

**М.В. ПЛОТНИКОВ, А.П. КИЯСОВ, С.Д. МАЯНСКАЯ, М.О. МАВЛИКЕЕВ, И.М. ГАЗИЗОВ, А.А. ГУМЕРОВА, В.П. ТАМАКОВА, Г.В. ЧЕРЕПНЕВ, И.И. ШАМСУТДИНОВА**

Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан  
Казанская государственная медицинская академия  
Казанский государственный медицинский университет

УДК 616.13

## Клинический опыт применения клеточной терапии у пациентов с заболеванием периферических артерий

**Плотников Михаил Викторович**

врач отделения сосудистой хирургии № 1

420068, г. Казань, ул. Оренбургский Тракт, д. 138, тел. (843) 268-69-87, e-mail: plotnikov\_mv@bk.ru

*Представлены результаты применения гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) периферической крови у пациентов с заболеванием периферических артерий (ЗПА). Внутримышечная аутотрансплантация ГСК в пораженную конечность выполнена 30 мужчинам с ЗПА. Для объективизации результатов исследования применялось измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), тредмил-тест, время восстановления исходного ЛПИ после нагрузки, иммуногистохимия. Зафиксировано достоверное улучшение функционального состояния конечности после аутотрансплантации по данным ЛПИ и тредмил-теста. По данным иммуногистохимического исследования, отмечено увеличение плотности капиллярной сети, активация пролиферации и дифференцировки миосателлитов.*

**Ключевые слова:** заболевания периферических артерий, ангиогенез, неомиогенез, гемопоэтические стволовые клетки периферической крови, CD34+, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, иммуногистохимия.

**M.V. PLOTNIKOV, A.P. KIASOV, S.D. MAYANSKAYA, M.O. MAVLIKEEV, I.M. GAZIZOV, A.A. GUMEROVA, V.P. TAMAKOVA, G.V. CHEREPNEV, I.I. SHAMSUTDINOVA**

Republican Clinical Hospital of Ministry of Health Care of the Republic of Tatarstan  
Kazan State Medical Academy  
Kazan State Medical University

## Clinical experience application cell therapy in patients with peripheral arterial disease

*The results of application of hematopoietic stem cells (HSCs) in the peripheral blood of patients with peripheral arterial disease (PAD) were presented. Intramuscular autotransplantation of HSCs in the affected limb is made of 30 men with PAD. For the results of the study used objectification measure ankle-brachial index (ABI), treadmill test, the recovery time after the original ABI load, immunohistochemistry. Significant improvement in functional status after autotransplantation limbs according to ABI and treadmill test was registered. According to the immunohistochemical study was an increase in the density of the capillary network, the activation of proliferation and differentiation miosatellits.*

**Keywords:** peripheral arterial disease, angiogenesis, neomyogenesis, hematopoietic peripheral blood stem cells, CD34+, granulocyte colony stimulating factor, immunohistochemistry.

Заболевания периферических артерий (ЗПА) по-прежнему остаются одной из наиболее частых причин снижения качества жизни, инвалидизации и занимают большую долю в структуре смертности [1]. Общая распространенность заболеваний периферических артерий в популяции, по данным различных

исследований, варьирует в пределах 3-10%, увеличиваясь до 15-20% в возрастной группе старше 70 лет [2].

При возникновении поражений дистального артериального русла и микроциркуляторного звена ангиохирургия и фармакотерапия достигли определенного предела возможностей [3].



графию и аортоартериографию. В утвержденный протокол исследования также входили стандартный клинический и биохимический анализ крови, липидограмма и гемостазиограмма.

