

была нормальной. Количество вводимых клеток 10 000/кг веса реципиента. Трансплантацию почки выполняли через неделю после трансфузии клеток, совместимость органа 6/6 HLA.

Благодаря такому подходу авторам удалось добиться увеличения химеризма периферической крови с 1% (после стандартных протоколов индукции) до 8% (после трансфузии ЭСК). Уровень химеризма крови исследовали методом идентификации X-хромосомы (FISH). Через 100 дней после трансплантации донорский химеризм поддерживался на уровне 4%. Это позволило авторам полностью отказаться от иммуносупрессии после пересадки органа. Исследователи заключают, что используемый протокол безопасен в течение всего времени наблюдения (100 дней). Признаки острого канальцевого некроза аллотрансплантата были незначительными, функции печени и донорской почки оставались нормальными, признаков реакции «трансплантат против хозяина» не отмечали.

Впервые представленное клиническое наблюдение введения аллогенных ЭСК вызывает много вопросов. Первое, что вызывает опасения — потенциально высокий риск туморогенеза при использовании приведённого протокола выделения и трансплантации ЭСК. Так, исследователи указывают, что в клеточном трансплантате присутствовали клетки, несущие маркеры плюрипотентности — истинные

ЭСК. В этом плане было бы интересно узнать дальнейшую судьбу пациента и долгосрочный результат наблюдения. Вызывает сомнения протокол стимуляции гемопоэтической дифференцировки ЭСК, поскольку были использованы нефракционированные клетки костного мозга как индуктор, но не чистая стромальная фракция. Это могло привести к контаминации ЭСК–трансплантата гемопоэтическими CD34⁺ и зрелыми иммунными клетками из костного мозга. Кроме того, в краткосрочной культуре (2 дня) не применялось никаких гемопоэтических цитокинов. Авторы указывают, что не наблюдали никаких иммунологических нарушений, хотя клетки были аллогенными. С другой стороны, совместимость донора и реципиента по HLA была полной — 6/6.

Тем не менее, основной результат, по мнению авторов заключается в достижении индукции толерантности и значительном увеличении химеризма именно благодаря введению ЭСК. Наблюдение уровня химеризма около 5% в течение 100 дней после трансплантации органа позволяет сделать положительный прогноз по индукции толерантности и ведению пациента без иммуносупрессии [1–3]. В данном наблюдении донорский химеризм поддерживался на уровне 4% через 100 дней, однако пациент восстановил функцию пересаженной почки и не принимал иммуносупрессантов. И самое важное, что используемый протокол был признан полностью безопасным в течение всего времени наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Trivedi H.L., Shah V.R., Vanikar A.V. et al. High dose allogeneic PBSC infusion—a strategy to induce allograft hypo-responsiveness in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr. Transplant.* 2002; 6: 63–8.
2. Trivedi H.L., Shah V.R., Shah P.R. et al. Mega dose unfractionated donor bone

marrow derived cell infusion in thymus and periphery – an integrated clinical approach for tolerance in live related renal allograft. *Transplant. Proc.* 2001; 33(1–2): 71–6.

3. Trivedi H.L., Vanikar A.V., Modi P.R. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, mixed chimerism and tolerance living-related donor renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* 2005; 37(2): 737–42.

Подготовил А.В. Берсенёв

По материалам: *Transplant. Proc.* 2006; 38(9): 3103–8

Лечение ишемии нижних конечностей методом трансплантации мобилизованных стволовых клеток периферической крови — результаты клинических испытаний в Японии

Ишемия нижних конечностей (ИНК) различного генеза является распространённым сосудистым заболеванием, которое может приводить к развитию гангрены, а в 20–30% случаев требует ампутации [1]. Эффективность традиционных методов лечения (простагландиновая терапия, шунтирование) зависит от сложности заболевания и сопутствующих факторов риска, среди которых распространены сахарный диабет и длительная история гемодиализа [2, 3].

Клеточная трансплантация может быть эффективным методом лечения ИНК, приводящим к восстановлению кровоснабжения мышц [4]. Разными клиническими группами используются различные виды и источники клеток, методики их получения и введения. Различаются также критерии отбора пациентов и масштабность испытаний [4].

Японские исследователи Kawamura A. et al. недавно опубликовали результаты своей пятилетней работы, в которой

показана эффективность лечения ИНК путем трансплантации аутогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), мобилизованных в периферическую кровь. Работа является масштабным продолжением предыдущих исследований, в которых для лечения ишемии конечностей применяли трансплантацию мобилизованных стволовых клеток периферической крови СК ПК [5, 6].

В исследование было включено 92 пациента с разной степенью тяжести заболевания, подписавших информированное согласие на лечение. 68 пациентов имели многолетнюю историю прохождения гемодиализа по поводу почечной недостаточности. В отличие от предыдущих исследований, где сахарный диабет был исключающим критерием [10], в это испытание вошли 62 пациента с многолетней историей диабета 2-го типа. Средний период наблюдения после лечения составил 9,3 месяца.

ГСК мобилизовали из костного мозга с введением гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ). Аферезный продукт содержал в среднем 40 миллионов CD34⁺ клеток. Без проведения дополнительной очистки суспензию мононуклеаров разделяли на аликвоты по 0,5–1 мл и вводили в ишемические мышцы в 50–70 точек. Побочных эффектов во время и после процедуры не наблюдали.

