

Р.В. Салютин, Е.В. Буслович, В.М. Сирман, Р.Н. Борис, Л.С. Комарова, С.С. Паляница
Координационный центр трансплантации органов, тканей и клеток МЗ Украины, Киев

Использование клеточных технологий при лечении хронической ишемии нижних конечностей

Хроническая ишемия нижних конечностей — широко распространенное заболевание с высокой степенью инвалидизации и значительной долей в структуре хирургической летальности. Невозможность проведения реконструктивных операций на сосудистом русле у более чем половины пациентов с данной патологией и неуклонное прогрессирование течения болезни, несмотря на проводимую консервативную терапию, требует поиска новых методов лечения. В статье представлены данные об исследованиях, целью которых является стимуляция ангиогенеза путем применения клеточных технологий в комплексном лечении при ишемии нижних конечностей. Многообещающие результаты клинических испытаний применения прогениторных клеток, полученных из периферической крови, костного мозга, жировой ткани и материалов фетального происхождения, позволяют надеяться, что стимуляция процессов ангиогенеза станет еще одним перспективным направлением в комплексном лечении при хронической ишемии нижних конечностей.

Ключевые слова: ишемия, ангиогенез, прогениторные клетки, периферическая кровь, костный мозг, жировая ткань, фетальный материал.

Ишемия нижних конечностей (ИНК) — заболевание, обусловленное поражением сосудов нижних конечностей, брюшной аорты и подвздошных артерий (Смолянинов А.Б. и соавт., 2007; Ларионов П.М. и соавт., 2010). Выделяют ряд ведущих патогенетических механизмов ишемии: окклюзионный, кардиогенный, дистонический, извращенного кровотока. Окклюзионная ИНК является наиболее частым видом нарушения кровообращения нижних конечностей, а ишемия извращенного кровотока, напротив, отмечается редко и только в некоторых анатомических областях (ветви дуги аорты, чревно-брыжеечный анастомоз и др.). Существуют также смешанные, или сочетанные формы ишемии, объединяющие различные ее виды (Мишалов В.Г. и соавт., 2005).

Клинически данное заболевание может протекать как в острой, так и в хронической формах. В большинстве случаев причинами острой ИНК являются ишемическая болезнь сердца (60%), ревматоидные пороки сердца (30%) и аневризма грудной аорты (5%). К возникновению острой ишемии нижних конечностей также приводят травмы, инфекции, заболевания крови и медикаментозные интоксикации. Хроническое течение данного заболевания отмечается при облитерирующем атеросклерозе, эндартериите и тромбангите (болезни Бюргера) (Мишалов В.Г. и соавт., 2005; Смолянинов А.Б. и соавт., 2007). У 70% больных, страдающих ИНК, наблюдаются тяжелые поражения сердца, у 25% в анамнезе инсульт, у 36% — артериальная гипертензия, у 16% — пневмосклероз, у 33% — нефросклероз (Мишалов В.Г. и соавт., 2005). Сахарный диабет, гиперхолестеринемия, курение повышают риск развития обструктивного поражения периферических сосудов, ведущего к воз-

никновению хронической ИНК (Смолянинов А.Б. и соавт., 2007).

Распространенность хронической ИНК составляет в среднем 2–3%, при этом у лиц в возрасте >50 лет это заболевание диагностируют в 9–10% случаев, а у лиц старше 60 лет — 35–50% (Пашков В.Д., 2007; Баженов М.С., 2008). Количество людей с хронической ИНК продолжает увеличиваться, в ближайшие годы ожидается возрастание числа пациентов данной категории на 5–7% (Пашков В.Д., 2007).

