

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Методика лікування хворих із нереконструктабельною хронічною критичною ішемією нижніх кінцівок із застосуванням аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин



Н. Ю. Літвінова¹, В. А. Черняк¹,
О. І. Кефелі-Яновська², Д. Є. Дубенко¹

¹ Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

² Київський міжнародний університет

Поширеність захворювань периферичних артерій становить 3–10% у загальній популяції та 15–20% серед осіб віком понад 70 років. Ці захворювання уражують 27 млн осіб в Європі та США. Щорічна кількість нових випадків критичної ішемії нижніх кінцівок становить від 500 до 1000 випадків на 1 млн населення, з вищим рівнем серед пацієнтів з діабетом.

Мета роботи — поліпшити результати лікування хворих на хронічну критичну ішемію нижніх кінцівок шляхом розробки і впровадження методики аутологічної трансплантації мультипотентних стовбурових мезенхімальних стромальних клітин.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на базі клінічних центрів кафедри хірургії № 4 Національного медичного університету імені О. О. Богомольця — відділення судинної хірургії Олександрівської клінічної лікарні м. Києва та відділення судинної хірургії Головного військового госпіталю МО України. Дизайн дослідження: 1-й період — скринінговий, 2-й період — рандомізація та розподіл хворих по групах лікування, 3-й період — лікування, 4-й період — спостереження (3 роки). Забір підшкірно-жирової клітковини, культивування і пересадку аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин за запропонованою нами методикою проведено 41 пацієнту.

Результати та обговорення. Частота збереження нижньої кінцівки у пацієнтів, яким вводили стовбурові клітини з адипоцитів (СКА), була статистично значущо більшою, ніж у пацієнтів, котрим застосовували інші види терапії, та становила 82% через три роки спостереження.

Висновки. Терапевтичний механізм дії СКА, досліджений на тваринних моделях та у пацієнтів, переважно полягає в тому, що ріст судин відбувається в ішемічній кінцівці, можливо, внаслідок взаємодії локальних судинних і запальних клітин та ін'єктованих СКА. У групі пацієнтів, які отримували цей вид терапії, відзначено меншу частоту ампутацій, ніж у групах, в яких її не отримували.

Ключові слова: критична ішемія нижніх кінцівок, захворювання периферичних артерій, стовбурові клітини з адипоцитів, ангиогенез.

Поширеність хвороб системи кровообігу в Україні постійно зростає. За даними фахівців охорони здоров'я, захворюваність зростає в 2,7 рази в 2013 р. порівняно із 1996 р. При збереженні такої

тенденції прогнозують, що до 2020 р. захворюваність у країні збільшиться ще на 40,1%.

Симптоми хронічної ішемії нижніх кінцівок відзначають у 3% населення, у третини з них через 5–7 років після появи перших ознак захворювання розвивається критична ішемія [1, 4]. Хвороба характеризується болем у кінцівці в стані спокою та загрозою втрати нижньої кінцівки внаслідок значного зниження притоку крові до ураженої кінцівки, асоціюється з дуже високим рівнем захворюваності та смертності [1, 5, 6]. Термін хронічна критична ішемія нижньої кінцівки (ХКІНК)

Стаття надійшла до редакції 25 лютого 2019 р.

Літвінова Наталія Юріївна, к. мед. н., асистент
01023, м. Київ, вул. Шовковична, 39/1. Тел. (44) 255-15-60
E-mail: hospurg2@gmail.com

© Н. Ю. Літвінова, В. А. Черняк, О. І. Кефелі-Яновська,
Д. Є. Дубенко, 2019

зазвичай застосовують щодо пацієнтів з хронічними ішемічними болями в кінцівці в стані спокою, виразками, гангrenoю або щодо верифікованого облітерувального ендартеріїту [5, 7].

Поширеність захворювань периферичних артерій становить від 3 до 10 % у загальній популяції та 15–20 % серед осіб віком понад 70 років. На захворювання периферичних артерій хворіє 27 млн осіб в Європі та США [8]. Щорічно реєструють від 500 до 1000 нових випадків критичної ішемії нижніх кінцівок (КІНК) на 1 млн населення, серед пацієнтів з діабетом цей показник найвищий [1]. Частота захворювань артерій нижніх кінцівок має виражену вікову залежність: нехарактерна до 50 років та різко зростає з віком. Понад 95 % випадків ХКІНК є наслідком атеросклеротичного стенозу або оклюзії. Інші потенційні джерела хронічного артеріального оклюзійного захворювання артерій — емболізації, аневризми підколінної артерії з хронічним тромбозом, синдром стиснення підколінної артерії, облітерувальний тромбангіт (хвороба Бюргера), фіброзно-м'язова дисплазія, коарктація аорти, артеріт Такаюсу, ендоефіброз зовнішньої клубової артерії та радіаційне ураження. Більшість пацієнтів з КІНК мають багатосегментне ураження артерій. Найтяжчим вважають дистальний тип через найвищий ризик великих ампутацій нижньої кінцівки.

