

Аутогенная трансплантация клеток при ишемии нижних конечностей в клинике

Бересенев А.В.

Идея клеточной трансплантации для лечения ишемии нижних конечностей (ИНК) (прежде всего – атеросклеротического и диабетического генеза) успешно реализуется последние 5 лет – в эксперименте и 2 года – в клинике. Это стало возможным, благодаря интенсивному изучению клеточных механизмов ангиогенеза и выделению клеток-предшественников сосудистого эндотелия и ангиобластов.

В эксперименте на модели локальной ишемии конечности (лигирование ветвей бедренной артерии) было предложено использовать различные клетки-кандидаты для неоангиогенеза в ишемизированной зоне – мононуклеары костного мозга [1] и периферической крови [3], тромбоциты периферической крови совместно с мононуклеарами [3], эндотелиальные прогениторные клетки, мобилизованные в периферический кровоток [4], гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) (CD34+ [5] и CD133+ [6]) эндотелиальные прогениторы [8] пуповинной крови человека, стромальные клетки костного мозга [7] и «костномозговые фибробласты» [1] после культивирования. Был показан ангиогенетический эффект мононуклеарных клеток костного мозга и на модели периферической диабетической ангиопатии [9]. Почти во всех исследованиях производилась множественная внутримышечная трансплантация клеток. Однако недавно было показано, что однократное внутриартериальное введение клеток по эффективности сравнимо с внутримышечной трансплантацией [10].

Богатая экспериментальная база позволила перейти к клиническим испытаниям метода. Всего было опубликовано 7 клинических исследований, подробнее остановимся лишь на самых значительных.

В 2002 году появилось пилотное исследование, опубликованное в *Lancet*. Это исследование [12] отличается своей масштабностью. Все пациенты были разделены на 2 группы: первая – с унилатеральной ишемией ($n=25$), получила трансплантацию мононуклеарных клеток костного мозга – с одной стороны и физраствора – с другой (контроль 1), вторая – билатеральная ишемия ($n=22$), получала трансплантацию мононуклеарных клеток костного мозга – с одной стороны и периферической крови (без цитокиновой мобилизации – контроль 2) – с другой. Аутогенные клетки выделяли из аспиратов костного мозга (объем 500 мл) и через 3 часа вводили в ишемизированные мышцы (общий объем суспензии 30 мл х 40 инъекций). Среднее количество вводимых клеток – 1–2 миллиарда. Время динамического наблюдения – 24 недели после трансплантации. 2 пациента в группе 1 умерли от инфаркта миокарда в течение 2 лет (один до трансплантации, второй через 3,2 месяца после, и были исключены из наблюдения), а два пациента из группы 2 отметили ухудшение состояния до 4 недель после трансплантации. Основные критерии оценки эффективности терапии – перфузионный индекс, чрескожное давление кислорода и боли в состоянии покоя. Инструментальные показатели улучшились в той или иной степени у всех пациентов, получавших трансплантацию клеток костного мозга, в отличие от «контрольных конечностей», где сохранялись исходные цифры. Боли в покое уменьшились у 80% пациентов после трансплантации клеток костного мозга и остались у 85% пациентов после трансплантации клеток крови. Ангиографически отмечали развитие коллатераль-

ного кровообращения в 27 конечностях из 45 после трансплантации клеток костного мозга. Эти результаты сохранялись и при длительном наблюдении в течение 24 недель. В биопсийном материале умершего от инфаркта пациента было выявлено, что введенные клетки активно пролиферируют (по маркеру Ki-67) и образуют новые сосуды и эндотелий (по маркеру CD-31), чего не наблюдалось на контрольной стороне [12]. Аналогичное (по методике) исследование было опубликовано и в *Cell Transplantation* группой K. Esato, но выполненное уже на пациентах ($n=8$) с хроническими заболеваниями периферических артерий, сопровождающимися трофическими расстройствами в виде язв [16].

Недавно было описано клиническое наблюдение эффективного лечения 78-летнего пациента с тяжелым облитерирующим атеросклерозом, сопровождающимся полной окклюзией артерий голени. Аутогенная трансплантация мононуклеаров костного мозга привела к мощному развитию коллатерального кровообращения (наблюдение через месяц), что позволило избежать ампутации конечности [18].

