим характеристикам были сопоставимы. У 6 – ампутации в анамнезе, у 2-х – единственная НК, у 3-х – две и больше ампутации в анамнезе.

Проводился учет и описание характера болей в пораженной конечности, динамики интенсивности болей в покое по визуально-аналоговой шкале, окраски кожных покровов, степени насыщения кислородом тканей периферических отделов стопы, лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), данных дуплексного сканирования, клинических и биохимических анализов крови. 50% пациентов проводилась ангиография или компьютерная ангиография с контрастированием дистального сосудистого русла (артерии голени и стопы).

Назначение исследуемого препарата производилось на фоне стандартной терапии в соответствии с протоколом ведения больных, используемым в клинике, участвующей в исследовании.

12 пациентов первой группы получили NV1FGF по схеме – 8 внутримышечных инъекции в мышцы пораженной конечности (4 в бедро, 4 в голень) трижды с интервалом в неделю.

У пациентов второй производился забор собственной жировой ткани (липоаспирацией или забором кожно-жирового лоскута), после выделения и культивации аутологических мезенхимальных стволовых клеток в лабораторных условиях их вводили так же трижды – в 8 точек аналогично введению NV1FGF и еще дважды в 4 точки на голени и внутривенно капельно в физиологическом растворе с интервалом в 2 недели.

У пациентов для оценки результатов измерялась дистанция безболевого ходьбы и плече-

лодыжечный индекс, а так же у пациентов с язвенно-некротическими изменениями – динамика изменения площади и характера поражения тканей. Качество жизни (КЖ) и его динамика были оценены у пациентов двух групп при помощи опросника SF-36 («SF-36 Health Status Survey»), который относится к неспецифическим опросникам для оценки качества жизни. 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 баллов обозначает полное здоровье, все шкалы формируют два показателя: психологическое и физическое благополучие.

Результаты и обсуждение

При оценке динамики ДБХ по данным тредмил-теста было установлено, что в обеих группах отмечалась непрерывная тенденция к увеличению проходимой дистанции до появления болей. К концу исследования прирост показателя составил более 120%. Также в обеих группах отмечалась тенденция к постепенному снижению интенсивности болей покоя (в среднем на $4,56 \pm 2,07$ см).

Гемодинамическая характеристика состояния больных осуществлялась на основании оценки вторичных параметров эффективности терапии – ЛСК, ЛПИ, ТКНК. Оценка ультразвуковых параметров, отражающих макродинамику выявила следующее: показатель ЛСК повышался после лечения во 2-й клинической группе на 55,12%, в 1-й группе также наблюдался прирост показателя, однако всего на 30,14%. Анализ динамики данного показателя выявил достоверное отличие между группами ($p=0,005$). Показатель ЛПИ повышался после лечения в 2-й группе на 15,41%, в то время как в 1-й группе на 7,8% ($p=0,012$).

В динамике изменения площади язвенно-некротических поражений у больных 1-й группы регистрировалось уменьшение площади язв до 50% от исходного, во 2-й группе этот показатель был выше – до 20-30% в среднем, хотя и заживление шло медленнее, чем в первой группе.

Количество основных нежелательных явлений было выше у пациентов 1-й группы – 3 из 12 выполнены высокие ампутации нижней конечности, 2 – малые ампутации, во второй группе за период наблюдения (до 1 года) ампутаций не было.

У пациентов обеих группы по результатам применения опросника качества жизни SF36 установлено статистически значимое улучшение физического компонента здоровья и наблюдается тенденция к улучшению психологического компонента здоровья ($P=0,2$).

Выводы

1. Клеточная терапия позволяет улучшить эффективность лечения пациентов с тяжелыми формами ишемии нижних конечностей.

2. По результатам нашего исследования введение как NV1FGF, так и аутологичных мезенхимальных клеток позволяет уменьшить боли

покою, площадь некротических поражений кожи, увеличить дистанцию безболевого ходьбы, физического компонента здоровья.

3. Введение аутологичных мезенхимальных клеток позволяет значительно снизить количество ампутаций у пациентов с тяжелыми формами ишемии нижних конечностей.

