

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ОККЛЮЗИОННО- СТЕНОТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Попандопуло А. Г., Ярощак С. В., Буше В. В., Варшавер П. Л.

ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака, г. Донецк

Использование традиционной консервативной терапии в лечении дистальных поражений артерий малоэффективно при развитии ишемии 3–4 ст. Применение предложенного метода лечения с использованием МСК позволяет у 44% больных снизить уровень ишемии, а у 22% избежать высоких ампутаций конечности.

Ключевые слова: ишемия, клеточная терапия, трансплантация.

В общей структуре окклюзионно-стенотических заболеваний артерий поражение артериального русла конечностей занимают третье место, уступая лишь ишемической болезни сердца и поражениям церебральных сосудов [2]. Плановым исходом стенотического процесса в артериях является ишемия 3–4 ст с необходимостью, в дальнейшем, выполнения ампутации, 90% которых выполняется именно по причине сосудистой патологии [2, 3]. В Украине хронические облитерирующие заболевания (ХОЗ) артерий конечностей занимают более 20% от всех поражений сосудистой системы [1].

Современные подходы лечения ХОЗ включают не только проведение спазмолитической и улучшающей реологию крови терапии, но и учитывают патогенетические механизмы развития ишемии конечностей. Одним из прогрессивных направлений в комплексе проводимых лечебных мероприятий является стимуляция ангиогенеза.

Все это позволило разработать и внедрить для клинического использования новые методы лечения больных ХОЗ с поражением дистального артериального русла нижних конечностей направленные на стимуляцию ангиогенеза.

Цель и задачи исследования. Улучшить результаты лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей путем использования мезенхимальных стволовых клеток.

Материалы и методы исследования

Открытие и успешная работа в составе ГУ «ИНВХ им. В. К. Гусака» лаборатории тканевого и клеточного культивирования позволило по-новому взглянуть на проблему хронической ишемии нижних конечностей.

В работе изучалось влияние мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на процессы ангиогенеза и на степень ишемии тканей нижних конеч-

ностей у больных ХОЗ. В исследование включали больных ХОЗ артерий нижних конечностей с ишемией 3–4 степени, не подлежащие реконструктивному оперативному лечению, при отсутствии некроза или при наличии краевого некроза фаланг пальцев. Всем больным выполняли ангиографию, доплерографию, транскутанную оксиметрию до и после проведения лечения.

Больные были распределены на две идентичные по степени ишемии группы, рандомизированные по полу и возрасту и состояли из одинакового количества больных в возрасте от 60 до 80 лет. У всех пациентов причиной ишемии послужили атеросклеротические изменения артерий нижней конечности. В первой группе было 18 больных, среди них мужчин было 13, женщин – 5. Вторая группа состояла из 18 человек, среди которых мужчин – 12, женщин – 6. На момент исследования все больные или не курили, или бросили курить от 1 до 5 лет назад.

Учитывая, что при дистальных формах окклюзии артерий нижних конечностей хирургические методы реваскуляризации резко ограничены, все больные обеих групп получали спазмолитическую и улучшающую реологию крови терапию. У больных 2-й группы дополнительно использовали внутриартериальное (у 9 больных) и внутримышечное введение МСК в количестве 50 млн. У 4 больных в каждой подгруппе введение МСК повторяли через 1 неделю после первой инъекции в такой же дозировке.

Эксплантацию костного мозга производили в асептических условиях из гребня подвздошной кости (*crista iliaca*) в количестве 50 мл с добавлением 0,5 мл 1% гепарина в физиологическом растворе («Дарница», Украина). Шприцы, в которые осуществляли аспирацию костного мозга, предварительно промывали рабочим раствором гепарина. Аспират костного мозга смешивали с раствором Хенкса («Биолот», Россия) в пропорции 1:1 и центрифугировали 30 мин 2000 об/мин. Получен-

ную суспензию клеток помещали в культуральные флаконы («Corning-Costar», США) по 15 мл.

Культивирование МСК проводили в среде DMEM/F12 1:1, («Sigma», США) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Росия), $0,75 \cdot 10^{-3}$ кг/л глутамина («Биолот», Росия), $4 \cdot 10^{-9}$ кг/л основного фактора роста фибробластов («Sigma», США), $5 \cdot 10^{-5}$ кг/л L-аскорбиновой кислоты (витамина С) («Sigma», USA) и для первичной культуры – по 100 ед./мл пеницилина и 100 мкг/мл стрептомицина («Дарница», Украина) в CO_2 -инкубаторе («Jouan», Франция) при 37°C и 5% CO_2 . Смену среды проводили через каждые трое суток культивирования. После достижения монослоя пассирование осуществляли с использованием смеси растворов трипсин/ЕДТА («Биолот», Росия) в соотношении 1:3. Коэффициент пассирования составлял 1:3 или 1:5. После этого клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе пристандартных условиях.

Выделенные клетки при маркировании антителами («BD Biosciences Pharmingen», США) имели фенотип: $\text{CD}105^+$, $\text{CD}73^+$, $\text{CD}90^+$, $\text{CD}45^-$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}79a^-$, HLA-DR^- и были способны дифференцировать в остео-, адипо- и хондрогенном направлении при направленной индукции *in vitro*.

Результаты и их обсуждение

Проведенные функциональные пробы в совокупности с ангиографией и транскutánной оксиметрией позволили сделать вывод об активации регенеративно-восстановительных и неоангиогенных процессов у больных ХОЗ артерий, в комплексе лечения которых включали инъекции МСК. Клинически больные отмечали уменьшение или исчезновение болевого синдрома, потепление кожных покровов, увеличение расстояния проходимого больным до возникновения болей в икроножных мышцах, что косвенно может свидетельствовать про улучшение кровотока в ишемизированных нижних конечностях. Следует отметить, что способ введения МСК не имел принципиального значения для оценки степени регресса ишемии, напротив повторные введения МСК через 1 неделю незначительно улучшали результаты лечения.

