

А.С. Никоненко, А.Н. Волошин

**Перспективы использования стволовых клеток в сосудистой хирургии**

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** *стволовые клетки, клеточная терапия.*

До недавнего времени для пациентов, страдающих хронической ишемией нижних конечностей, существовало несколько видов лечения. У 50–90% больных, лечение которых оказалось безуспешным, выполняют большие ампутации на уровне бедра. Альтернативным методом реваскуляризации нижних конечностей является клеточная терапия. Предварительные данные исследований доказали безопасность и эффективность использования аутологичных стволовых клеток у больных хронической ишемией нижних конечностей. Положительные результаты рандомизированных исследований позволяют внедрить клеточную терапию в практическую деятельность врача и сделать одним из методов для лечения больных хронической ишемией нижних конечностей.

**Перспективи використання стовбурових клітин у судинній хірургії**

О.С. Никоненко, О.М. Волошин

До недавнього часу для пацієнтів з хронічною ішемією нижніх кінцівок існувало кілька видів лікування. У 50–90% хворих, лікування яких виявилось безуспішним, виконують великі ампутації на рівні стегна. Альтернативним методом реваскуляризації нижніх кінцівок є клітинна терапія. Попередні дані досліджень довели безпеку й ефективність використання аутологічних стовбурових клітин у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок. Позитивні результати рандомізованих досліджень дозволять впровадити клітинну терапію в практичну діяльність лікаря і зробити одним із методів для лікування хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок.

**Ключові слова:** *стовбурові клітини, клітинна терапія.**Патологія.* – 2012. – №1 (24). – С. 4–7**The prospects of stem cells therapy in vascular surgery**

A.S. Nikonenko, A.N. Voloshyn

Until recently for patients with chronic lower limbs ischemia (CLI) there were several ways of treatment. In 50–90% of patients, whose treatment was ineffective, major amputation was done on thigh level. The alternative method of lower limbs revascularization is a stem cell therapy. Preliminary researches data proved safety and efficiency autologous stem cells use in patients with CLI. The positive results of randomized clinical researches will allow to introduce stem cell therapy in practice and do it one of the methods for treatment of patients with CLI.

**Key words:** *stem cells, cell therapy.**Pathologia.* 2012; №1 (24): 4–7

По данным ВОЗ, хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей страдает от 5 до 15% населения. На первом месте по частоте поражения артерий нижних конечностей находится облитерирующий атеросклероз [38–40]. До недавнего времени для пациентов, страдающих облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей, прогрессирующими в критическую ишемию нижних конечностей (КИНК), существовало несколько основных видов лечения: открытые хирургические вмешательства (прямые и не прямые виды реваскуляризации), эндоваскулярные вмешательства (баллонная ангиопластика, стентирование и др.) и консервативная терапия при нереконструктабельном типе поражения артерий нижних конечностей. Около 20% пациентов с КИНК, лечение которых оказалось безуспешным, и тех, кому не подходят перечисленные виды вмешательств, умирают в течение года, а у 50–90% больных выполняют большие ампутации на уровне бедра и голени [1]. Все перечисленное наталкивает исследователей на поиски альтернативных методов реваскуляризации нижних конечностей. В по-

следнее время взгляды ученых сосредоточены на клеточной терапии, а именно на использовании аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга с целью активации процессов ангиогенеза у лиц с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК) [2,3,4,5].

МСК – плюрипотентные стволовые клетки, основным источником которых в организме является красный костный мозг [6]. МСК обнаружены также в пуповинной крови и подкожной жировой клетчатке [7,8]. МСК способны к самоподдержанию, самовоспроизводству и дифференцировке в остеогенном, хондрогенном, ангиогенном, моноцитарном, фиброцитарном, лимфоидном, миоцитарном и кардиомиоцитарном направлениях [9–12]. Экспериментально доказано, что недифференцированные МСК обладают активным тропизмом к поврежденным участкам ткани [13,14]. Доставка МСК в зону ишемии нижней конечности индуцирует рост коллатеральных сосудов [15]. Существует несколько путей введения МСК: внутриаартериальный, внутривенный и внутримышечный, непосредственно в икроножную

мышцу в зоне артериальной окклюзии [30–32]. Выделяют 2 вида трансплантации стволовых клеток: аллогенный, при котором больному вводят стволовые клетки от родственного или неродственного совместимого донора, и аутологичный, когда реципиент получает собственные стволовые клетки. Преимущество на данный момент отдается аутологичным МСК, которые не формируют реакцию отторжения.

