

© В. Г. Мішалов, Н.Ю. Литвинова, 2012

УДК 617.58-005.4-0.89

В.Г. МИШАЛОВ, Н.Ю. ЛИТВИНОВА

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

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

В останні роки зростає роль клітинної терапії в лікуванні пацієнтів з тяжкими формами ішемії нижніх кінцівок атеросклеротичного генезу на тлі безуспішності стандартних методів хірургічного та медикаментозного лікування у 25% пацієнтів.

Метою нашої роботи було порівняти ефективність застосування NV1FGF і власних стовбурових клітин, отриманих з підшкірного жиру, у пацієнтів з тяжкими формами критичної ішемії нижніх кінцівок (КИНК).

До дослідження увійшли 24 пацієнти. Всі пацієнти за результатами обстеження, страждали на неоперабельні ураження дистального артеріального русла або мали анатомо-функціональну недостатність колатеральних шляхів кровообігу. У всіх пацієнтів були тяжкі форми ішемії нижніх кінцівок – 3-4 ст. за Покровським-Фонтейном. Пацієнти були розділені на 2 групи по 12 чоловік у кожній.

Дванадцять пацієнтів першої групи отримали NV1FGF по схемі - 8 внутрішньом'язових ін'єкцій в м'язи ураженої кінцівки (4 – в стегно, 4 – в гомілку) тричі з інтервалом у тиждень.

У пацієнтів другої групи проводили забір власної жирової тканини; після виділення і культивування аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин у лабораторних умовах їх вводили так само тричі у 8 точок аналогічно введенню NV1FGF і ще двічі в 4 точки на гомілці і внутрішньовенно крапельно в фізіологічному розчині з інтервалом в 2 тижні.

В обох групах відзначали тенденцію до збільшення дистанції ходи до появи болю. До кінця дослідження приріст показника склав понад 120%. Також в обох групах відзначали тенденцію до поступового зниження інтенсивності болю спокої (в середньому на $4,56 \pm 2,07$ см). Показник лінійної швидкості кровотоку підвищився після лікування у другій групі на 55,12%, у першій групі – всього на 30,14%. Аналіз динаміки даного показника виявив достовірну відмінність між групами ($p = 0,005$). Показник плечо-кісточкового індексу (ПКІ) підвищився після лікування в 2й групі на 15,41%, в той час, як в першій групі – на 7,8% ($p = 0,012$).

У динаміці зміни площі виразково-некротичних уражень у хворих 1 групи реєстрували зменшення площі виразок до 50% від вихідного, у другій групі цей показник був до 20-30% в середньому, хоча і загоєння йшло повільніше, ніж в першій групі.

Кількість незадовільних результатів була вищою у пацієнтів 1 групи – трьом з 12 виконані високі ампутації нижньої кінцівки, 2 – малі ампутації, у другій групі за період спостереження (до 1 року) ампутацій не було.

У пацієнтів обох груп за результатами застосування опитувальника якості життя SF36 встановлено статистично значуще поліпшення фізичного компоненту здоров'я, також спостерігали тенденцію до поліпшення психологічного компоненту здоров'я ($P = 0,2$).

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 безбольової ходи, фізичний компонент здоров'я. Введення аутологічних мезенхімальних клітин дозволяє значно знизити кількість ампутацій у пацієнтів з тяжкими формами ішемії нижніх кінцівок.

Ключові слова: атеросклероз, критична ішемія нижніх кінцівок, клітинна терапія, фактори росту, мезенхімальні стовбурові клітини

В.Г. МИШАЛОВ, Н.Ю. ЛИТВИНОВА

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев

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

Вступление. Облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей (ОАСНК) занимает третье место по распространенности и медико-социальной значимости. В старшей возрастной группе частота ОАСНК может достигать 23%, среди которых у 20-40% развивается критическая ишемия нижних конечностей (КИНК), достигая 600-800 на 1 млн. жителей.

