

## Результаты рандомизированного двойного слепого плацебо контролируемого исследования эффективности лечения аутогенными прогениторными клетками костного мозга больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей

Е.А. Корымасов<sup>1</sup>, О.В. Тюмина<sup>3</sup>, А.В. Казанцев<sup>2</sup>, В.А. Россиев<sup>2</sup>, А.М. Аюпов<sup>2</sup>, Г.В. Михеев<sup>2</sup>, С.Е. Волчков<sup>3</sup>, А.Н. Тороповский<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Росздрава»

<sup>2</sup> ГУЗ СО «Самарская областная клиническая больница им. М.И. Калинина»

<sup>3</sup> ГУЗ СО «Клинический центр клеточных технологий», Самара

### Results of randomized double blind placebo-controlled research of treatment efficiency for patients with lower limb arteriosclerosis obliterans by autologous transplantation of bone marrow progenitor cells

E.A. Korymasov<sup>1</sup>, O.V. Tyumina<sup>3</sup>, A.V. Kazantsev<sup>2</sup>, V.A. Rossiev<sup>2</sup>, A.M. Ayupov<sup>2</sup>, G.V. Mischeev<sup>2</sup>, S.E. Volchkov<sup>3</sup>, A.N. Toropovskiy<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Samara State Medical University, Samara

<sup>2</sup> Clinical Center of Cells Technologies, Samara

<sup>3</sup> Samara Regional Hospital, Samara

Представлены результаты рандомизированного, двойного слепого, плацебо-контролируемого исследования применения аутогенных прогениторных клеток костного мозга у 42 больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей. Из костного мозга получали лейкоцитарную фракцию и методом иммуномагнитной сепарации CD133<sup>+</sup> клетки. Пациенты распределены в 3 группы по 14 человек: пациентам в I группе вводились аутогенные прогениторные клетки CD133<sup>+</sup>; пациентам II группы – лейкоцитарная фракция клеток костного мозга (TNC); пациентам III группы (плацебо) – физиологический раствор. Клеточный препарат вводили в мышцы голени. Оценка клинических исходов по шкале J. Rutherford (1997) показала, что в I и II группах пациентов, получивших клеточный материал, наблюдается статистически значимое улучшение клинического состояния по сравнению с группой плацебо ( $p < 0,001$ ). Предложенный способ лечения безопасен и эффективен у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей. Необходимо проведение мультицентровых клинических испытаний и внедрение в клиническую практику.

**Ключевые слова:** облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, прогениторные клетки костного мозга, предшественники эндотелиоцитов, клинические исследования.

### Введение

Число больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей неуклонно растет и составляет более 20–25% от всех видов сердечно-сосудистой патологии [1, 2]. При сохранении данной тенденции к 2020 г. доля ампутаций, выполненных в связи с заболеваниями сосудов, может составить 45% [1]. Улучшить гемодинамику в конечности хирургическим путем возможно у 40–70% больных даже при распространенном и множественном поражении артерий. Однако результаты операций не всегда являются удовлетворительными [3]. Наиболее актуальной является проблема оказания ангиохирургической помощи больным с дистальными формами артериальных окклюзий, в связи с затруднением или невозможностью выполнения реконструктивных вмешательств. В этих случаях выполняются

Results of randomized, double blind, placebo controlled research of bone marrow autologous progenitor cells application at 42 patients with limb obliterating atherosclerosis are presented. Leukocyte fraction was received from bone marrow and CD133<sup>+</sup> cells were isolated by magnetic separation. Patients were distributed in 3 equal groups: in the 1st group autologous progenitor CD133<sup>+</sup> cells, in the 2nd leukocyte fraction of bone marrow (TNC) were injected; patients in the 3rd group (placebo) received saline. Received preparation was injected into shin muscles. An estimation of clinical outcomes on scale J. Rutherford et al. (1997) has shown that in the 1st and 2nd groups of the patients who have received a cellular material, statistically significant improvement of a clinical condition in comparison with placebo group ( $p < 0,005$ , Mann-Whitney) is observed. The offered method of treatment is safe and effective at patients with a limb obliterating atherosclerosis. It is necessary to carry out multicenter clinical trials and to adopt new method in clinical practice.

**Key words:** limb obliterating atherosclerosis, bone marrow autologous progenitor cells, endotelial precursor, clinical trial.

операции не прямой реваскуляризации, направленные на стимуляцию коллатерального кровотока. Однако, несмотря на достигнутые успехи, в ряде случаев такие вмешательства не дают желаемого эффекта, что обуславливает поиск новых методов лечения [4]. На сегодняшний день наиболее перспективным методом стимуляции неоангиогенеза является клеточная терапия [5–7] и генно-инженерные технологии [8]. Экспериментальными работами на модели локальной ишемии конечности [9–11] и рядом клинических исследований [12–14] была показана возможность использования различных клеток для стимуляции неоангиогенеза. Однако рандомизированных, плацебо-контролируемых исследований, основанных на принципах доказательной медицины, пока недостаточно для вынесения убедительных заключений.