Четко доказанного механизма действия МСК при ишемии нижних конечностей на данный момент нет. Существует теория, что физиологически после закупорки крупного сосуда проксимальнее зоны окклюзии резко возрастает сопротивление сдвига (shear-stress) эндотелия, тем самым эндотелиальные клетки продуцируют выброс хемокинов (хемотоксических факторов), что приводит к адгезии и накоплению МСК в очень мелких капиллярах неподалеку от зоны окклюзии. МСК, как и макрофаги, на поверхности имеют рецепторы к ИЛ 1a, ИЛ 1b, ИЛ 6 и TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , которые являются главными регуляторами процессов воспаления [16]. Затем МСК накапливаются в периваскулярном пространстве возле зоны окклюзии и под воздействием ИЛ 1a, ИЛ 1b выделяют множество ангиогенных факторов, факторов роста и матрикс-металлопротеиназ [17]. Таким образом, формируется первая воспалительная фаза коллатерального роста артерий. Во второй фазе некоторые из МСК, обладающие преимущественно моноцитарными свойствами, могут стать клетками-предшественниками эндотелия (circulation endothelial progenitor cells – EPC) [34,35] стенки будущего коллатерального сосуда или превратится в перicyты [18]. Формирование самого мелкого функционирующего коллатерального капилляра занимает от 4 до 6 недель [29].

В настоящее время, несмотря на то, что эффективность клеточной терапии многих заболеваний уже хорошо документирована [36,37], одним из основных препятствий на пути широкого распространения этого метода в сосудистой хирургии являются трудности выделения и очистки аутологичных стволовых клеток. Для использования клеточной терапии в практике необходимо найти простые и эффективные способы клеточной сепарации, чтобы сконцентрировать моноцитарную фракцию клеток-предшественников, т. к. использование необработанного аспирата костного мозга не оказывает влияние на перфузию [33].

Наиболее распространенными способами клеточной сепарации являются:

- Ficoll™ система – центрифугирование, основанное на градиенте плотности форменных элементов крови [19–22];

- центрифугирование крови и системы плазмозереза (COBE® Spectra, Gambro, Sweden; CS 3000®-Plus, Baxter Healthcare, USA) [5];

- прикроватная система центрифугирования (Smart Prep®, Harvest Technologies, USA) [23,24];

Использование перечисленных методик позволяет сепарировать от 1,5 до  $10 \times 10^9$  стволовых клеток костного

мозга. По всему миру проводятся множество рандомизированных исследований с использованием аутологичных стволовых клеток для лечения пациентов с ХИНК.

Одним из первых исследований по использованию аутологичной клеточной трансплантации был отчет ТАСТ (Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation) [5]. В исследовании приняли участие 25 пациентов с ХИНК. Мононуклеарные клетки костного мозга в количестве  $1,6 \pm 0,6 \times 10^9$  внутримышечно вводили в 40 точек икроножной мышцы ишемизированной конечности с плече-лодыжечным индексом (ПЛИ)  $< 0,6$ . Контролем было введение солевого раствора таким же способом в менее ишемизированную конечность (ПЛИ  $> 0,6$ ). Эта процедура расценена как безопасная, а так же способствовала купированию болевого синдрома, увеличению дистанции безболевого ходьбы, увеличению ПЛИ и TCO $_2$  у пациентов с ХИНК в период наблюдения от 4 до 24 недель.