Литература

1. Belch J., Hiatt W. R., Baumgartner I., Driver V., Nikol S., L. Norgren, Van Belle E. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia // *Lancet*. – 2011. – v. 377 – p. 1929–37
2. Dicker, A.; Le Blanc, K.; Astrom, G.; van Harmelen, V.; Gotherstrom, C.; Blomqvist, L.; Arner, P.; Ryden, M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue.// *Exp. Cell Res.* – 2005. – v. 308 –p. 283–290.
3. Nakagami, H.; Maeda, K.; Morishita, R.; Iguchi, S.; Nishikawa, T.; Takami, Y.; Kikuchi, Y.; Saito, Y.; Tamai, K.; Ogiwara, T.; Kaneda, Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells.// *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. –v. 25. – p. 2542–2547
4. Schaffler, A.; Buchler, C. Concise review: Adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies//*Stem Cells* . – 2007. – v. 25. – p. 818–827
5. TASC II. Norgren I., Hiatt W. R., Dormandy J. A., Nehler M. R., Harrisand K. A., Fowkes F. G.R. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)// *Eur J Vasc. Endovasc. Surg.* – 2007–v. 33– S70

МІСЦЕ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ В КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ ПАЦІЄНТІВ З ВАЖКИМИ ФОРМАМИ ІШЕМІЇ НИЖНІХ КІНЦІВОК

Мишалов В. Г., Літвінова Н. Ю.

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна

В останні роки зростає роль клітинної терапії в лікуванні пацієнтів з важкими формами ішемії нижніх кінцівок атеросклеротичного генеза на тлі безуспішності стандартних методів хірургічного й медикаментозного лікування в 25% випадків.

Метою нашої роботи було порівняти ефективність застосування NV1FGF і власних стовбурових клітин отриманих з підшкірного жиру у пацієнтів з важкими формами КІНК.

Матеріали і методи. У дослідження ввійшли 24 пацієнта. Усі пацієнти за результатами обстеження, страждали неоперабельним ураженням дистального артеріального русла або анатомо-функціональною недостатністю колатеральних шляхів кровотока. У всіх пацієнтів були важкі форми ішемії нижніх кінцівок – 3–4 ст. по Покровському-Фонтейну. Пацієнти були розділені на 2 групи по 12 у кожній.

12 пацієнтів першої групи одержали NV1FGF за схемою – 8 внутрішнім'язових ін'єкції в м'язи ураженої кінцівки (4 у стегно, 4 у гомілку) тричі з інтервалом у тиждень.

У пацієнтів другої проводився забір власної жирової тканини, після виділення й культивуванні аутологических мезенхимальних стовбурових клітин у лабораторних умовах їх вводили так само тричі – в 8 точок аналогічно введенню NV1FGF і ще двічі в 4 точки на гомілці й внутрішньовенно крапельно у фізіологічному розчині з інтервалом в 2 тижні.

Результати й обговорення. В обох групах відзначалася тенденція до збільшення дистанції до появи болю. До кінця дослідження приріст показника склав більш 120%. Також в обох групах відзначалася тенденція до поступового зниження інтенсивності болю спокою (у середньому на $4,56 \pm 2,07$ см), показник ЛШК підвищувався після лікування в другій клінічній групі на 55,12%, у 1-й групі також спостерігався приріст цього показника, однак усього на 30,14%. Аналіз динаміки даного показника виявив достовірну відмінність між групами ($p=0,005$). Показник ГПІ підвищувався після лікування в 2-й групі на 15,41%, у той час, як у 1-й групі на 7,8% ($p=0,012$).

У динаміці зміни площі виразково-некротичних уражень у хворих 1ї групи реєструвалось зменшення площі виразок до 50% від вихідного, у другій групі цей показник був вище – до 20–30% у середньому, хоча й заживлення йшло повільніше, ніж у першій групі.

Кількість основних небажаних явищ була вище в пацієнтів 1-й групи – у 3-х з 12 виконані високі ампутації нижньої кінцівки, у 2 – малі ампутації, у другій групі за період спостереження (до 1 року) ампутацій не було.