### Материал и методы

Данное исследование является рандомизированным, двойным слепым, плацебо-контролируемым; ограниченной клинической апробацией метода.

Критериями включения пациентов в исследование были: облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей IIБ стадия (по классификации А.В. Покровского), дистанция безболевого ходьбы 10–50 м., отсутствие пульсации на *aa. dorsalis pedis, tibialis posterior, poplitea*, отсутствие ишемии покоя и некротических изменений; преимущественно дистальная форма заболевания по данным ангиографии, что свидетельствует о невозможности выполнения реконструктивной операции; наличие в анамнезе поясничной симпатэктомии, реваскуляризирующей остеоперфорации большеберцовой кости; возраст от 39 до 70 лет; мужской пол.

В исследование не вошли пациенты с сахарным диабетом; перенесшие инфаркт миокарда или инсульт в течение последнего года; с гипертонической болезнью III стадии; с анемией и другими заболеваниями крови; с декомпенсацией хронических заболеваний, являющихся противопоказаниями к любой хирургической операции; с ВИЧ инфекцией, вирусным гепатитом; с онкологическими заболеваниями, химиотерапией в анамнезе.

Всего пролечено 42 пациента (мужчины) с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, в возрасте от 46 до 69 лет (в среднем –  $57 \pm 1,8$  лет). Длительность заболевания составила от 1 года до 16 лет (в среднем –  $5,8 \pm 4,17$  лет). У всех больных была II Б стадия заболевания по классификации А.В. Покровского, поражение бедренно-подколенно-берцового сегмента, невозможность выполнения реконструктивной операции. У 15 больных ранее была выполнена поясничная симпатэктомия, реваскуляризирующая остеоперфорация большеберцовой кости, ампутация пальцев стопы, однако со временем отмечено нарастание ишемии конечности.

Пациенты были рандомизированы на 3 группы (по 14 человек в каждой), различающиеся по виду проводимого лечения. В I группе пациентов проводилось лечение с использованием аутогенных CD133<sup>+</sup> клеток костного мозга (КМ). Во II группе пациентов проводилось лечение с использованием лейкоцитарной фракции клеток костного мозга (ТНС). В III группе (плацебо) в мышцы голени вводился физиологический раствор.

Протокол исследования прошел экспертизу в Комитете по биоэтике и был утвержден Ученым Советом ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава» в рамках комплексной научно-практической программы «Применение стволовых клеток в медицине». От всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Всем больным выполнялись общеклинические лабораторные исследования, биохимический анализ крови, цветное дуплексное картирование артерий нижних конечностей, измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), реовазография нижних конечностей с определением реографического индекса, тредмил-тест, трансфеморальная артериография нижних конечностей, оценка качества жизни по международной шкале SF-36.

Получение костного мозга осуществлялся в операционной под наркозом. Иглой «EBL» 11G×15 см (Bloodlines, Италия) пунктировали передние и задние ости подвздошных костей. Костный мозг аспирировали шприцем, затем переводили его в пакет «Baxter» с 63 мл антикоагулянта цитрат-фосфат-декстрозы-аденина (CPDA-1). Среднее количество эксфузата, включая антикоагулянт, составило 645,25 мл.

Запаянные пакеты взвешивали, рассчитывали количество костного мозга с антикоагулянтом и добавляли 20% раствор гидроксипропилкрахмала (ГЭК). Пакеты с КМ и ГЭК

центрифугировали при скорости 480 об./мин. в течение 10 мин., после центрифугирования 60–70% осевших эритроцитов сливали. Второе центрифугирование проводилось при скорости 1600 об./мин. в течение 10 мин., после чего плазму выжимали в верхний пакет. Полученный объем КМ составлял от 60 до 120 мл. Из пакета КМ переводили в пластиковые пробирки (BD Falcon tubes 50 ml, США), по 15 мл КМ на одну пробирку. В каждую пробирку добавляли по 45 мл лизирующего раствора на основе хлорида аммония. Пробирки с лизирующим буфером и костным мозгом помещали на 10 мин. в ротатор для перемешивания при температуре +4°C. По истечении 10 мин. пробирки центрифугировали при 1600 об./мин. в течение 10 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость аспирировали, добавляли холодный физиологический раствор до 50 мл и повторно центрифугировали при 1600 об./мин. в течение 10 мин. После второго центрифугирования аспирировали надосадочную жидкость, осадок из всех пробирок переводили в новую 50 мл пробирку через фильтр с порами 70 мкм (BD cell strainer 70 um, США), к общему осадку добавляли физиологический раствор до 50 мл и центрифугировали при 1600 об./мин. в течение 10 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость аспирировали и ресуспендировали осадок в нужном для инъекции количестве физиологического раствора 15 или 30 мл.