Одним из наиболее масштабных исследований является рандомизированное, проспективное двойное слепое, плацебоконтролируемое, мультицентровое исследование RESOTRE-CLI, проводимое в 18 медицинских центрах США с апреля 2007 г. по февраль 2010 г. [25]. Рандомизировано 86 пациентов с ХИНК, из которых 33 полностью прошли 2 фазы исследования (12 мес. наблюдения), а 46 больных завершили исследования в течении 6 мес. Выполняли забор аспирата костного мозга из подвздошной кости с последующим культивированием в закрытой автоматизированной камере в течение 12 суток для получения культуры стволовых клеток-предшественников. Затем в 20 точек ишемизированной нижней конечности вводили в среднем  $136 \pm 41 \times 10^6$  жизнеспособных клеток или физ. раствора (для контрольной группы). Эффективность оценивали по следующим конечным клиническим результатам: сохранение конечности без ампутации; появление первых нежелательных признаков безуспешного лечения (увеличение размеров язвы, прогрессирование гангрены, ампутация, смерть); уровень ампутации и длительность заживления язв. Промежуточные результаты 2 фазы исследования показали увеличение продолжительности жизни пациентов, снижение частоты осложнений и сохранение конечности без ампутации в группе после внутримышечного введения МСК. Большие ампутации выполнены у 19% пациентов в основной группе, по сравнению с 43% в контрольной группе. Получены достоверные данные лучшего заживления язв основной группы по сравнению с контрольной в течении 12 мес. Компания Aastrom Biosciences планирует начать 3 фазу исследования до 2012 г.

Опубликованы также результаты 2 фазы рандомизированного плацебоконтролируемого мультицентрового исследования PROVASA, проходившего на территории Европы, в котором участвовали 40 пациентов с ХИНК [26]. Основной группе введение МСК осуществляли внутриартериально в пораженную конечность. После 3-месячного наблюдения пациентам обеих групп по-

вторно внутриартериально вводили МСК. Анализ результатов внутриартериального лечения МСК показал увеличение ПЛИ в основной группе с 0,66 до 0,75 по сравнению с контрольной (от 0,64 до 0,66). Улучшение заживления трофической язвы в основной группе – от 3,2±4,7 до 1,89±3,5 см<sup>2</sup> (p=0,014) по сравнению с плацебо – от 2,92±3,5 см до 2,89±4,1 (p=0,5). Увеличение чрезкожного напряжения кислорода (ТСО<sub>2</sub>) в основной группе от 31,6±24 мм рт. ст. до 40,5±23 мм рт. ст. (p=0,058) и уменьшение ТСО<sub>2</sub> в контрольной группе от 46,9±11 мм рт. ст. до 39,7±17 мм рт. ст. (p=0,032). В течение 3 месяцев наблюдения отмечено уменьшение болевого синдрома в основной группе по сравнению с плацебо, хотя существенных различий по сохранению нижних конечностей без ампутаций не было. Повторные внутриартериальные инфузии МСК способствовали заживлению трофических язв и напрямую коррелировали с сохранением конечности (r=0,8; P<0,001).

В настоящее время продолжают рандомизированные плацебоконтролируемые исследования. Наиболее масштабными можно считать BONMOT-CLI [27,28], JUVENTAS trial, «Feasibility Study of the Safety and Activity of Autologous Bone Marrow Aspirate Concentrate (BMAC) for the Treatment of Critical Limb Ischaemia Due to Peripheral Arterial Occlusive Disease», SCRIPT-CLI. В каждое из исследований будет включено более 50 пациентов с ХИНК, лечение которых будет заключаться во введении аутологичных стволовых клеток в ишемизированную нижнюю конечность.

#### Выводы

Положительные результаты рандомизированных исследований позволят внедрить клеточную терапию в практическую деятельность врача и сделать одним из методов для лечения больных с ХИНК. Множество вопросов остаются открытыми и требуют дальнейших научных исследований. В частности, необходимо изучить отбор оптимального типа клеток, метода сепарации, путей введения, дозировки, роль колонийстимулирующего фактора и многие другие. Предварительные данные исследований доказали безопасность и эффективность использования аутологичных стволовых клеток у больных с ХИНК, однако для доказательства определенного клинического эффекта необходимы крупные рандомизированные исследования. Трансплантация МСК позволит значительно снизить количество ампутаций у больных с критической ишемией нижних конечностей и станет новым способом лечения у этой категории больных.