Прогрессирование болезни приводит к развитию гангрены, ведущей к ампутации конечности. Частота ампутаций при сосудистой патологии как в Украине, так и за ее пределами достигает 59%, а показатель летальности доходит до 48%. Несмотря на проводимое консервативное лечение, болезнь в подавляющем большинстве случаев неуклонно прогрессирует. Выполнение реконструктивных операций дает шанс на спасение конечностей, но наличие тяжелых сопутствующих патологий, неоперабельное поражение дистального сосудистого русла, системность и распространенность заболевания делают невозможным их выполнение у 50–75% пациентов (Руднев Н.Е., 2003; Демидова О.А., 2006; Баженов М.С., 2008). Методы непрямой реваскуляризации, по эффективности не уступающие классическим технологиям восстановления кровотока, являются альтернативой ампутации конечности в неоперабельной клинической ситуации. Механизм их действия основан на стойкой рефлекторной дилатации микрососудистого русла и стимуляции регионального кровообращения (Демидова О.А., 2006; Поляченко Ю.В. та співавтор., 2011а).

В последние 30 лет целью многих исследований стало изучение способов нормализации кровообращения нижних конеч-

ностей путем стимуляции ангиогенеза (процесса развития капиллярной сети от уже существующих сосудов). Изучается возможность использования клеточных технологий для поиска новых методов экзогенной стимуляции ангиогенеза при помощи прогениторных стволовых клеток периферической крови, костного мозга, эмбриональной и жировой ткани (Поляченко Ю.В. та співавтор., 2011б).

В 1997 г. впервые из фракции взрослых мононуклеарных клеток периферической крови была изолирована популяция предшественников эндотелиальных клеток, которые представляют собой пул клеток, участвующих в репарации эндотелия путем замещения поврежденных клеток, а также в неоваскуляризации ишемизированных тканей (Руда М.М. и соавт., 2007). Еще в 2002 г. в доклинических исследованиях установлено, что систематическая трансплантация эндотелиальных клеток-предшественников улучшает выживание конечности за счет увеличения кровяного потока в ишемизированной ткани (Kawamoto A. et al., 2002).

В 2005 г. описаны клинические исследования по трансплантации мононуклеарной фракции периферической крови группе пациентов с терминальной стадией ИНК на фоне диализной формы хронической почечной недостаточности, облитерирующего атеросклероза и сахарного диабета. Установлено положительное влияние подкожной имплантации аутологических стволовых клеток периферической крови, нормализация температуры конечности и уменьшение выраженности симптомов заболевания, что позволило сохранить 22 конечности (Kawamura A. et al., 2005).

Однако в связи с малым уровнем предшественников эндотелиальных клеток

в периферической крови в настоящее время наибольшее распространение среди технологий клеточной стимуляции неонатогенеза получило применение аутологичных мононуклеаров костного мозга, которые участвуют в неонатогенезе при эндотелизации сосудистых протезов, васкуляризации в период постнатального роста, опухолевом росте, при атеросклерозе, а также играют важную роль в заживлении ран и при ИНК (Смолянинов А.Б. и соавт., 2007). Проведенные российскими учеными доклинические исследования показали, что инъекция мононуклеарных клеток костного мозга в поврежденный ишемией участок повышает плотность капилляров по сравнению с контролем в полтора раза (Ларионов П.М. и соавт., 2010).

В 2007 г. в ГУ «Национальный институт хирургии и трансплантологии имени А.А. Шалимова НАМН Украины» проходило исследование возможности применения аутоотрансплантации костного мозга и ротационной трепанации в комплексном лечении пациентов с хронической критической ИНК. Анализ результатов за период наблюдения 6 и 12 мес показал устранение критической ишемии, заживление ран стопы, что позволило избежать ампутации ишемизированной конечности у 88,2% пациентов (Дрюк Н.Ф., Киримов В.И., 2007). Подобные клинические исследования были проведены в 2010 г. на базе ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии имени В.К. Гусака» НАМН Украины. В результате стимуляции ангиогенеза аутоотрансплантацией стволовых клеток костного мозга в мышечную ткань голени ишемизированной конечности пациентам, страдающим артериальной недостаточностью IIIa–IV стадии (согласно классификации Покровского — Фонтейна), зарегистрировано увеличение дистанции безболезной ходьбы у всех пациентов, начиная с 8 нед наблюдения, а также статистически достоверное улучшение показателей регионарной гемодинамики у 88,9% пациентов за время исследования (24 нед) (Гринь В.К. и соавт., 2010).