При анализе состояния больных обеих групп в течение первой недели наблюдения под воздействием инфузионной ангиотропной терапии наступало незначительное улучшение состояния, проявляющееся в уменьшении болевого синдрома, уменьшением зябкости, потеплением нижних конечностей, повышением показателей транскutánной оксиметрии. Положительный эффект терапии оценивали при повышении показателей базального уровня $t_{\text{cp}}\text{O}_2$ на 5 и более мм рт. ст. по сравнению с исходным уровнем.

У больных 2-й группы, в лечении которых использовали введение МСК, на первой неделе исследования отмечали аналогичные с 1-й группой

показатели функциональных проб и транскutánной оксиметрии. Начиная с конца 2-й недели исследования нами отмечалось постепенное повышение показателей базального уровня $t_{\text{cp}}\text{O}_2$ до 10–12 мм рт. ст. и выше. Эти изменения наблюдались у 44% больных и сопровождались практически полным исчезновением болевого синдрома, потеплением конечности, ускорением заживления ран после некрэктомии (при их наличии).

При отсутствии изменений $t_{\text{cp}}\text{O}_2$ на фоне проводимого лечения и сохранения явлений критической ишемии конечности (с выраженным болевым синдромом и без него) в течение 2-х недель решали вопрос об ампутации конечности. При этом, показатели базального уровня $t_{\text{cp}}\text{O}_2$ менее 30 мм рт. ст. указывают на глубокую ишемию тканей. Выполнение повторной ангиографии, по нашим данным, в сроки 1–2–4-х недель от начала проведения терапии не является целесообразным, так как не позволяет объективно оценить результаты проводимой терапии.

Анализ проведенного лечения показал, что проведение общепринятой терапии окклюзионно-стенотических поражений артерий нижних конечностей с ишемией 3–4 степени позволяет добиться положительного результата в 20–25% случаев. Положительный эффект терапии, как правило, кратковременный и не позволяет добиться координальных изменений гемодинамики в ишемизированной конечности. Использование предложенного метода введения МСК в комплексе консервативной терапии позволило снизить степень ишемии нижней конечности у 44% больных и избежать ампутации конечности у 22% больных, причем в сроки наблюдения до 1 года.

Короткие сроки наблюдения, на данный момент, не позволяют сделать выводы о радикальности данного метода лечения, длительности лечебного эффекта и кардинального снижения уровня ишемии, однако позволяет предположить перспективность дальнейшей разработки этого направления. Для более выраженного эффекта от данного вида терапии, на наш взгляд, показана более широкая популяризация использования МСК на более ранних стадиях ХОЗ при ишемии 1–2 степени и в комбинации реконструктивно-восстановительными операциями.

Выводы

1. Традиционные консервативные методы лечения больных ХОЗ артерий конечностей, при невозможности выполнения реконструктивной операции, малоэффективны и не отвечают современным стандартам.

2. Использование в комплексном лечении ХОЗ артерий нижних конечностей мезенхимальных стволовых клеток позволяет снизить уровень ишемии конечности, улучшить непосредственные результаты консервативного лечения и уменьшить количество ампутаций.

Литература

1. Кобза І. І. Можливості консервативного лікування хворих з хронічною критичною ішемією нижніх кінцівок / І. І. Кобза, Р. А. Жук, В. А. Надал // Шпитал. хірургія. – 2001. – № 1. – С. 91–93.
2. Мішалов В. Г. Місце інтраопераційної оцінки дистального русла в хірургії облітеруючого атеросклерозу судин нижніх кінцівок 3 та 4 стадії / В. Г. Мішалов, В. А. Черняк, Ю. І. Кошевський // Хірургія України. – 2008. – №4. – С. 208–210.
3. Никульников П. И. Перспективы использования подколенно-берцово-стопного шунтирования при поражении дистальных отделов артерий нижних конечностей / П. И. Никульников, А. А. Гуч, А. А. Бицай // Клін. хірургія. – 2007. – № 9. – С. 33–35.

ВИКОРИСТАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ЛІКУВАННІ ОКЛЮЗІЙНО-СТЕНОТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ АРТЕРІЙ НИЖНІХ КІНЦІВОК

Попандопуло А. Г., Ярощак С. В., Буше В. В., Варшавер П. Л.

ДУ «Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В. К. Гусака НАИМУ», м. Донецьк

Використання традиційної консервативної терапії у лікуванні дистальних уражень артерій малоефективно у разі ішемії 3–4 ступеня. Запропонований спосіб лікування з використання МСК дозволяє у 44% хворих знизити рівень ішемії, а у 22% уникнути високих ампутацій кінцівок.

Ключові слова: ішемія, клітинна терапія, трансплантація.

MESENCHYMAL STEM CELLS APPLICATION IN OCCLUSIVE-STENOTIC DISEASES OF LOWER EXTREMITY ARTERIES TREATMENT

Popandopulo A. G., Yaroschak S. V., Bushe V. V., Varshaver P. L.

P. I «V. K. Gusak Institute of Urgent and Recovery Surgery, National Academy of Medical Science», Donetsk

A tradition conservative therapy for a distal arterial involvement is inefficient in case of 3–4th degree of ischemia. The proposed method of the distant arterial involvement treatment with mesenchymal stem cells allows to decrease the ischemia degree in 44% of patients and in 22% of case allows to avoid a high amputation

Keywords: ischemia, cell therapy, transplantation.