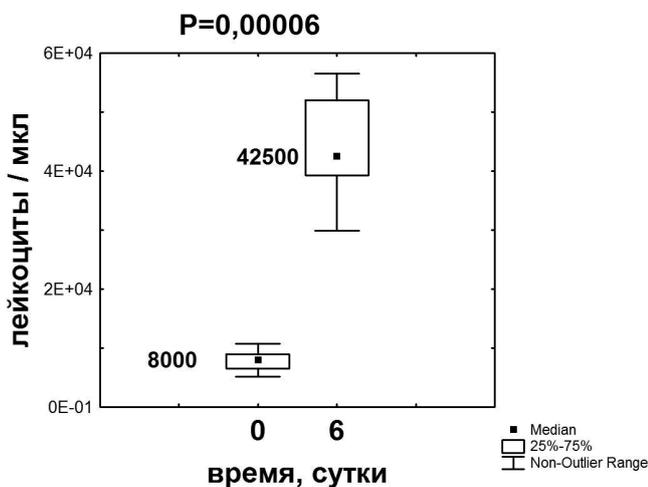
Использовали статистические пакеты *STATGRAPHICS Centurion XVI* и *STATISTICA 6*. Распределение значений переменных проверяли на нормальность в тесте Колмогорова — Смирнова — Лиллиефорса. Достоверность отличий вычисляли в непараметрическом тесте Вилкоксона для двух зависимых переменных (группы до и после аутотрансплантации ГСК). Наличие корреляций между переменными тестировали при помощи регрессионного анализа и коэффициентов Спирмена.

### Результаты

Осложнений при стимуляции и мобилизации аутологичных клеток, заборе биопсии и интрамускулярном введении клеточной суспензии не наблюдали. Нейпоген эффективно активировал лейкопоз (рис. 1). Субъективное улучшение, выражающееся в увеличении дистанции или исчезновении ограничения безболевого ходьбы в привычном для себя темпе, отметили 27 из 30 пациентов. Причем положительный эффект больные начинали ощущать уже через 2-3 недели. Не отметили субъективного улучшения 2 пациента. В одном случае констатировано ухудшение, связанное со стенозированием дистального анастомоза аорто-бедренного шунта, по поводу которого выполнена хирургическая коррекция. Отдаленные результаты изучены на сроке 3, 6 и 12 месяцев.

### Рисунок 1.

Результат стимуляции и мобилизации ГСК в периферическую кровь препаратом рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Нейпоген®) в течение 5 дней в суточной дозе 1 млн ед./кг массы тела



Достоверную положительную динамику на отдаленных сроках исследования продемонстрировали следующие функциональные параметры периферического кровотока:

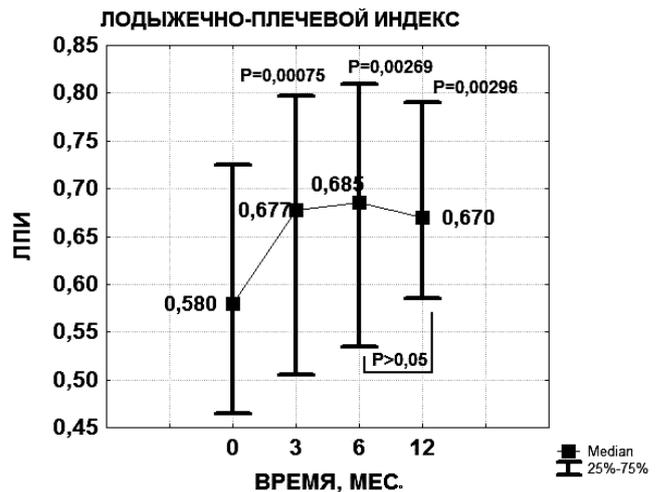
1. ЛПИ: до трансплантации ГСК — 0,58; через 3 мес. — 0,68; через 6 мес. — 0,69; через 12 мес. — 0,67 (рис. 2);

2. дистанция безболевого ходьбы: до трансплантации ГСК — 86 м, через 3 мес. — 124 м, через 6 мес. — 136 м, через 12 мес. — 138 м (рис. 3);

3. время восстановления исходного ЛПИ после дозированной нагрузки: до трансплантации ГСК — 540 сек., через 3 мес. — 470 сек., через 6 мес. — 518 сек., через 12 мес. — 519 сек. (рис. 4).