У пацієнтів двох групи за результатами застосування анкети якості життя SF36 установлене статистично значуще поліпшення фізичного компонента здоров'я й спостерігається тенденція до поліп-

шення психологічного компонентів здоров'я ($P=0,2$).

Висновки. Клітинна терапія дозволяє поліпшити ефективність лікування пацієнтів з важкими формами ішемії нижніх кінцівок. За результатами нашого дослідження введення як NV1FGF, так і аутологічних мезенхімальних клітин дозволяє зменшити болі спокою, площу некротичних уражень шкіри, збільшити дистанцію ходи, фізичного компонента здоров'я. Введення аутологічних мезенхімальних клітин дозволяє значно знизити кількість ампутацій у пацієнтів з важкими формами ішемії нижніх кінцівок.

Ключові слова. Атеросклероз, критична ішемія нижніх кінцівок, клітинна терапія, фактори росту, мезенхімальні стовбурові клітини

CELL THERAPY IN TREATMENT OF PATIENTS WITH ADVANCED ISCHEMIA OF LOWER EXTREMITIES

Mishalov V. G., Litvinova N. Ju.

Bogomolets National medical university, Kiev, Ukraine

Recently the role of cellular therapy in treatment of patients with advanced forms of an atherosclerotic ischemia of the lower extremities due to unsuccessful standard methods of surgical and medicament treatment in 25% cases.

The aim of work was to compare efficacy of application NV1FGF and autologous adipose derived stem cells in patients with serious CILE.

Material and methods. 24 patients have entered into study. All patients by results of inspection suffered a nonresectable lesion of a distal arterial vessels or anatomic-functional insufficiency of collateral paths of a blood flow. All patients had serious forms of an ischemia of the lower extremities – 3–4 stage by Pokrovsky-Fontein. Patients have been parted on 2 groups – 12 persons in everyone.

12 patients of the first group have received NV1FGF under the schema – 8 intramuscular injections in muscles of the extremity (4 in a hip, 4 in a calf) three times with an interval in a week.

In patients of the second group after lipoaspiration, allocation and cultivation of autologous mesenchymal stem cells in laboratory conditions introduced them as three times – into 8 points to similarly introduction of NV1FGF and still twice in 4 points on an calf and intravenously driply in a normal saline solution with an interval in 2 weeks.

Results and discussion. In both groups the tendency to augmentation of a painless walking distance became perceptible. To the extremity of research the index gain has compounded more than 120%. Also in both groups the tendency to gradual depression of intensity of rest pains became perceptible (on the average on $4,56 \pm 2,07$ sm), LBS index raised after treatment in the second clinical group on 55,12%, in the first group also was observed an index gain, however all on 30,14%. Analysis of dynamics of the yielded index has taped authentic difference between groups ($p=0,005$). ABI index raised after treatment in 2-d group on 15,41%, while in the first – on 7,8% ($p=0,012$).

In dynamics of change of the area ulcer-necrotic lesions in 1st group patients was reduction of the area of ulcers to 50% from initial, in the second this index was above – to 20–30% on the average though but recover went more slowly, than in the first.

The quantity of the basic adverse events was above in 1st group – in 3 patients the high amputation of the extremity was done, in 2 – small amputations were executed, in the second group during follow-up period (till 1 year) amputation were not.

In patients of both groups by results of application of a questionnaire of quality of life SF36 statistically significant enriching of a physical component of health is positioned and the tendency to enriching psychological health components ($P=0,2$) was observed.

Conclusions. Cell therapy allows enriching efficacy of treatment of patients with serious forms of an ischemia of the lower extremities. By results of our research introduction both NV1FGF, and autologous mesenchymal cells allows to reduce rest pains, the area of necrotic lesions of a skin, to enlarge a painless walking distance, a physical component of health. Introduction of stem mesenchymal cells allows reducing considerably quantity of amputation in patients with advanced forms of an ischemia of the lower extremities.

Keywords. An atherosclerosis, a critical ischemia of the lower extremities, cell therapy, growth factors, mesenchymal stem cells