Лечение критической ишемии нижних конечностей (КИНК), которая в структуре облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей занимает около 15-20%, остается актуальной проблемой. Согласно европейской статистике заболеваемость КИНК составляет 500-1000 случаев на 1 млн населения, в Скандинавских странах – 800 на 1 млн жителей, из них 200 больным выполняют

высокие ампутации конечностей. За пять лет, при отсутствии адекватного лечения, удается сохранить нижние конечности лишь у 30% больных, 52% выполняются ампутации конечности, 18% больных умирают от осложнений КИНК. [5] К сожалению, даже при своевременной диагностике и адекватном лечении, остаются существенные проблемы, которые снижают эффективность мер по предотвращению инвалидизации таких больных. После установления диагноза КИНК только у 50% пациентов, возможно выполнить реваскуляризацию, 25% подлежат медикаментозной терапии, а 25% необходима ампутация. Через год после лечения улучшение наступает только у 25% пациентов, у 20% пациентов прогрессирует КИНК, ампутация требуется 30% пациентам, а 25% пациентов умирают. [5]

Несмотря на достигнутые успехи в производстве протезов артериальных сосудов, и улучшения техники их наложения, остается актуальной проблема тромбирования шунтов и почти неразрешимой остается проблема неинтимальной гиперплазии, которая ведет к непроходимости шунта. В большинстве клиник трехлетняя проходимость шунтов составляет 85% для аутовены и всего 40% для синтетических протезов. Применение чрескожных эндоваскулярных вмешательств при КИНК существенно ограничивается мультифокальным характером поражения сосудов.

Все внедренные в медицинскую практику препараты для медикаментозного лечения КИНК не могут предотвратить последующую ампутацию у пациентов с этим заболеванием, а лишь отдалить ее, поскольку не решают главную проблему – отсутствие адекватного кровоснабжения в дистальных тканях пораженной конечности. Успех консервативной терапии наблюдается всего в 25-49% при наличии незаживающих язв и в 50-70% при болях покоя.

В настоящее время интересы ангиологии сосредоточены на «терапевтическом ангиогенезе», который еще называют биологическим шунтированием. Его цель – обеспечение реваскуляризации ишемизированных тканей за счет стимуляции естественных процессов образования и роста сосудов.

Некоторые факторы роста, обладающие проангиогенной активностью,

используются в генной терапии с целью стимуляции ангиогенеза при

ишемии нижних конечностей. Среди них – фактор роста фибробластов (non-viral fibroblast growth factor, NV1FGF), который вызывает рост, пролиферацию и миграцию фибробластов, стимулируя, таким образом, рост новых капилляров, регулирует (стимулирует при ишемии) синтез и высвобождение оксида азота (NO) эндотелием сосудов, обеспечивая вазодилатирующий эффект, ингибирует процесс апоптоза. Фактор является хемоаттрактантом и митогеном для клеток мезенхимального (фибробласты, клетки эндотелия сосу-

дов) и нейроэктодермального происхождения. ФРФ стимулирует образование новых кровеносных сосудов. NV1FGF играет важную роль в процессе ангиогенеза. [1]

Последние годы показали, что у мезенхимальных стволовых клеток (МСК) есть врожденная способность к самообновлению, пролиферации, и дифференцирования в зрелую ткань в зависимости от микросреды, которой они окружены. Первоначально считалось, что эти МСК находятся исключительно в костном мозге, но клетки 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) [2, 3, 4.]

Цель исследования. 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 2х-единственная НК, у 3х -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 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.

У пациентов для оценки результатов измерялась дистанция безболевого ходьбы и плечелодыжечный 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 исследований и их 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 макрогемодинамику выявила

следующее: 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 1й 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 покоя, 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells / H. Nakagami, K. Maeda, R. Morishita [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — Vol. 25. — P.2542—2547.
1. Effect of fibroblast growth factor NVFGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia / J. Belch, W.R. Hiatt, I. Baumgartner [et al.] // *Lancet.* — 2011. — Vol. 377 — P. 1929—37.
2. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue / A. Dicker, K. Le Blanc, G. Astrom [et al.] // *Exp. Cell Res.* — 2005. — Vol.308 — P. 283—290.
3. Schaffler A. Concise review: Adipose tissue— derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies / A. Schaffler, C. Buchler // *Stem Cells.* — 2007. — Vol. 25. — P. 818—827.
4. TASC II. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II) / I. Norgren, W.R. Hiatt, J.A. Dormandy [et al.] // *Eur J Vasc. Endovasc. Surg.* — 2007 — Vol. 33. — P. 70.

V.G. MISHALOV, N.Ju. LITVINOVA

National Medical University by O.O. Bogomolets, Kyiv

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

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.

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.

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 2d 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.

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.

Key words: atherosclerosis, a critical ischemia of the lower extremities, cell therapy, growth factors, mesenchymal stem cells

Стаття надійшла до редакції: 19.04.2012 р.