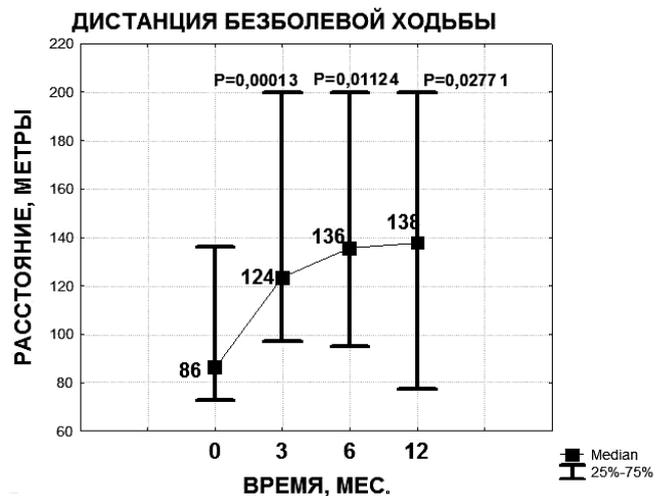
### Рисунок 2.

Динамика изменения лодыжечно-плечевого индекса



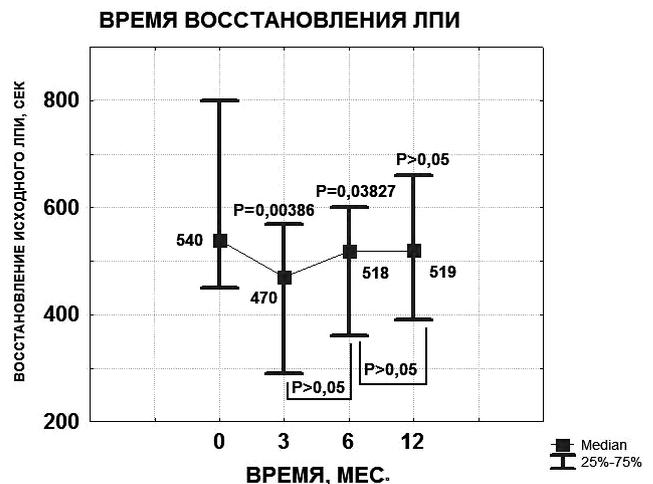
### Рисунок 3.

Динамика изменения дистанции безболевого ходьбы по результатам тредмил-теста



### Рисунок 4.

Динамика изменения времени восстановления лодыжечно-плечевого индекса после нагрузочной ходьбы



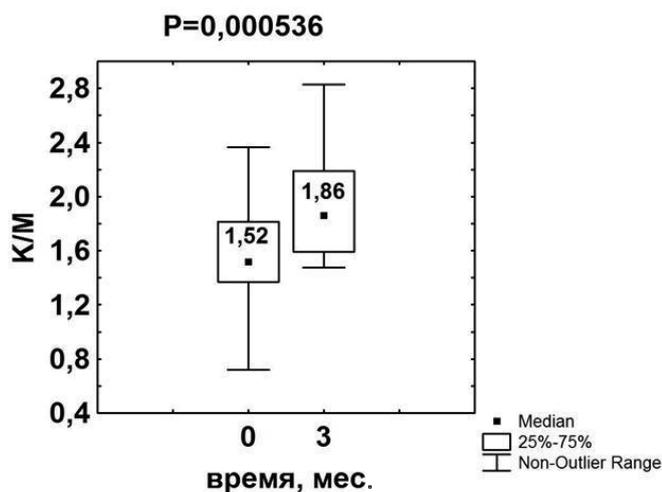
Исследование методом тетраполярной реографии (реографический индекс на голени и стопе) не выявило достоверной динамики значений индекса на всех сроках наблюдения после трансплантации. На контрольных артериографиях отмечено появление коллатеральной сети, отсутствующей на первичных снимках, однако оценить степень их развития не позволяет отсутствие достоверных статистических критериев.