Двойное слепое пилотное исследование показало, что применение трансплантации аутологических стволовых клеток костного мозга достоверно приводит к уменьшению выраженности боли в покое и удлинению периода до ампутации у опытной группы по сравнению с контролем, получавшим плацебо в виде периферической крови (Vepoit E. et al., 2011). В другом исследовании продемонстрировано ускорение заживления ран и уменьшение выраженности боли в состоянии покоя у пациентов с обширной гангреной и предстоящей ампутацией, но выживаемость и процент пациентов, сохранивших конечности после инъекции мононуклеаров костного мозга, в результате оставались неизменными (Walter D.H. et al., 2011). Исследование с участием 20 пациентов с терминальной стадией хронической ишемии нижних конечностей после внутримышечного введения мононуклеарных клеток костного мозга выявило удлинение дистанций ходьбы в более чем 2 раза, повышение лодыжечно-плечевого индекса у 40%

пациентов, улучшение состояния кожи и уменьшение выраженности боли в состоянии покоя — у 50% пациентов (Gabr H. et al., 2011).

Также изучена возможность местного применения концентрата аутологических клеток костного мозга у больных сахарным диабетом, на фоне которого развился облитерирующий эндартериит, приведший к критической ишемии конечностей. В течение 120 дней частота ампутаций в контрольной группе, получающей стандартную медикаментозную терапию, составляла 44%. В основной группе на протяжении данного срока 79% пациентов сохранили конечности, при этом у них повысилось артериальное давление в сосудах пораженной конечности и лодыжечно-плечевого индекса. Корреляции между возрастом пациентов и частотой выздоровления не выявлено, однако зафиксирован заслуживающий внимания факт: у 21% пациентов опытной группы, у которых терапевтические меры оказались безуспешными и в результате была проведена ампутация, выявлена относительная лимфопения в концентрате клеток костного мозга. Авторы исследования отнесли лимфопению и тромбоцитопению к потенциальным причинным факторам болезни (Procházka V. et al., 2010).

Необходимая при получении аутологических мононуклеаров костного мозга и периферической крови стимуляция костного мозга является серьезной нагрузкой для ослабленного болезнью организма и неприемлема для многих пациентов старшей возрастной группы. Исследования последних лет показывают, что стимуляция мобилизации клеток-предшественников, находящихся в нише стволовых клеток, может привести к серьезным осложнениям у части пациентов в возрасте старше 70 лет (Jonsson T.B. et al., 2012). Некоторые патологии ведут к уменьшению количества и жизнеспособности эндотелиальных клеток-предшественников в костном мозге. Например, при сахарном диабете 2-го типа не только напрямую нарушаются функциональные способности предшественников эндотелиальных клеток, но и повреждается костномозговая ниша, которая в норме обеспечивает созревание клеток и их мобилизацию. Известно, что длительная инкубация в среде с высокой концентрацией глюкозы приводит в зависимости от дозы уменьшению количества и пролиферативной активности этих клеток, ускорению их старения и нарушению миграции (Руда М.М. и соавт., 2007). В связи с этим существует необходимость поиска новых альтернативных источников клеток — предшественников эндотелиоцитов, одним из которых является использование мультипотентных стромальных клеток, полученных из жировой ткани.

Выделение жировой ткани человека низкотравматично и относительно безопасно, не требует интенсивной медикаментозной подготовки пациента. Мезенхимальные стволовые клетки, выделяемые из животной жировой ткани, обладают высокой пластичностью и способностью к пролиферации, а также легко поддаются трансфекции. Как показывают результаты доклинических и клинических исследова-

ний, у пациентов с хронической ишемией конечностей трансплантация мультипотентных стромальных клеток, получаемых из аутологичной жировой ткани, способна стимулировать процессы ангиогенеза, что приводит к снижению ишемического воздействия за счет активизации регенераторных сил мышцы (Поляченко Ю.В. та співавт., 2010а; б; 2011в).