#### Список литературы

1. Dormandy J.A. Management of peripheral artery disease (PAD). TASC Working Group, TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC) / Dormandy J.A., Rutherford R.B. // J. Vasc. Surg. – 200. – №31. – P. s183–s185.
2. Durdu S. Autologous bone marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II–III thromboangiitis obliterans / Durdu S., Akar A.R., Arat M., Sancak T., Eren N.T., Ozyurda, U. // J. Vasc. Surg. – 2006. – №4. – P. 732–739.
3. Esato K. Neovascularization induced by autologous bone

- marrow cell implantation in peripheral arterial disease / Esato K., Hamano K., Li, T.S., Furutani A., Seyama A., Takenaka H., Zempo N. // Cell Transplant. – 2002. – №11. – P. 747–752.
4. Saigawa T. Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans and the association between efficacy and the number of implanted cells / Saigawa T., Kato K., Ozawa T., Toba K. et al. // Circ. J. – 2004. – №68. – P. 1189–1193.
5. Tateishi-Yuyama E. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial / Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U. et al. // Lancet. – 2002. – №360. – P. 427–435.
6. Hung S.C. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow / Hung S.C., Chen N.J., Hsieh S.L., Li H., Ma H.L., Lo W.H. // Stem Cells. 2002. – №20 (3). – P. 249–258.
7. Fickert S. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers / Fickert S., Fiedler J., Brenner R.E. // Arthritis Res Ther. – 2004. – №6 (5). – P. R422–432.
8. Hideya Yoshimura Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle / Hideya Yoshimura, Takeshi Muneta, Akimoto Nimura // Cell Tissue Res. – 2007. – №327 (3). – P. 449–462.
9. Deng W. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP / Deng W., Obrocka M., Fischer I., Prockop D.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – №282. – P. 148–152.
10. Ferrari G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors / Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. // Science. – 1998. – №279. – P. 1528–1530.
11. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering / Fukuda K. // Artif Organs. – 2001. – №25. – P. 187–193.
12. Pittenger M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. // Science. – 1999. – №284. – P. 143–147.
13. Orlic D. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium / Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. // Nature. – 2001. – №410. – P. 701–705.
14. Mackenzie T.C. Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation / Mackenzie T.C., Flake A.W. // Cytotherapy. – 2001. – №3. – P. 403–405.
15. Lachmann N., Nikol S. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery disease: Stem cell therapy / Lachmann N., Nikol S. // VASA. – 2007. – №36. – P. 241–251.
16. Deans R.J. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses / Deans R.J., Moseley A.B. // Exp Hematol. – 2000. – №28. – P. 875–884.
17. Majumdar M.K. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells / Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S.L. // J Cell Physiol. – 1998. – №176. – P. 57–66.
18. Wahlberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia / Wahlberg E. // J Vasc Surg. – 2003. – №38. – P. 198–203.
19. Boyum A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review / Boyum A. // Lymphology. – 1977. – №10. – P. 71–76.
20. Boyum A. Separation of lymphocytes, granulocytes, and