По результатам иммуногистохимического окрашивания на предварительном этапе работы нами был выбран маркер эндотелия, наиболее подходящий для визуализации капилляров на парафиновых срезах мышечной ткани. По данным окрашивания срезов биопсий на эндотелиальные маркеры (CD31, CD34, vWF) было установлено, что экспрессия CD31 и vWF представлена в эндотелии крупных сосудов и отдельных капилляров и, в целом, очень вариабельна. Окрашивание антителами к CD34 было стабильным и позволяло выявить как все капилляры, так и крупные сосуды. Поэтому плотность капиллярной сети оценивали по экспрессии CD34.

Иммуногистохимический анализ биоптатов выявил увеличение плотности капиллярной сети на сроке 3 месяца на 22,4% (индекс К/М — соотношение «капилляры/мышечное волокно» — возрастает после аутопересадки с 1,52 до 1,86;  $p=0,0005$ ) (рис. 5).

При регрессионном анализе переменных обнаружена положительная достоверная корреляция средней силы между числом трансплантированных ГСК и индексом К/М, и получена модель, задаваемая следующим уравнением:  $K/M=1/(2,20363-0,0973314*\ln(\text{ГСК}))$ , (рис. 6).

**Рисунок 5. Соотношение «капилляры/мышечное волокно» до трансплантации и на сроке 3 месяца**

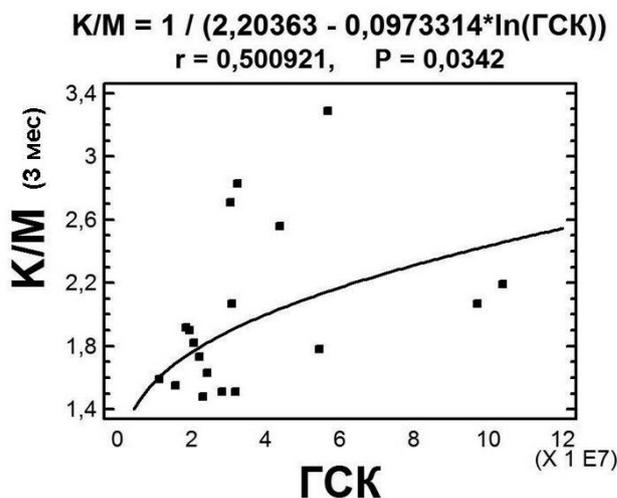


Корреляционный анализ, выполненный методами непараметрической статистики (вычисление коэффициента Спирмена), установил ряд значимых корреляций между переменными (табл. 1).

В биоптатах мышечной ткани, полученных до введения стволовых клеток и окрашенных с антителами к миогенину, мы наблюдали единичные миогенин-позитивные клетки с локализацией, характерной для клеток-сателлитов (под сарколеммой мышечных волокон). Через 3 месяца после проведенной терапии мы обнаружили увеличение числа миогенин-позитивных клеток. Кроме того, мы наблюдали появление клеток с миогенин-позитивными ядрами, слияние миосателлитов с образованием многоядерных мышечных трубочек, формирование

новых мышечных волокон с малым диаметром и центрально расположенным ядром, а иногда и слабо позитивное окрашивание на миогенин.

**Рисунок 6. Статистическая модель зависимости плотности капиллярной сети мышечной ткани от абсолютного числа трансплантированных ГСК**



**Обсуждение**

Первое сообщение о масштабном клиническом исследовании (n=47) стволовых клеток было выполнено Tateishi Yuyama E. и др. в 2002 году [4]. Авторы доказали эффективность трансплантации ядросодержащих клеток костного мозга при ишемии конечности в сравнении с трансплантацией периферической крови и плацебо. При этом положительный эффект сохранялся в течение 24 недель наблюдения.

В настоящее время имеется целый ряд клинических работ, свидетельствующих о положительном эффекте применения стволовых клеток, полученных из различных источников, при ишемии конечностей. Оценка эффективности трансплантации стволовых клеток в ранее выполненных исследованиях выполнялась с помощью стандартных функциональных проб (ЛПИ, транскутанное определение кислорода, тредмил-тест) и по динамике заживления трофических расстройств. Также предпринимались попытки объективизации при помощи ангиографии. Во всех отчетах сообщается о достоверном улучшении показателей, по-видимому, за счет неоангиогенеза.