Мета — поліпшити результати лікування хворих на хронічну критичну ішемію нижніх кінцівок шляхом розробки і впровадження методики аутологічної трансплантації мультипотентних стовбурових мезенхімальних стовбурових клітин.

Матеріали і методи

Дослідження проведено у 2010–2014 рр. на базі клінічних центрів кафедри хірургії № 4 Національного медичного університету імені О. О. Богомольця — відділення судинної хірургії Олександрівської клінічної лікарні м. Києва та відділення судинної хірургії Головного військового госпіталю МО України відповідно до наказу МОЗ України від 10.10.2007 р. № 630 «Про затвердження Порядку проведення клінічних досліджень клітинних і тканинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань» та змін до «Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань», затвердженого МОЗ України від 13.02.2006 р. № 66.

Дизайн дослідження

1-й період — скринінговий (до 2 тиж). Оцінка можливості залучення в дослідження. На цьому етапі проведено всі обстеження хворих.

2-й період — підписання інформованої згоди, рандомізація. Поділ на групи лікування (2 дні).

3-й період — лікування (впродовж 1,5 міс).

4-й період — період спостереження (3 роки).

У дослідження залучено пацієнтів, у яких виконання хірургічної реконструкції судинного русла було неможливим: наявність протяжної оклюзії стегнової артерії з переходом на дистальне русло; ураження судин дистальних сегментів з поганим прогнозом; виконані раніше реконструктивні втручання на артеріях нижніх кінцівок, які не усунули хронічної ішемії за неможливості повторної операції; декомпенсація соматичної патології, яка могла б перешкодити виконанню хірургічного втручання.

У дослідженні взяли участь 110 пацієнтів із болем у кінцівці у стані спокою, ішемічним набряком і трофічними змінами (ІІА, ІІБ і ІV стадії ішемії нижньої кінцівки згідно з класифікацією Європейської асоціації ангіологів і судинних хірургів), спричиненими нереконструктабельними оклюзуювальними та облітерувальними захворюваннями артеріальних судин нижніх кінцівок.

Для оцінки недоцільності реконструкції застосовували шкалу Finnvasc.

Пацієнтів розділили на три групи за методом лікування: 1-ша (n = 48) — група ротаційної остеоперфоратії, 2-га (n = 21) — вводили препарат фактора росту ендотеліоцитів для стимуляції власного ангіогенезу, 3-тя (n = 41) — проведено забір підшкірно-жирової клітковини, культивування і пересадку аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин за запропонованою нами методикою. 91 (81,8 %) пацієнт груп лікування був чоловічої статі, вік коливався від 45 до 90 років, у середньому (68,0 ± 8,5) року. Середній вік контрольної групи був (67,7 ± 4,2) року, пацієнтів чоловічої статі було 72,9 %. Різниця цих показників між групами є статистично недостовірною. Останню групу вивчено в нашому дослідженні. Клініко-демографічні характеристики пацієнтів наведено у табл. 1.

Технологія методу лікування хронічної критичної ішемії нижніх кінцівок із застосуванням аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин

Матеріал брали під місцевою анестезією. Спеціальної підготовки хворого не проводили. Після оброблення шкіри на животі хворому проводили поширену інфільтраційну анестезію розчином новокаїну або лідокаїну 2 %. Звичайним черевцевим скальпелем виконували розріз у місці введення анестетика завдовжки 0,5–2,0 см. Щоб не зруйнувати жирову тканину під час заготівлі, транспортування і пересадки, виконували забір інтактними порціями малими канюлями з великими отворами. Це дає змогу зберегти структуру жирової тканини. До канюлі під'єднували спеціальний пристрій, який здійснює забір жиру (шприц або ємність, під'єднану до відсмоктувача). Після видалення жиру проколи зашивали косметичними швами.