Через месяц после введения субъективные ощущения улучшились в 86% случаев. На термографе наблюдали нормальную температуру конечностей в 83% случаев, в отличие от исходных 30%. В 3D-СТ стали видимыми артерии, которые до того практически не было видно (улучшение 82%). Авторы указывают, что в клеточная терапия позволила сохранить от ампутации 91% конечностей без признаков некроза.

У некоторых пациентов (в основном с признаками некроза до трансплантации и при IV стадии болезни) ампутаций пальцев избежать не удалось. При патоморфологическом исследовании удалённых тканей уже через 1–1,5 мес. после трансплантации обнаруживали признаки неоваскуляризации – формирование капилляров в мышцах, в которые осуществляли инъекции. Кроме того, авторы показали скопление CD34⁺ клеток в этих областях.

Ученые приходят к выводу, что метод особенно эффективен у пациентов, анамнез которых не отягощён историей прохождения гемодиализа или сахарным диабетом. Пациентам с диабетом 2 типа и с историей гемодиализа трансплантация показана при 1–3 степени тяжести заболевания, а при четвертой – малоэффективна.

Следует отметить, что механизмы, обуславливающие терапевтический эффект такой клеточной терапии, малоизучены, что ещё раз подтверждает данная работа. Считается, что главную роль в терапевтическом ангиогенезе, который и является целью трансплантации, играют эндотелиальные клетки-предшественники (EPC), экспрессирующие CD34, VEGFR-2 и vascular endothelial cadherin, значение которых было впервые описано Asahara et al. [7]. Позже было показано, что из периферической крови и из костного мозга можно выделять специфическую популяцию ангиогенных клеток

по экспрессии Flk-1 и AC-133 [8] и CD34 и KDR [9] соответственно. В самой ишемической мышце EPC могут способствовать ангиогенезу двумя путями: непосредственно дифференцироваться в эндотелиальные клетки и/или выделять ангиопоэтические факторы [1]. Теоретически, суспензия клеток, вводимая пациентам в этом исследовании должна содержать EPC, однако эта популяция не была охарактеризована фенотипически. Тем не менее, авторы изучали изменение уровня сывороточного VEGF после трансплантации. У четырех случайно выбранных пациентов наблюдали повышение его уровня на 176%.

Представленный отчёт о клиническом исследовании очень важен для методологического и клинического понимания внедрения метода клеточной аутотрансплантации при хронической ишемии нижних конечностей. Авторы описывают сравнительно простую, безболезненную, быструю (вся процедура вместе с введением занимает около 4 часов) и эффективную методику лечения ХИНК. Интересно, что исследователи указывают на преимущества афереза на аппарате Cobe Spectra (Gambro) перед CS-3000 (Baxter Healthcare) в связи с меньшей контаминацией суспензии эритроцитами. Безусловным преимуществом работы является более значительное количество пациентов, вовлечённых в исследование и более продолжительное время их наблюдения в посттрансплантационном периоде. Кроме того, авторы показали, что метод может быть эффективен и у пациентов с ранними стадиями ХИНК (1–3 по Fontaine), отягощённой наличием сахарного диабета и историей гемодиализа в связи с почечной недостаточностью. Методики, связанные с пересадкой мононуклеарных клеток, обогащённых мобилизированной CD34⁺ фракцией, при равной клинической эффективности имеют безусловное преимущество перед получением и манипуляциями с костным мозгом для этих же целей [4], поскольку позволяют избежать наркоза и ряда осложнений, связанных с процедурой. Авторы работы рекомендуют метод для финальной стадии мультицентровых клинических испытаний и внедрение его в широкую клинику у пациентов с начальными стадиями ХИНК.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ho T.K., Rajkumar V., Black D.C. et al. Critical Limb Ischemia Classification and Therapeutic Angiogenesis. *International J. Angiology* 2005; 14: 49–59.
2. Andreev A., Petkov D., Kavrakov T. An Amputation Alternative for Patients with Critical Limb Ischemia. *International J. Angiology* 2002; 11: 63–6.
3. O'Hare A.M., Hsu C.Y., Bacchetti P., Johansen K.L. Peripheral vascular disease risk factors among patients undergoing hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002; 13: 497–503.
4. Берсенёв А.В. Клеточная аутологичная трансплантация при ишемии нижних конечностей в клинике. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2005; 1: 40–3.
5. Kudo F.A., Nishibe T., Nishibe M., Yasuda K. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34⁺) for therapeutic angiogenesis

in patients with critical limb ischemia. *Int. Angiol.* 2003; 22: 344–48.

6. Huang P.P., Li S.Z., Han M.Z. 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.
7. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–7.
8. Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D. et al. Expression of VEGFR-2 and AC-133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952–8.
9. Pelosi E., Valtieri M., Coppola S. et al. Identification of the haemangioblast in postnatal life. *Blood* 2002; 100: 3203–8.
10. Higashi Y., Kimura M., Hara K. et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circ.* 2004; 109: 1215–8.

Подготовил О. Дорошенко
По материалам: *J. Artif. Organs* 2006; 9: 226–33