Более детальное изучение возможного механизма действия клеток, изложено в работе японских ученых, опубликованной в *Circulation* [13]. Ими изучалась функция эндотелия под влиянием клеточной трансплантации у больных с ИНК. Дисфункция эндотелия является основным звеном патогенеза (возникновения и прогресса) системного атеросклероза вообще и локальных ишемий в частности.

В исследование было включено 7 человек с болями в ногах в покое и незаживающими язвами. При отборе исключались пациенты с сахарным диабетом, злокачественными новообразованиями и ИБС. Костный мозг забирали из костей таза в объеме около 500 мл, затем аппаратно выделяли из него ядросодержащую фракцию клеток. Клетки вводили непосредственно в бедренные артерии через катетер. Среднее количество клеток – 1,6 миллиардов, из них CD34(+)-клеток было только ~ 2,5% (~ 38 миллионов). Изучалось влияние клеточной трансплантации на функцию эндотелия и кровотока в ишемизированной области. Кровоток измеряли ангиографически на фоне приема ацетилхолина (в качестве эндотелий-зависимого вазодилатора) и нитропруссиды натрия (эндотелий-независимый вазодилатор) до и после введения клеток.

Трансплантация клеток улучшала различные показатели кровотока в ишемизированной конечности, удлиняла время безболевого периода при ходьбе, способствовала ускорению заживления язв. Кровоток усилился после трансплантации клеток на фоне ацетилхолина, но не изменился на фоне нитропруссиды натрия.

Таким образом, улучшение кровотока в ишемизированной конечности при трансплантации аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга объясняется усилением эндотелий-зависимой вазодилатации. Мононуклеары периферической крови – следующий наиболее часто применяемый клеточный материал для терапии ишемии нижних конечностей. Группа Ikeda U. [17] провела сравнительное исследование эффективности трансплантации ядросодержащей фракции костного мозга и периферической крови (без цитокиновой мобилизации) на 5 пациентах с заболеваниями периферических артерий. Оказалось, что клетки

крови по эффективности могут быть сравнимы с костным мозгом. Казалось бы, эти данные идут вразрез с результатами пилотного исследования [12]. Но в данном случае исследователи добивались секреции фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) после суточной инкубации клеток крови и производили совместную трансплантацию двух видов клеток. Уровень этого фактора повышался в сыворотке крови после такой «двойной» трансплантации, чего не наблюдалось после введения только ядросодержащих клеток костного мозга [17].

Китайские исследователи предприняли попытку аутологичной трансплантации ГСК методом мобилизации их из костного мозга в периферическую кровь [14]. Теоретической предпосылкой явилось недавнее исследование на кроликах [11], где была показана возможность резэндотелизации повреждённых сосудов методом мобилизации эндотелиальных прогениторов введением рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора [11].

Итак, в «китайском исследовании» приняли участие 5 человек, страдающих облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей III и IV степени (хронической ишемии) и получавших до этого стандартную терапию (включая уро-

киназу и простагландин E1). Все пациенты имели трофические нарушения в виде язв и начинающейся гангрены пальцев стоп. Для мобилизации ГСК применяли гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) по пятидневной схеме. На 5-е сутки забирали кровь и выделяли мононуклеарную фракцию, обогащённую CD34+ клетками (0.12%). Цитокиновая мобилизация позволила увеличить количество CD34+ клеток в «периферии» в среднем в 100 раз. Клетки вводили в ишемизированные мышцы ~ 30 инъекциями на глубину 1–1,5 см через 3 часа после выделения. Инъекции повторяли через 40 дней.

Время динамического наблюдения за пациентами – 12 недель после процедуры. Наблюдалось уменьшение или исчезновение боли, повышение кожной температуры, стимуляция заживления язв и постепенное исчезновение гангрены пальцев. Инструментально было показано улучшение показателей перфузии конечностей – кровотока по доплеру, перфузионный индекс и давление кислорода. Не было выявлено объективных признаков улучшения кровотока только у одного пациента, из-за имеющейся гангрены. Причём этот эффект (по инструментальным показателям) сохранялся и спустя 3 месяца после трансплантации. Побочных эффектов и осложнений не наблюдалось [14].

Некоторые данные по клеточной аутоотрансплантации при ИНК в клинике.