- monocytes from human blood using iodinated density gradient media / Boyum A. // *Methods Enzymol.* – 1984. – №108. – P. 88–102.
21. *Boyum A.* Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality / Boyum A., Lovhaug D., Tresland L., et al. // *Scand J Immunol.* – 1991. – №34. – P. 697–712.
  22. *Boyum A.* Separation of human lymphocytes from citrated blood by density gradient (NycoPrep) centrifugation: monocyte depletion depending upon activation of membrane potassium channels / Boyum A., Brincker F.H., Martinsen I., et al. // *Scand J Immunol.* – 2002. – №56. – P. 76–84.
  23. *Prochazka V.* Autologous bone marrow stem cell transplantation in patients with end-stage chronic critical limb ischemia and diabetic foot / Prochazka V., Gumulec J., Chmelova J., et al. // *Vnitr Lek.* – 2009. – №55. – P. 173–178.
  24. *Amann B.* Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease / Amann B., Luedemann C., Ratei R., et al. // *Cell Transplant.* – 2009. – №18. – P. 371–380.
  25. *Powell R.J.* Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia / Powell R.J., Comerota A.J., Berceli S.A. // *J Vasc. Surg.* – 2011. – Jul 29.
  26. *Walter D.H.* Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA) / Walter D.H., Krankenberg H., Balzer J.O. et al. // *Circ Cardiovasc Interv.* – 2011. – Feb. 1, №4 (1). – P. 26–37.
  27. *Amann B.* Design and rationale of a randomized double-blind, placebo-controlled phase III study for autologous bone marrow cell transplantation in critical limb ischemia: the BONE Marrow Outcomes Trial in Critical Limb Ischemia (BONMOT-CLI) / Amann B., Ludemann C., Ruckert R., et al. // *VASA.* – 2008. – №37. – P. 319–325.
  28. Concentration of Bone Marrow Total Nucleated Cells by a Point-of-Care Device Provides a High Yield and Preserves Their Functional Activity / Heesch et al // *Cell Transplantation.* – 2008. – Vol. 16. – P. 1059–1069.
  29. *Kinnaird T.* Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences / Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. // *Circ Res.* – 2004. – №95. – P. 354–363.
  30. *Zhang M.* Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies / Zhang M, Methot D, Poppa V et al. // *J Mol Cell Cardiol.* – 2001. – №33 (5). – P. 907–921.
  31. *Tran N.* Short-term heart retention and distribution of intramyocardial delivered mesenchymal cells within necrotic or intact myocardium / Tran N., Li Y., Maskali F. et al. // *Cell Transplant.* – 2006. – №15 (4). – P. 351–358.
  32. *Unthank J.L.* Collateral growth in the peripheral circulation: a review / Unthank J.L., Sheridan K.M. et al. // *Vasc Endovascular Surg.* – 2004. – №38 (4). – P. 291–313.
  33. *Lawall H.* Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease / Lawall H., Bramlage P., Amann B. // *Thrombosis and Haemostasis.* – 103.4/2010 Schattauer. – 2010. – P. 696–709.
  34. *Asahara T.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / Asahara T., Murohara T., Sullivan A., et al. // *Science.* – 1997. – Vol. 14, №275 (5302). – P. 964–967.
  35. *Smadja D.M.* Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion and prospects for autologous cell therapy / Smadja D.M., Cornet A., Emmerich J., et al. // *Cell Biol Tox.* – 2007. – №23. – P. 223–239.
  36. *Mansour S.* Stem cell therapy for the broken heart: mini-organ transplantation / Mansour S., Roy D.C., Lemieux B., Ouellet C., Stevens L.M., Noiseux N. // *Transplant Proc.* – 2009. – №41 (8). – P. 3353–3357.
  37. *Marin L.* Application of Stem Cells in Cardiology: Where we are and where we are Going / Marin L., Garcia J., Goldenthal M.J. // *Current Stem Cell Research & Therapy.* – 2006. – №1. – P. 1–11.
  38. *Gardner A.W.* Gender differences in daily ambulatory activity patterns in patients with intermittent claudication / Gardner A.W., Parker D.E. // *J. Vasc. Surg.* – 2010. – №52:5. – P. 4–10.
  39. *McCann A.B.* Treatment strategies for peripheral artery disease / McCann A.B., Jaff MR. // *Expert Opin Pharmacother.* – 2009. – №10 (10). – P. 1571–1586.
  40. *Olin J.W.* Peripheral artery disease: current insight into the disease and its diagnosis and management / Olin J.W., Sealove B.A. // *Mayo Clin Proc.* – 2010. – №85 (7). – P. 678–692.

**Сведения об авторах:**

Никоненко А.С., член-кор. НАН Украины, д. мед. н., профессор, зав. каф. госпитальной хирургии ЗГМУ.

Волошин А.Н., сосудистый хирург, аспирант каф. госпитальной хирургии ЗГМУ.

**Адрес для переписки:**

Волошин Александр Николаевич. 69118, г. Запорожье, ул. Новокузнецкая, д. 10, кв. 53.

Тел.: (061) 769 81 38.

E-mail: voloshyn@live.ru

Надійшла в редакцію 21.01.2012 р.