Т а б л и ц я 1

Розподіл клініко-демографічних характеристик хворих за групами

Показник	1-ша група (n = 48)	2-га група (n = 21)	3-тя група (n = 41)	P	Разом (n = 110)
Вік (M ± m), роки	66,4 ± 9,8	67,7 ± 8,7	69,8 ± 6,5	0,64	68,0 ± 8,5
Чоловіки, %	81,3	81,0	82,9	0,97	81,8
Супутні захворювання					
Артеріальна гіпертензія, %	64,6	66,7	68,3	0,92	66,4
Цукровий діабет, %	47,9	47,6	53,7	0,93	50,0
Ішемічна хвороба серця, %	81,2	71,4	70,7	0,83	75,5
Гіперліпідемія, %	54,2	52,4	53,7	0,99	53,6
Гострий розлад мозкового кровообігу в анамнезі	3 (7,8%)	2 (9,5%)	3 (7,4%)	0,83	8 (7,2%)
Тютюнокуріння в анамнезі, %	37,5	38,1	41,5	0,92	39,1
Індекс маси тіла, кг/м ²	26,8 ± 3,4	27,9 ± 2,9	28 ± 5,6	0,68	27,6 ± 3,6

Клітинний трансплантат «Аутологічні мезенхімальні клітини з жирової тканини людини (АМК-ЖТ)» — культура мезенхімальних клітин людини. Для отримання препарату АМК-ЖТ використовують матеріал біологічного походження, який відбирають в асептичних умовах хірургії. Відповідає вимогам до стерильного біологічного матеріалу людини. Препарат передають у клініку в стерильній упаковці.

Форму згоди пацієнта на одержання і використання аутологічних мезенхімальних клітин заповнювали дослідник, пацієнт і повноважний представник ТОВ «БіоПро Стем Технолоджі».

Виділення первинного вихідного біологічного матеріалу

Роботи з клітинним матеріалом виконують у стерильних боксах лабораторії в ламінарних боксах з вертикальною подачею потоку повітря. Забраний в асептичних умовах операційної ліпоаспірат у кількості 50 мл поміщали у стерильну закриту ємність з широким горлом з кришкою, яка містила тканинний консервувальний розчин (поживне середовище типу DMEM або 199 та суміш антибіотиків пеніцилін/стрептоміцин по 2000 ОД/мл).

Ємність з ліпоаспіратом маркували (ПІБ пацієнта, номер матеріалу, дата і час заготівлі) і поміщали у холодильник або термоізоляційний контейнер за температури від 0 до 4 °С. Матеріал може зберігатися в таких умовах не більше 12 год. Для кожного зразка вихідного матеріалу заповнювали супровідну картку.

Вихідний матеріал для отримання клітин транспортували із супровідною документацією в опечатаній термоізоляційній тарі критим транспортом у лабораторію «Біо Про Стем Технолоджі». Час транспортування не перевищував 6 год.

Одержання суспензії стромально-судинної фракції клітин з ліпоаспірату

Промивання отриманого ліпоаспірату

Дані із супровідної картки про ліпоаспірат заносять до журналу реєстрації біологічного матеріалу.

Зовнішню поверхню ємності з вихідним матеріалом обробляють 70 % спиртом. В умовах ламінарного боксу з дотриманням правил асептики матеріал промивають тричі стерильним фізіологічним розчином або розчином Хенкса, який містить суміш антибіотиків пеніцилін/стрептоміцин по 2000 ОД/мл. Після промивання ліпоаспірат залишають на 12 год за температури 4 °С.

Одержання первинної суспензії клітин стромально-судинної фракції

Ліпоаспірат дезагрегують ферментативно в умовах ламінарного боксу в 0,2 % розчині Пронази (500 мл поживного середовища DMEM/F12 + 1 г пронази) у співвідношенні 1:1 протягом 60 хв за температури 37 °С при постійному помішуванні в термошейкері зі швидкістю 220 об./хв. Потім розчин пронази з клітинами стромально-судинної фракції акуратно відсмоктують піпеткою низу, залишивши чистий жир у ємності.

Проназно-клітинну суспензію розливають по центрифужних пробірках та центрифугують на холоді за температури 4 °С протягом 15 хв при 2000 об./хв. Надосадову рідину відбирають піпеткою, а осад промивають 1 раз розчином фосфатно-сольового буфера (PBS) у центрифужних пробірках при 1500 об./хв протягом 10 хв.

Після промивання PBS клітинний осад ресуспендують у ростовому середовищі:

500 мл поживного середовища DMEM/F12 + 2 мл 4 % розчину гентаміцину + 0,0005 г/мл амфотерицину В + 10 % ETC + 600 мг L-глутаміну.

Визначення кількості життєздатних клітин

Підрахунок кількості життєздатних клітин проводять у камері Горяєва з використанням 3 % оцтової кислоти (підраховують усі клітини, які містять ядро) та 0,1 % розчину трипанового синього (підраховують зафарбовані загиблі клітини).

Культивування та пасажування клітин стромально-судинної фракції

Ресуспендовані в ростовому середовищі первинно ізольовані клітини засівають в культуральні флакони площею 75 см² у концентрації 5·10⁴ клітин, які містять ядро, на 1 см² флакона. Інкують клітини до утворення моношару в CO₂-інкубаторі у вологій атмосфері за температури 37 °С та 5 % CO₂. Ростове середовище міняють кожних 3–4 доби.