Авторы	Количество пациентов	Патология	Вид клеток	Результаты
Tateishi-Yuyama E. et al., 2002 [12]	43	Атеросклероз	Ядросодержащие клетки костного мозга	Уменьшение болей в покое (80%), развитие коллатерального кровообращения (ангиографически) (60%), улучшение индекса перфузии и давления кислорода в 1,5-2р. (100%), заживление язв; усиление болей (ухудшение)- у двух пациентов
Esato K. et al., 2002 [16]	8	Хронические заболевания периферических артерий	Ядросодержащие клетки костного мозга	Субъективное улучшение у 7 из 8 пациентов, заживление язв у 2 из 3 пациентов
Matsui K. et al., 2003 [17]	5	Хронические заболевания периферических артерий	Ядросодержащие клетки костного мозга и периферической крови	Улучшение индекса перфузии и давления кислорода – у всех
Kudo F.A. et al., 2003 [19]	2	Атеросклероз, диабетическая стопа (ангиопатия)	Ядросодержащие клетки периферической крови, обогащённые фракцией CD34+ клеток после цитокиновой мобилизации	Уменьшение болевого синдрома, улучшение индекса перфузии, давление кислорода – без динамики, развитие коллатералей (ангиографически)
Higashi Y. et al., 2004 [13]	7	Хронические заболевания периферических артерий	Ядросодержащие клетки костного мозга	Увеличение времени ходьбы без боли, улучшение индекса перфузии и давления кислорода, ангиографических показателей
Huang P.P. et al., 2004 [14]	5	Атеросклероз	Ядросодержащие клетки периферической крови, обогащённые фракцией CD34+ клеток после цитокиновой мобилизации	Уменьшение или исчезновение болей – у всех, улучшение перфузионного индекса и давления кислорода – у 4-х из 5 пациентов
Teiji O., 2004 [15]	8	Атеросклероз, болезнь Бюргера	Ядросодержащие клетки костного мозга	Быстрое заживление язв на 4-х из 9 конечностей, улучшение ангиографических показателей в 7 конечностях из 9

Аналогичное, но более раннее исследование было выполнено японскими авторами на двух пациентах в прошлом году [19]. Результаты – аналогичные. Общее количество вводимых CD34+ клеток (после мобилизации) составило около 100 000 – 160 000.

В последнем исследовании показана так же эффективность аутотрансплантации клеток костного мозга у 6 пациентов с болезнью Бюргера [15].

Таким образом, за последние 2 года были получены первые клинические данные, демонстрирующие безопасность и эффективность метода клеточной трансплантации для лечения больных с ИНК (табл.). Эти данные позволяют продолжить исследования в этом направлении. Но перехо-

дить к более масштабным клиническим испытаниям ещё рано. Хотя и выработана оптимальная и универсальная схема внутримышечной трансплантации клеток (в 6 исследованиях из 7), но не решён вопрос об оптимальном виде клеточного материала. Думаю, что более эффективна была бы трансплантация эндотелиальных прогениторных клеток (EPC) (источником которых могут быть костный мозг, периферическая кровь после цитокиновой мобилизации и пуповинная кровь) в сочетании с применением ангиогенных факторов роста (например, VEGF). Стоит попробовать и сочетанную методику введения клеток – внутриаартериально (в бедренную артерию и/или её ветви), внутримышечно и местно (на язвенный дефект).

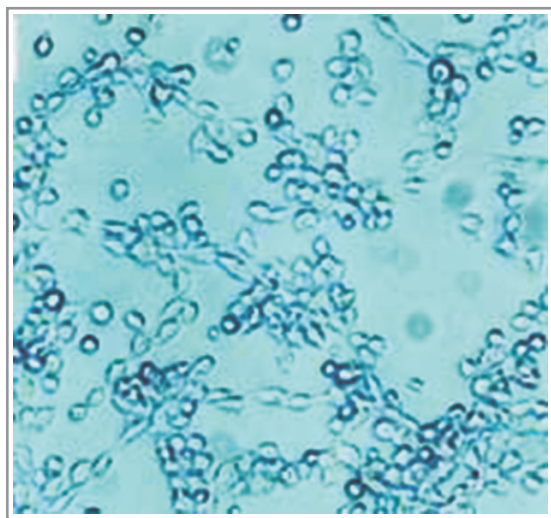


Рис. 1. Эндотелиальные прогениторные клетки костного мозга кролика в культуре. (Circ 2001; 103: 899).