Более поздние публикации результатов пилотных клинических исследований Н.С. Lee и соавторов (2012) подтверждают эффективность и безопасность применения эндотелиальных клеток-предшественников, выделенных из жировой ткани. С помощью цифровой ангиографии выявлено формирование многочисленных коллатеральных сосудистых сетей, в результате чего по прошествии 6 мес у 66,7% пациентов отмечено уменьшение выраженности боли в состоянии покоя и значительное увеличение расстояния безболезненной ходьбы.

Также рассматривается вопрос о применении прогениторных клеток фетальных тканей, которые обладают гораздо более высокой способностью к пролиферации, чем взрослые мультипотентные клетки. Результаты экспериментов, проведенных *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют о высоком потенциале к дифференциации в ангиобласты и эндотелиоциты прогениторных клеток фетальной печени человека 6–8 нед гестации. Доклинические исследования подтвердили проангиогенный и пролиферативный эффект трансплантации мезенхимальных стромальных клеток, реализуемый посредством стимуляции ангиогенных и митогенных сигнальных путей (Laurila J.P. et al., 2009; Поляченко Ю.В. та співавт., 2010в; г; 2011б).

Клинические исследования трансплантации прогениторных стволовых клеток фетальной печени показали в результате уменьшение выраженности боли в состоянии покоя у 67% пациентов, увеличение дистанции безболезной ходьбы. Также у 48% пациентов с ИНК IV стадии эпителизировались поврежденные в результате трофических расстройств участки. У 82,5% пациентов через 1–3 мес констатировали снижение степени ишемии по Покровскому — Фонтейну; у остальных 9,2% — степень ишемии оставалась неизменной или наблюдалось ухудшение клинического состояния. Так, у 3 пациентов с ИНК IV степени с гнойно-воспалительным процессом на стопе введение клеточного трансплантата привело к стимуляции гнойно-воспалительного процесса, прогрессированию некротического процесса и активации латентной микотической инфекции, что стало показанием к ампутации конечности. (Поляченко Ю.В. та співавт., 2011в).

Поиск новых, альтернативных источников эндотелиальных клеток-предшественников актуален по сей день. Постоянно совершенствуются уже существующие методы улучшения ревазуляризации. Комплексное лечение с использованием фракции мононуклеарных прогениторных клеток, полученной из периферической крови, костного мозга, жировой ткани и фетального материала проводится для стимуляции ангиогене-

за у пацієнтів з неоперабельними поразками дистального судинистого русла нижніх кінцівок і/або анатомо-функціональної недостаточності коллатеральних шляхів кровотоку при повній проходимості проксимального сегмента артерій і наявності ішемії ІІб–ІV стадії, болі, більшого віку пацієнтів і з вираженою супутньою патологією. При трансплантації ендотеліальних кліток предшественників проіснує збільшення судинистої мережі, заживлення трофічних язв і інших пошкоджених ішемизованих ділянок, збільшення дистанції і швидкості ходьби, зменшення вираженості болю в покое, що дозволяє зберегти кінцівку більшості пацієнтів. Лікування хронічної ІНК з допомогою описаних шляхів стимуляції ангиогенеза мультипотентними прогеніторними клітками являється ефективним методом непрямой ревазуляризації.

Список використаної літератури

Бажен М.С. (2008) Особливості консервативної терапії і її роль в комплексному ліченні хронічної ішемії нижніх кінцівок у геронтологічних хворих. Дис. ... канд. мед. наук, Москва, 113 с.

Гринь В.К., Шугутин А.А., Попандоупо А.Г. і др. (2010) Аутоотрансплантація стромальних стовбурових кліток в ліченні облітеруючих захворювань артерій нижніх кінцівок. Вестн. неотлож. і востанов. медицини, 4 (11): 512–513.

Демидова О.А. (2006) Комбіноване лічення хронічної ішемії нижніх кінцівок з використанням стимуляторів ангиогенеза. Дис. ... канд. мед. наук, Москва, 119 с.