Пасажування, або субкультивування, проводять з використанням суміші розчинів трипсину/ЕДТА у співвідношенні 0,05 %: 0,02 % у PBS, рН 7,4. Коефіцієнт пасажування становив 1 : 2.

Фасування суспензії клітин та маркування пробірок

Клітини розливають шприцом у кріопробірки місткістю 1,8 мл. Об'єм суспензії клітин у кожній кріопробірці має бути однаковим і становити (1,00 ± 0,05) мл.

Готують чотири контрольні кріопробірки з 0,25 мл клітинної суспензії:

- для бактеріологічного контролю;
- для полімеразної ланцюгової реакції на сифіліс, токсоплазмоз, гепатити А, В, С, D, G, герпес 1/2 типу, гонококову інфекцію, червону висипку, кір, цитомегаловірусну інфекцію, інфекцію Епштейна—Барр, мікоплазмоз, хламідіоз;
- для полімеразної ланцюгової реакції на вірус імунодефіциту людини;
- для перевірки життєздатності клітин після розморожування та імунофенотипування клітин.

Кріопробірки з клітинами маркують, вказуючи номер зразка.

Визначення імунофенотипу клітин

Мембранні поверхневі рецептори (позитивна експресія CD105, CD44, CD73, CD90) визначають методом протокової цитофлуориметрії з використанням клітинного сортера BD FACSAria II cell sorter за допомогою моноклональних антитіл у культурах адипозних мезенхімальних стовбурових клітин. Для роботи передають 1·10⁶ розморожених клітин. Дані про імунофенотип клітин отримують у вигляді документа, завіреного завідувачем лабораторії і печаткою організації, яка проводила тестування.

При контролі готової продукції на кожному етапі проводять вибраковування препаратів.

Препарати вибраковують:

- за відсутності маркування;
- при порушенні герметичності кріопробірок;
- при порушенні розморожування через випаровування азоту;
- за наявності будь-якого виду бактеріальної, вірусної чи мікоплазмової флори; якщо кількість життєздатних клітин у суспензії менше 60 %.

Заповнення аналітичного паспорта

В аналітичний паспорт вносять такі дані:

- ПІБ та вік пацієнта, в якого було забрано ліпоаспірат;
- маркування зразка клітин;
- кількість ампул, об'єм суспензії;
- кількість клітин в 1 мл і загальна кількість клітин;
- стерильність;
- суспензія клітин перевірена на відсутність будь-якої вірусної і мікоплазмової флори;
- підпис відповідального за кріоконсервованій матеріал.

Знезараження відходів

Відходи виробництва підлягають знезараженню та утилізації згідно з чинними санітарними правилами.

Перед передачею препарату за запитом клінічної установи, пробірки в певній кількості виймають із стерильної упаковки та перевіряють на наявність маркування, цілісність герметичності. Неякісні пробірки вибраковують, знезаражують та утилізують. Марковані пробірки з клітинами людини упаковують у транспортні сумки розробленого зразка з гніздами, котрі забезпечують нерухомість та цілісність флаконів у кількості, яка необхідна для подальшого застосування.

На пробірки наклеюють етикетку на якій зазначають:

- назву і товарний знак підприємства-виробника;
- назву препарату;
- номер серії;
- термін придатності;
- умови зберігання та напис «Біопрепарати».

Транспортують контейнер з пробірками будь-яким видом транспорту відповідно до «Правил перевезення вантажів і багажу, які швидко псуються» і правил, які діють на цьому виді транспорту.

Клітини людини передають за запитом клінічної установи в нативному стані зі супровідним аналітичним паспортом, який вклеюють у клінічну картку хворого.

Контроль продукту виробництва

Контролю підлягають зразки вироблених препаратів (табл. 2).

Зразки, котрі досліджують на стерильність, засівають не менше ніж по 1 мл кожний у дві пробірки, які містять 20 мл тіогліколевого середовища. Ще

Т а б л и ц я 2

Характер і способи контролю зразків вироблених препаратів

Параметр, який контролюють	Установлене значення	Метод контролю
Стерильність	Препарат має бути стерильним	За методикою «Контроль стерильності консервованої крові, її компонентів, препаратів, консервованого кісткового мозку, плазмозамінних та консервуючих розчинів, умов їх заготівлі», затвердженою наказом МОЗ України № 164 від 05.07.1999 р.
Концентрація клітин	Не менше ніж $(1,00 \pm 0,04) \cdot 10^6$ /мл	Візуально методом мікроскопування
Концентрація життєздатних клітин	Не менше ніж (70 ± 10) % від початкової	Метод культивування Візуально методом мікроскопування
Герметичність	Мають бути герметичними	Візуально

дві пробірки з тіогліколевим середовищем залишають незасіяними для контролю стерильності поживних середовищ на весь період інкубації досліджуваних зразків. Посіви в тіогліколевому середовищі і контрольні проби інкубують у термостаті за температури від 20 до 25 °С та від 30 до 35 °С.