Несмотря на то, что большинство клинических работ по применению стволовых клеток для стимуляции ангиогенеза были проведены у пациентов с критической ишемией, мы сочли неэтичным включение этой группы больных в наше исследование, учитывая недостаточную доказательную базу, имеющуюся на сегодняшний день. Поэтому апробация метода была проведена на больных, не имеющих показаний к традиционным хирургическим (реконструктивным или органосоносящим) методам лечения (ХАН IIБ степени с отсутствием дистального восприимчивого русла).

В рамках настоящего исследования мы не предусматривали наличие контрольной группы. Прогноз сохранения конечности при ЗПА определяется в целом как благоприятный, однако имеются данные, что прогрессивное снижение ЛПИ составляет в среднем 0,014 в год, уменьшение дистанции безболезной ходьбы — 9,2 ярда (8,41 метра) в год, а кумулятивный 10-летний риск развития ишемических язв и ишемических бо-

лей покоя — у 23 и 30% пациентов соответственно [9]. Компенсация же достигается прежде всего развитием коллатерального кровообращения. Имеются также работы, в которых показаны преимущества клеточной терапии как перед группой с плацебо [4], так и при изолированном введении гранулоцитарного стимулирующего фактора [5].

Необходимо отметить, что наблюдаемый положительный эффект аутотрансплантации ГСК возникает достаточно быстро: объективно он верифицируется через 3 месяца, а субъективное улучшение наступает через 2-3 недели. Это предполагает возможность применения в дальнейшем данного метода лечения у пациентов с критической ишемией.

Имеются экспериментальные работы, в которых наличие неоангиогенеза после введения стволовых клеток доказывалось морфологически, однако в клинических условиях гистохимическая оценка ГСК-стимулированного неоангиогенеза выполнена нами впервые. При этом выявлено увеличение плотности капиллярной сети скелетной мышцы на 22,4% через 3 месяца после интрамускулярного введения ГСК ( $p=0,00054$ ). После аутотрансплантации ГСК величина индекса К/М (зависимая переменная) положительно коррелировала с абсолютным числом ГСК в клеточном трансплантате (независимая переменная). Полученное уравнение регрессии позволяет ориентировочно прогнозировать величину индекса К/М в зависимости от числа трансплантированных ГСК. Из распределения данных на графике (рис. 6) также следует, что для достижения значений  $K/M \geq 2$  в большинстве случаев требуется трансплантация не менее  $3 \times 10^7$  ГСК (минимальное «целевое значение»). Эффективность нейпоген-индуцированной стимуляции лейкопоэза отрицательно коррелирует с исходным временем восстановления ЛПИ, что может подразумевать меньшую эффективность мобилизации ГСК на поздних стадиях ЗПА и заставляет задуматься о показаниях к клеточной терапии на более ранних этапах.

Современные теории описывают три возможных пути участия стволовых клеток в регенерации тканей: прямая дифференцировка в клетки регенерирующей ткани, слияние с клетками-резидентами данной ткани и стимуляция их регенерации путем паракринной секреции ростовых и трофических факторов [6]. Изучение вопроса о механизме влияния трансплантированных СК на процессы неоангиогенеза у человека *in vivo* затрудняет отсутствие методов безопасного мечения клеток, которые позволили бы визуализировать трансплантированные аутологичные клетки в тканях человека.

Интересно, однако, что при трансплантации CD34+ клеток пуповинной крови человека в ишемизированные конечности мышей помимо неоангиогенеза было отмечено также увели-

чение числа регенерирующих мышечных волокон и сделано предположение о миогенной дифференцировке введенных клеток. Для проверки данного предположения нами впервые иммуногистохимическими методами было проведено изучение популяции клеток-сателлитов в биопсийном материале больных ЗПА после трансплантации им аутологичных СК.