Дрюк Н.Ф., Киримов В.И. (2007) Ревазуляризаційні операції при облітеруючому ураженні артерій гомілки і ступні у хворих з хронічною критичною ішемією нижніх кінцівок. Клініч. хірургія, 5–6: 48–49.

Ларионов П.М., Чернявський А.М., Новрузов Р.Б. і др. (2010) Стимуляція ангиогенеза внутрим'язовою імплантацією кліток мононуклеарної фракції аутологічного кісткового мозку при ішемії кінцівок миші. Клеточні технології в біології і медицині, 4: 211–215.

Мишалов В.Г., Черняк В.А., Дабабсех И.М. (2005) Изучение патогенеза и моделирование хронической критической ишемии нижних конечностей в эксперименте. Сердце и сосуды, 2: 102–108.

Пашков Д.В. (2007) Экспериментальное обоснование нового способа фармакологической и хирургической коррекции хронической ишемии конечностей. Дис. ... канд. мед. наук, Курск, 138 с.

Поляченко Ю.В., Домбровский Д.Б., Мартиненко С.И. (2010а) Трансплантація мультипотентних стромальних клітин жирової тканини в лікуванні хронічної ішемії кінцівок. Вестн. неотлож. і востанов. медицини, 4 (11): 489–494.

Поляченко Ю.В., Дрюк М.Ф., Домбровский Д.Б. (2010б) Стан ендотеліоцитів судин у хворих із хронічною ішемією кінцівок після трансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини. Укр. мед. альманах, 3 (13): 150–154.

Поляченко Ю.В., Салютін Р.В. (2011а) Ультроструктурні зміни ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини у хворих з хронічною ішемією кінцівок після трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки. Клініч. хірургія, 6: 41–45.

Поляченко Ю.В., Салютін Р.В., Домбровский Д.Б. (2010в) Гістологічна структура м'язової тканини та імуністохімічна характеристика ангиогенезу після трансплантації аспірату кісткового мозку та гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки за умов експериментальної ішемії. Укр. мед. альманах, 3 (13): 150–153.

Поляченко Ю.В., Салютін Р.В., Мартиненко С.И., Паляница С.С. (2010г) Трансплантація прогеніторних клітин фетальної печінки як метод непрямой ревазуляризації у хворих з хронічною ішемією кінцівок. Вестн. неотлож. і востанов. медицини, 4 (11): 455–458.

Поляченко Ю.В., Салютін Р.В., Мартиненко С.И., Паляница С.С. (2011б) Гістологічна та імуністохімічна характеристика стимульованого ангиогенезу внаслідок трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки. Буковин. мед. вісн., 1 (15): 69–72.

Поляченко Ю.В., Салютін Р.В., Паляница С.С. та ін. (2011в) Клітинна стимуляція ангиогенезу як метод непрямой ревазуляризації у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок. Метод. рекомендації. Київ, 28 с.

Руда М.М., Арефьева Т.И., Выборов О.Н. і др. (2007) Предшественники ендотеліальних кліток і дисфункція ендотелію у боліх ішемічної хвороби серця і супутніми захворюваннями. Нефрологія, 1: 53–60.

Руднев Н.Е. (2003) Особливості консервативної терапії і її роль в комплексному ліченні хронічної ішемії нижніх кінцівок у геронтологічних хворих. Дис. ... д-ра мед. наук, Москва, 246 с.

Смолянинов А.Б., Пыхтин Е.В., Булгин Д.В., Томонага М. (2007) Клеточные технологии в лечении терминальной стадии хронической ишемии нижних конечностей. Клеточная трансплантационная и тканевая инженерия, 3 (II): 40–46.

Benoit E., O'Donnell T.F.Jr., Iafrati M.D. et al. (2011) The role of amputation as an outcome measure in cellular therapy for critical limb ischemia: implications for clinical trial design. J. Transl. Med., 9: 165.