Зразки витримують дві доби за відповідної температури, після чого проводять посів по 0,5 мл з кожної пробірки в інші дві пробірки, які містять 10 мл тіогліколевого середовища. Пересіви інкубують за тих самих температур, що і пробірки, з яких було проведено висів. Результати реєструють через одну добу після пересіву.

Термін інкубації посівів у термостаті — 14 діб.

Посіви переглядають щоденно. За відсутності росту мікроорганізмів у поживних середовищах вважають, що зразки відповідають вимогам стерильності.

Наявність росту мікроорганізмів у поживних середовищах оцінюють візуально макроскопічно (каламуть, плівка, осад, включення) і мікроскопічно. Зазначають температуру, за якої відбувся ріст, морфологію клітин та забарвлення за Грамом.

У разі виявлення росту навіть в одній пробірці проводять повторний контроль подвійної кількості зразків цієї серії. Якщо виявлено ріст хоча б в одній пробірці під час повторного контролю препарат вважають нестерильним.

Згідно з наказом МОЗ України препарати донорської крові перевіряють імуноферментним методом на наявність сифілісу, ВІЛ-1 та ВІЛ-2, гепатитів В та С.

Перевірку на наявність ToRCH-інфекції (*Toxoplasma gondii*, вірус краснухи, цитомегаловірус, вірус простого герпесу 1 та 2 типів), сифілісу, ВІЛ-1 та ВІЛ-2, гепатитів В та С, токсоплазму та мікоплазми проводять відповідно до інструкції «Застосування полімеразної ланцюгової реакції для виявлення збудників інфекційних захворювань людини» (Методичні вказівки 9.9.5.101-2003. Видання офіційне.— К., 2003).

Концентрацію клітин визначають методом мікроскопування в камері Горяєва або на приладі Fluо-

metry згідно з інструкцією виробника. Для цього стерильним одноразовим 10-міліметровим шприцом через ін'єкційну голку клітини перемішують у контейнері. Дві краплі клітинної суспензії наносять на предметне скло, з яких набирають меланжер до першої позначки, а з клітин, котрі залишилися, роблять мазки. У меланжер до кінцевої позначки добирають розчин метиленового синього на 2 % розчині оцтової кислоти (10-разове розведення).

Технологія виробництва препарату АМК-ЖТ не містить отруйних і токсичних речовин і не передбачає спеціальних заходів з охорони довкілля.

Лабораторний етап виготовлення АМК-ЖТ тривав 2—3 тиж залежно від віку хворого, оскільки з віком кількість мультипотенційних мезенхімальних клітин у підшкірно-жировій клітковині зменшується [2] і для отримання необхідної кількості клітин потрібна більша кількість пасажів.

Методика введення мезенхімальних стовбурових клітин

Уведення аутологічних клітин проводили амбулаторно без знеболювання і попередньої підготовки. Перше введення здійснювали в 4 точки на м'язах стегна та 4 у гомілково-ступеневий м'яз. Вміст пробірки з препаратом (10 мл) розподіляли у 8 шприців для внутрішньом'язового введення. Останнє зазвичай було безболісним та не спричиняло місцевих ускладнень. Антисептичні та асептичні умови — як при звичайних ін'єкціях в умовах маніпуляційної кімнати.

Друге введення (через 2—3 тиж) проводили після отримання другої порції препарату (10 мл), яку розподіляли по 1,5 мл у 4 шприци для внутрішньом'язових ін'єкцій. Препарат вводили в 4 точки на гомілці, 4 мл — системно внутрішньовенно крапельно у 200 мл фізіологічного розчину 0,9 % NaCl після внутрішньом'язових ін'єкцій. Третє введення (через 2—3 тиж) повторювало друге.

Під час кожного візиту проводили опитування пацієнта, визначали наявність і ступінь вираженості як прогнозованих, так і неочікуваних побічних реакцій.

Висновок про ефективність досліджуваного препарату робили з урахуванням усіх об'єктивних і суб'єктивних даних, отриманих під час дослідження.

Супутнє лікування учасників дослідження

Досліджуваний препарат призначали на тлі стандартної терапії відповідно до протоколу ведення хворих, який застосовують у клініці. Не використовували простагландини у вигляді інфузійної терапії. За весь період дослідження і як мінімум за 72 год до його початку пацієнтам забороняли вживати алкоголь, приймати інші лікарські препарати, зокрема продукти на основі трав або хімічні препарати.