Миосателлиты идентифицированы и описаны в 1961 г. Alexander Mauro [7]. Одним из важнейших маркеров миосателлитов является миогенин (myogenin, MYOG, Myf4) — ген и одноименный белок (продукт экспрессии гена), который является фактором транскрипции, индуцирующим выход клеток-сателлитов из клеточного цикла посредством активации ингибиторов онкогенеза p21 и p53. В стадии пролиферации миосателлитов миогенин обнаруживается в цитоплазме, однако на стадии начала слияния миосателлитов наблюдается его присутствие в ядре. Период обнаружения миогенина в ядре совпадает с моментом терминальной дифференцировкой миосателлитов и синтезом белков контрактильного аппарата мышечного волокна (тяжелые цепи миозина, десмин) и дальнейшим образованием мышечных трубочек и юных мышечных волокон. Мыши, дефицитные по миогенину, умирают при рождении из-за дефицита дифференцировки миобластов и практически полного отсутствия мышечных волокон, что доказывает решающую роль данного фактора в миогенезе.

В нашем исследовании мы показали увеличение в результате трансплантации количества клеток с миогенин-позитивной цитоплазмой, что может быть связано с активацией процесса регенерации в мышечной ткани на фоне улучшения кровоснабжения в результате роста капиллярной сети, секреции факторов роста эндотелия, которые могут приводить к пролиферации и активации сателлитов.

Факт усиленной регенерации мышечной ткани подтверждает обнаружение клеток-сателлитов с миогенин-позитивным ядром, что является признаком поздней стадии дифференцировки миосателлитов. Как выявлено в нашем исследовании, данные клетки в дальнейшем сливаются с образованием многоядерных мышечных трубочек и формируют юные мышечные волокна с характерной для них морфологией.

Таким образом, в нашем исследовании мы подтвердили гипотезу об активации пролиферации и дифференцировки миосателлитов на фоне увеличения плотности капиллярной сети. Данные факты могут служить основой для нового направления в лечении заболеваний мышц — терапии, направленной на коррекцию микроокружения клеток-сателлитов. При этом возможна как прямая дифференцировка введенных ГСК в миосателлиты и зрелые мышечные волокна, так и стимуляция регенерации мышечных волокон реципиента под влиянием ростовых факторов, секретируемых ГСК.

Аутотрансплантация ГСК периферической крови приводит к улучшению васкуляризации ишемизированной конечности через стимуляцию развития микроциркуляторного русла. Указанные изменения происходят, по-видимому, за счет дифференцировки трансплантированных ГСК в эндотелиоциты. Также нельзя исключить возможность продукции введенными ГСК ангиогенных факторов (кислый и щелочной факторы роста фибробластов aFGF и bFGF, эндотелиальный фактор роста сосудов VEGF, ангиопоэтин-1), стимулирующих рост капилляров.

В настоящее время имеется несколько методик клеточной терапии при ЗПА. Различие заключается прежде всего в источнике получения трансплантационного материала. Чаще всего используется костный мозг (КМ). Основным недостатком этого метода является инвазивная процедура — трепанация губчатой кости с возникающими рисками контаминации и анестезиологического пособия. Получаемый пунктат отличается

**Таблица 1.**  
**Результаты непараметрического**  
**корреляционного анализа**

Переменные	Коэффициент Спирмена	p
$K/M_{(3 \text{ мес})}$ vs $GSK_{(абс. \text{ число в трансплантате})}$	0,524523	0,025434
$ЛПИ_{(3 \text{ мес})}$ vs время восстановления $_{(3 \text{ мес})}$	-0,518615	0,009419
Лейкоцитарный индекс стимуляции $_{(0 \text{ мес})}^*$ vs время восстановления $_{(0 \text{ мес})}$	-0,484758	0,030294