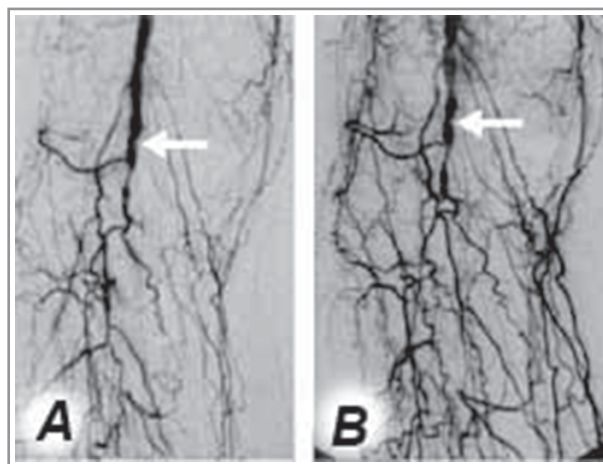


Рис. 3. Ангиограммы сегмента нижней конечности до трансплантационного лечения (А) и через 24 недели после трансплантации клеток костного мозга (В).

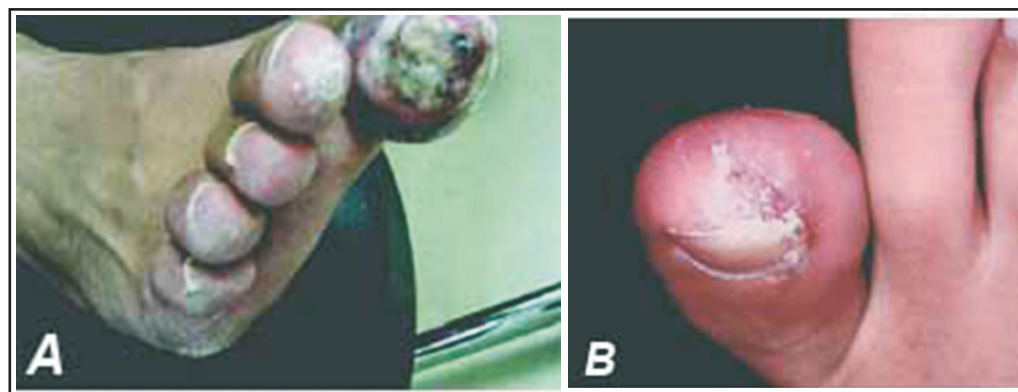


Рис. 2. Внешний вид первого пальца стопы до аутогенной трансплантации клеток костного мозга (А) и после клеточной трансплантации (В).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Shintani S. et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circ* 2001; 103: 897-5.
2. Ikenaga S. et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res* 2001; 96: 277-83.
3. Iba O. et al. Angiogenesis is by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circ* 2002; 106: 2019-25.
4. Asahara T. et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18: 3964-72.
5. Pesce M. et al. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res* 2003; 93: e51.
6. Yang C. et al. Transplantation of cord blood endothelial progenitor cells ameliorates limb ischemia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003; 83(16): 1437-41.
7. Al-Khaldi A. et al. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* 2003; 75(1): 204-9.
8. Murohara T. et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; 105: 1527-36.
9. Hirata K. et al. Autologous bone marrow cell implantation as therapeutic angiogenesis for ischemic hindlimb in diabetic rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(1): H66-70.
10. Yoshida M. Intra-arterial bone marrow cell transplantation induces angiogenesis in rat hindlimb ischemia. *Eur Surg Res* 2003; 35: 86-91.
11. Cho H.-J. et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circ* 2003; 108: 2918.
12. Tateishi-Yuyama E. et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-35.
13. Higashi Y. et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circ* 2004; 109: 1215-8.
14. Huang P.P. et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Thromb Haemost* 2004; 91: 606-9.
15. Teiji O. Treatment for limb ulcer with severe ischemia: therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone-marrow. *Wound Repair Regen.* 2004; 12(1): A5.
16. Esato K. et al. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 2002; 11(8): 747-752.
17. Matsui K. et al. Therapeutic angiogenesis by transplantation of autologous bone marrow and peripheral blood mononuclear cells in patients with peripheral arterial disease. *Int J Angiol* 2003; 12(3): 155-61.
18. Hasebe H. et al. Therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone-marrow cells in a patient with progressive limb ischemia due to arteriosclerosis obliterans: a case report. *J Cardiol* 2004; 43(4): 179-83.
19. Kudo F.A. et al. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34+) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Int Angiol* 2003; 22: 344-8.
20. Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia using autologous bone marrow cell transplantation. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 2003; 92(5): 877-83.