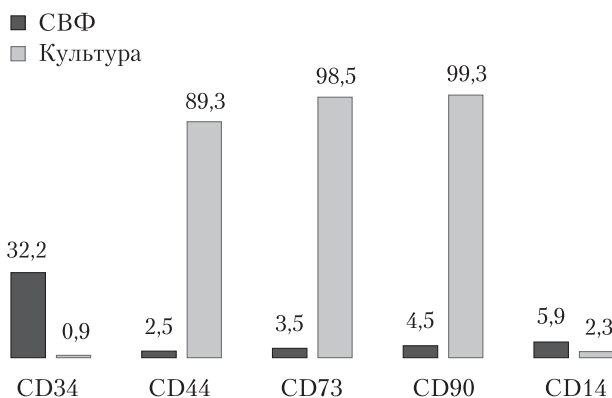
Під час участі в дослідженні пацієнти могли отримувати в стаціонарі поліфункціональні розчини («Реосорбілакт» 400,0 мл внутрішньовенно крапельно, «Латрен» 200,0 мл внутрішньовенно крапельно); під час амбулаторного періоду спостереження пацієнтам могли призначати тівортін у добовій дозі 2,4 г, ацетилсаліцилову кислоту в дозі 100 мг.

Під час участі в дослідженні пацієнти могли отримувати тиклопідин у дозі 250 мг двічі на добу, «Тромбо АСС» у дозі 100 мг один раз на добу, пентоксифілін у дозі 100 мг внутрішньовенно, нікотинову кислоту в дозі 4,0 мг внутрішньом'язово двічі на добу, папаверин у дозі 2,0 внутрішньом'язово двічі на добу, фізіолікування. Під час амбулаторного періоду спостереження пацієнтам можна призначати ацетилсаліцилову кислоту в дозі 100 мг або клопідогрель у дозі 75 мг/добу.

Результати

Характеристики клітин, отриманих із ліпоаспірату

Після культивування не виявлено жодних додаткових забруднень, що свідчить про те, що зразки аспірату не були інфіковані під час забору або транспортування.



СВФ – стромоваскулярна фракція.

Рис. 1. Кількість клітин на початку культивування та в кінці, %

У стромоваскулярній фракції частка життєздатних клітин становила (87,4 ± 3,2) %. У всіх зразках стовбурових клітин з адипоцитів (СКА) середня кількість моноядерних життєздатних клітин була (520,2 ± 98,6) тис. на 1 г білого жиру.

Після ідентифікації клітин методом протокової цитофлуометрії та визначення кластерів диференціації виявилося, що частка CD14-, CD34- і CD45-позитивних клітин (для виявлення макрофагів, гематопоетичних і ендотеліальних клітин), становила відповідно (5,9 ± 0,8), (32,2 ± 4,6) та (28,7 ± 6,2) %.

Через 2–3 тиж (тривалість культивування залежала від віку хворого), як і очікувалося, кількість CD45-, CD14- і CD34-позитивних клітин значно зменшилася до 1–2 %, тоді як 99 % культивованих СКА мали маркери мезенхімальних стовбурових клітин – позитивні за CD73 ((99,9 ± 0,4) %) і CD90 ((99,4 ± 0,5) %):

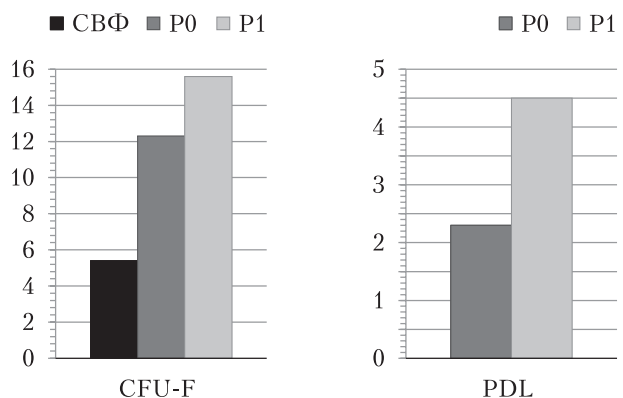
CD34 ⁻	0,97–2,2 %
CD73 ⁺	89,9–99,7 %
CD45 ⁺	0,32–1,13 %
CD90 (Thy-1)	96,9–100,0 %
CD105	96,5–98,0 %

Характеристики клітин та їх зміни після культивування наведено на рис. 1, 2 та у табл. 3.

Підраховували колонії, які містили понад 50 колонієутворюючих фібробластів (CFU-F). CFU-F розраховували діленням кількості колоній на кількість клітин, посіяних на середовище. За час культивування кількість CFU-F суттєво не збільшилась, але рівень подвоєння популяції (PDL – загальна кількість разів, коли клітини в популяції подвоїлися з моменту їх первинної ізоляції *in vitro*) збільшився з 2,3 ± 1,4 до 5,2 ± 0,8. Формула для розрахунку:

$$n = 3,32 (\log UCY - \log l) + X,$$

де n – кінцевий рівень PDL даної субкультури; UCY – кількість клітин у цій точці; l – кількість клітин, яку використовували як інкулянт на початку цієї субкультури; X – рівень подвоєння інкулянта, який використовували для ініціювання субкультури.