\* отношение числа лейкоцитов/мкл крови после курса нейпогена к исходному уровню



большой гетерогенностью клеточного материала, а его количество ограничено. Примененная нами технология стимуляции и мобилизации ГСК в периферическую кровь с последующей процедурой лейкафереза, несмотря на недостатки, связанные с некоторым удорожанием методики (в связи с необходимостью использования G-CSF), позволяет получить более однородный клеточный состав аутотрансплантата, причем в достаточно большом количестве. В исследованиях авторов, использующих в качестве источника трансплантационного материала КМ, количество имплантируемых мононуклеаров составляло не более  $4,6 \times 10^9$  [4]. В нашем исследовании полученный при 3-часовом сеансе лейкафереза клеточный материал делился на две равные порции, одну из которых имплантировали ( $6,87 \times 10^9 \pm 0,39 \times 10^9$  мононуклеаров,  $M \pm m$ ), а другую подвергали криоконсервации. В последующем этот материал может быть использован для введения в гомо— или контралатеральную конечность. Кроме того, дальнейшее изучение клеточных технологий, а также появление правовой базы, делает возможным создание «банка стволовых клеток» не только для аутологичной, но и для аллотрансплантации.

Предполагается, что общее количество ГСК и их способность к дифференцировке снижается с возрастом [8]. В связи с этим возрастной предел для пациентов, включенных в исследование, составил 60 лет. Однако, нами не было выявлено корреляции между возрастом, процентным содержанием и абсолютным числом ГСК в трансплантате, что позволяет увеличить возрастной ценз при отборе пациентов.

#### Заключение

Аутотрансплантация ГСК периферической крови приводит к улучшению васкуляризации ишемизированной конечности путем стимуляции развития микроциркуляторного русла, вероятно, за счет прямой дифференцировки ГСК в эндотелиоциты, слияния этих клеток с эндотелиоцитами, а также стимуляции роста капилляров секретлируемыми паракринными факторами.

Увеличение плотности капиллярной сети приводит к активации пролиферации и дифференцировки миосателлитов, их слиянию с образованием мышечных трубочек и юных мышечных волокон. Можно предположить, что введенные ГСК могут дифференцироваться в миосателлиты, нельзя исключить также их слияния со зрелыми поврежденными мышечными

волокнами реципиента или паракринного стимулирующего влияния. В совокупности неоангиогенез и происходящая на его фоне регенерация мышечных волокон с участием активированных миосателлитов приводят к улучшению клинических показателей.

Предложенная методика стимуляции ангиогенеза посредством имплантации ГСК, выделенных из периферической крови, является безопасной и эффективной для лечения дистальных форм заболеваний периферических артерий при хронической артериальной недостаточности II Б степени. Полученные результаты позволяют рекомендовать расширение показаний к ее применению за счет больных с критической ишемией.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. М.: Медицина. 1997; 160 с.
2. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation*. 2004; 10; 110 (6): 738-43.
3. Adam DJ, Beard JD, Cleveland T, et al. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2005; 366: 1925-1934.
4. Хорев Н.Г., Елыкомов В.А., Залозный Д.А. Терапевтический клеточный ангиогенез в лечении заболеваний периферических артерий. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2011; 17(2): 36-44.
5. Niels van Royen, PhD; Stephan H. Schirmer, Bektas Atasever et al. START Trial: A Pilot Study on STimulation of ARTeriogenesis Using Subcutaneous Application of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor as a New Treatment for Peripheral Vascular Disease. *Circulation*. 2005; 112: 1040-1046.
6. Gardner R. Stem cells and regenerative medicine: Principles, prospects and problems. *C. R. Biol*. 2007; 330: 465-473.
7. Mauro A. Satellite cells of skeletal muscle fibres. *J. Biophys. Biochem. Cytol*. 1961; 9: 493-495.
8. Поспелов А.Л. Способность гемопоэтических клеток костного мозга к ангиогенезу утрачивается с возрастом. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2006; 3 (5): 11.
9. Rainier Aquino, Christopher Johnnides, Michel Makaroun, Jeffrey C. Whittle et al. Natural history of claudication: Long-term serial follow-up study of 1244 claudicants *J Vasc Surg* 2001; 34: 962-70.