Gabr H., Hedayet A., Imam U., Nasser M. (2011) Limb salvage using intramuscular injection of unfractionated autologous bone marrow mononuclear cells in critical limb ischemia: a prospective pilot clinical trial. Exp. Clin. Transplant, 9 (3): 197–202.

Jonsson T.B., Larzon T., Arfvidsson B. et al. (2012) Adverse events during treatment of critical limb ischemia with autologous peripheral blood mononuclear cell implant. Int. Angiol., 31 (1): 77–84.

Kawamoto A., Asahara T., Losordo D.W. (2002) Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Cardiovasc. Radiat. Med., 3 (3–4): 221–225.

Kawamura A., Horie T., Tsuda I. et al. (2005) Prevention of limb amputation in patients with limb ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. Ther. Apher. Dial., 9 (1): 59–63.

Laurila J.P., Laatikainen L., Castellone M.D. et al. (2009) Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stromal cell transplantation in a rat hind limb injury model. Cytotherapy, 11 (6): 726–737.

Lee H.C., An S.G., Lee H.W. et al. (2012) Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. Circ. J., 76 (7): 1750–1760.

Procházka V., Gumulec J., Jalůvka F. et al. (2010) Cell therapy, a new standard in management of chronic critical limb ischemia and foot ulcer. Cell Transplant., 19 (11): 1413–1424.

Walter D.H., Krankenberg H., Balzer J.O. et al. (2011) Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA). Circ. Cardiovasc. Interv., 4 (1): 26–37.

Застосування клітинних технологій при лікуванні хронічної ішемії нижніх кінцівок

Р.В. Салютін, О.В. Буслович, В.М. Сірман, Р.М. Борис, Л.С. Комарова, С.С. Паляница

Резюме. Хронічна ішемія нижніх кінцівок — поширене захворювання з високим ступенем інвалідизації та значною часткою у структурі хірургічної летальності. Неможливість проведення реконструктивних операцій на судинному руслі у більш ніж половині пацієнтів із цією патологією і неухильне прогресування перебігу хвороби, незважаючи на консервативну терапію, потребує пошуку нових методів лікування. У статті наведено дані про дослідження, метою яких є стимуляція ангиогенезу шляхом застосування клітинних технологій у комплексному лікуванні при ішемії нижніх кінцівок. Багатообіцяючі результати клінічних випробувань застосування прогеніторних клітин, отриманих із периферичної крові, кісткового мозку, жирової тканини і матеріалів фетального походження, заклали основу для серйозних надій на те, що стимуляція процесів ангиогенезу стане ще одним перспективним напрямом у комплексному лікуванні при хронічній ішемії нижніх кінцівок.

Ключові слова: ішемія, ангиогенез, прогеніторні клітини, периферична кров, кістковий мозок, жирова тканина, фетальний матеріал.

Use of cellular technologies in the treatment of chronic lower limb ischemia

R.V. Salyutin, O.V. Buslovych, V.M. Sirman, R.M. Boris, L.S. Komarova, S.S. Palianytsia

Summary. Chronic lower limb ischemia is a widespread disease with the high degree of invalidity and considerable influence in the structure of surgical lethality. Inability of reconstructive vascular operations in more than half of patients with this pathology and steady progress of the disease in spite of the conducted conservative therapy requires the search of new treatment methods. The article presents data on research aimed at the stimulation of angiogenesis by application of cell-based technologies in treatment of lower limb ischemia. Promising results of clinical studies of progenitor cells, derived from peripheral blood, bone marrow, fat tissue and origin fetal materials paved basis for serious hopes, that stimulation of angiogenesis processes will become another perspective direction in the complex treatment of chronic lower limb ischemia.

Key words: ischemia, angiogenesis, progenitor cells, peripheral blood, bone marrow, fat tissue, fetal materials.

Адрес для переписки:

Салютін Руслан Вікторович
01021, Київ, ул. Грушевського, 7
Координаційний центр
трансплантації органів,
тканей і кліток МЗ України

Получено 24.10.2012