P0 – після першого пасажу; P1 – у кінці культивування.

Рис. 2. Зміни у характеристиках клітин під час культивування

Т а б л и ц я 3

Характеристики клітин під час культивування

Показник	CD14, %	CD45, %	CD34, %	CFU-F, %	Подвоєння популяції, %
СВФ	5,46 ± 0,1	28,92 ± 0,64	25,10 ± 0,35	5,99 ± 0,12	
Початок	1,25 ± 0,9	3,25 ± 0,13	15,97 ± 0,3	12,56 ± 0,08	2,39 ± 0,03
Кінець	0,92 ± 0,17	1,14 ± 0,05	1,47 ± 0,08	15,66 ± 0,13	4,59 ± 0,04

В кінці культивування в усіх зразках було відібрано від $30 \cdot 10^6$ – $40 \cdot 10^6$ СКА. Оцінювали експресію генів *Oct4*, *Nanog* і *Telomerase* як контроль безпечності, щоб заперечити будь-які забруднювальні плюрипотентні або ракові клітини в культурі. Рівні цих маркерів плюрипотентності були значно нижче, ніж у стандартних клітин (наприклад, у людських ембріональних стовбурових клітин). Каріотип клітинного препарату не показав аномалій у жодного пацієнта.

Уведення клітин у м'яз та внутрішньовенно не супроводжувалось ускладненнями або небажаними явищами і добре переносилося хворими.

Для визначення чи впливає запропоноване лікування на ризик ампутації нижньої кінцівки розраховували відношення шансів (ВШ) із 95 % довірчим інтервалом (ДІ). Розрахунки проводили для оцінки ризику як всіх видів ампутацій, так і лише високих ампутацій.

Значуще збільшення шансів збереження кінцівки було лише у 3-ї групи порівняно із контрольною та іншими групами лікування (ВШ 0,224 (95 % ДІ 0,086–0,579), $\chi^2 = 0,0001$ для контрольної групи та ВШ 2,344 (95 % ДІ 1,939–5,853) для інших груп лікування).

Лише лікування у 3-й групі знижувало ризик великої ампутації порівняно із контрольною та

іншими групами лікування (ВШ 6,698 (95 % ДІ 2,069–21,680) і ВШ 0,358 (95 % ДІ 1,111–1,158).

Висновки

Критична ішемія нижніх кінцівок є найтяжчою формою захворювання периферичних артерій і асоціюється з дуже високим ризиком ампутації ураженої кінцівки та смерті.

Рівень високих ампутацій безпосередньо впливає на тривалість життя хворих.

Терапевтичний механізм дії стовбурових клітин з адипоцитів, досліджений на тваринних моделях та у пацієнтів, переважно полягає в тому, що ріст судин відбувається в ішемічній кінцівці, можливо, завдяки взаємодії локальних судинних і запальних клітин та ін'єктованих стовбурових клітин з адипоцитів.

Частота збереження нижньої кінцівки у пацієнтів, яким вводили стовбурові клітини з адипоцитів, була статистично значущо більшою, ніж у 1-й та 2-й групі, та становила 82 % через три роки спостереження. Найменшу кількість великих ампутацій відзначено у 3-й групі (2,3 % нижче колінного суглобу та 7,3 %-вище), тоді як у контрольній групі вона становила 18 та 24 % відповідно.

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція і дизайн дослідження, статистичне опрацювання даних – Н.Л.; збір матеріалу, написання тексту – Н.Л., Д.Д.; обробка матеріалу – Н.Л., О.К.-Я.; редагування – В. Ч.

Література

- Ефименко А. Ю., Старостина Е. Е., Калинина Н. И., Парфенова Е. В. Влияние возраста на ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 3. – С. 48–57.
- Blecha M. J. Critical limb ischemia // The Surgical Clinics of North America. – 2013. – N 4 (93). – P. 789–812.
- Critical Limb Ischemia. – CRC Press, 2009. – 352 p.
- Diehm N. et al. Chronic critical limb ischemia: European experiences // J. Cardiovasc. Surg. – 2009. – Vol. 50, N 5. – P. 647–653.
- Greesele P., Migliacci R. The peripheral arterial disease subgroup in the CHARISMA trial: does it tell us anything new? // European Heart Journal. – 2009. – N 2 (30). – P. 131–132.
- Harris M., Taylor G. Medical statistics made easy. – Scion Publishing Ltd.; 3rd edition- 2014. – 128 p.
- Hirsch A. T. et al. ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vas // Journal of the American College of Cardiology. – 2006. – N 6 (47). – P. 1239–1312.
- Petrie A., Sabin C. Medical statistics at a glance. 2nd ed. – Wiley-Blackwell, 2013. – 122 p.
- Tendera M. et al. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment // European Heart Journal. – 2011. – N 22 (32). – P. 2851–2906.

Методика лечения больных с нереконструктабельной хронической критической ишемией нижних конечностей с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток

Н. Ю. Литвинова¹, В. А. Черняк¹, Е. И. Кефели-Яновская², Д. Е. Дыбенко¹

¹ Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев

² Киевский международный университет

Распространенность заболеваний периферических артерий составляет 3–10% в общей популяции и 15–20% среди лиц старше 70 лет. Эти заболевания поражают 27 млн лиц в Европе и США. Ежегодное количество новых случаев критической ишемии нижних конечностей составляет от 500 до 1000 случаев на 1 млн населения, с высоким уровнем среди пациентов с диабетом.

Цель работы — улучшить результаты лечения больных хронической критической ишемией нижних конечностей путем разработки и внедрения методики аутологичной трансплантации мультипотентных стволовых мезенхимальных стромальных клеток.

Материалы и методы. Исследование проведено на базе клинических центров кафедры хирургии № 4 Национального медицинского университета имени А. А. Богомольца — отделения сосудистой хирургии Александровской клинической больницы г. Киева и отделения сосудистой хирургии Главного военного госпиталя МО Украины. Дизайн исследования: 1-й период — скрининговый, 2-й период — рандомизация и распределение больных по группам лечения, 3-й период — лечение, 4-й период — наблюдение (3 года). Забор подкожно-жировой клетчатки, культивирование и пересадку аутологичных мезенхимальных стволовых клеток по предложенной нами методике проведено 41 пациенту.

Результаты и обсуждение. Частота сохранения нижней конечности у пациентов, которым вводили стволовые клетки адипоцитов (СКА), была статистически значимо больше, чем у пациентов, которым применяли другие виды терапии, и составила 82% через три года наблюдения.

Выводы. Терапевтический механизм действия СКА, исследованный на животных моделях и у пациентов, преимущественно заключается в том, что рост сосудов происходит в ишемической конечности, возможно, в результате взаимодействия локальных сосудистых и воспалительных клеток и инъецированных СКА. В группе пациентов, получавших этот вид терапии, отмечена меньшая частота ампутаций, чем в группах, в которых ее не получали.

Ключевые слова: критическая ишемия нижних конечностей, заболевания периферических артерий, стволовые клетки адипоцитов, ангиогенез.

Methods of treating patients with non-restructuring chronic critical lower limb ischemia using autologous mesenchymal stem cells

N. Yu. Litvinova¹, V. A. Chernyak¹, O. I. Kefeli-Yanovska², D. E. Dybenko¹

¹ O. O. Bohomolets National Medical University, Kyiv

² Kyiv International University

The prevalence of peripheral arteries disease (PAD) ranges from 3 to 10% in the general population, reaching 15–20% in subjects older than 70 years. PDA affects 27 million people in Europe and the USA. The annual number of cases of critical lower limbs ischemia (CLLI) is from 500 to 1000 new cases per 1 million of the population, with a high level among patients with diabetes.

The aim — to improve the results of treatment of patients with CLLI through the development and implementation of methods of autologous transplantation of multipotent mesenchymal stem stromal cells.

Materials and methods. The study was conducted on the basis of two clinical centers of the Department of Surgery № 4 of O. O. Bogomolets National Medical University — vascular surgery department of Alexandrovskaya clinical hospital and clinic of vascular surgery of the Main military hospital Ministry of Defence of Ukraine and had the following design: 1 period — screening, 2nd period — randomization and distribution of patients by treatment groups, 3rd — treatment, 4th — period of observation (3 years). Sampling of subcutaneous fat, cultivation and transplantation of autologous mesenchymal stem cells according to the method proposed by us were carried out to 41 patients.

Results and discussion. The frequency of preservation of the lower limbs in patients who were injected with adipocyte stem cells (ASC) was statistically significantly higher than in patients who used other types of therapy, and was 82% after three years of follow-up.

Conclusions. Therapeutic mechanism of action of ASC, research on of animal models and in patients, mostly lies in the fact that the growth of blood vessels occurs in ischemic lower limb, possibly, through the interaction of local vascular and inflammatory cells and injected ASC. As a result, patients who received this type of therapy had a smaller percentage of performed amputations than patients who did not receive it.

Key words: critical lower limbs ischemia, peripheral arteries disease, adipocyte stem cells, angiogenesis.