Выделение CD133<sup>+</sup> клеток проводили методом иммуномагнитной сепарации с использованием реагентов (Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Методом проточной цитометрии выполняли оценку количества CD133<sup>+</sup> клеток в эксфузате костного мозга до и после выделения клеток (с использованием реагентов «BD Pharmingen», на проточном цитофлюориметре «BD FACSCanto»).

У пациентов III группы (плацебо) выделенную лейкоцитарную фракцию клеток костного мозга подвергали программному замораживанию (Planer) с криопротектором – высокоочищенным диметилсульфоксидом, хранили для дальнейшего использования в жидком азоте при температуре –196°C.

Процедуру введения аутогенных прогениторных клеток проводили в асептических условиях перевязочного кабинета отделения сосудистой хирургии. Полученный препарат вводили в мышцы внутренней и внешней поверхности голени в 10 точек на каждой конечности, по 1,5 мл в каждую точку.

В I группе количество введенных ядросодержащих клеток на 1 конечность составило  $(2,12 \pm 1,23) \times 10^9$ ; CD133<sup>+</sup> клеток  $(1,26 \pm 0,12) \times 10^6$ . Во II группе среднее количество введенных в одну конечность ядросодержащих клеток составило  $(4,65 \pm 1,00) \times 10^9$  и CD133<sup>+</sup>  $(1,84 \pm 0,11) \times 10^6$ .

Вводимый клеточный материал был представлен ядросодержащими клетками, в их состав входили эндотелиальные прогениторные клетки (CD133<sup>+</sup>). При этом в I группе клеточный материал подвергался иммуно-магнитной сепарации к CD133<sup>+</sup> и в связи с этим удельный вес этих клеток был больше по сравнению со II группой.

Осложнений после общего обезболивания, трепанации подвздошной кости и после введения препарата не отмечено ни у одного из пациентов.

Период наблюдения пациентов составил 12 мес. Информация о вводимом препарате была раскрыта после окончания обследования всех пациентов через 6 мес. В этот же период пациентам III группы была возвращена лейкоцитарная фракция клеток костного мозга, забранная во время основного этапа исследования. Оценка клинических исходов произведена по рекомендованным стандартам, опубликованным международным обществом кардиоваскулярной хирургии J. Rutherford et al. (1997) [15] (табл. 1).

Таблица 1. Шкала изменений в клиническом статусе по J. Rutherford

| Критерий шкалы              | Клинические проявления  |
|-----------------------------|---|
| +3 Значительное улучшение   | Нет симптомов ишемии, все трофические язвы зажили, ЛПИ нормализовался (>0,9)  |
| +2 Умеренное улучшение      | У пациента отмечаются симптомы, но боли в конечности появляются при большей нагрузке, чем до операции; улучшение как минимум на одну степень ишемии; ЛПИ не нормализовался, но увеличился больше чем на 0,1 |
| +1 Минимальное улучшение    | ЛПИ увеличился более чем на 0,1, но клинического улучшения нет или, наоборот, клиническое улучшение без прироста ЛПИ более чем на 0,1   |
| 0 Без изменений             | Нет изменения в степени ишемии и нет увеличения ЛПИ   |
| -1 Незначительное ухудшение | Нет изменения в степени ишемии, но ЛПИ уменьшился больше чем на 0,1 или, наоборот, отмечено ухудшение статуса без уменьшения ЛПИ на 0,1 и более   |
| -2 Умеренное ухудшение      | Усугубление ишемии минимум на одну степень или неожиданная малая ампутация  |
| -3 Значительное ухудшение   | Ухудшение статуса более чем на одну степень ишемии или большая ампутация  |

Оценка эффективности лечения проводилась отдельно для каждой конечности, в которую был введен препарат. Среди 14 пациентов I группы введение клеточного материала проводилось в 20 конечностей, во II группе в 18 конеч-

ностей (однако оценка проводилась по 17 конечностям, так как 1 больной умер через 4 мес. после операции от инфаркта миокарда), в III группе в 23 конечности (табл. 2).

Таблица 2. Изменения в клиническом статусе в группах по шкале J. Rutherford

| Критерий шкалы              | I группа CD133*     | II группа TNC         | III группа плацебо     |
|-----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| +2 Умеренное улучшение      | 45% (9 конечностей) | 47% (8 конечностей)   | 4,3% (1 конечность)    |
| +1 Минимальное улучшение    | 35% (7 конечностей) | 41,2% (7 конечностей) | 17,5% (4 конечности)   |
| 0 Без изменений             | 10% (2 конечности)  | 5,9% (1 конечность)   | 56,5% (13 конечностей) |
| -1 Незначительное ухудшение | 10% (2 конечности)  | 5,9% (1 конечность)   | 13% (3 конечности)     |
| -2 Умеренное ухудшение      | 0                   | 0                     | 8,7% (2 конечности)    |
| Критерий Манна-Уитни        | p>0,1               | p>0,1                 | p<0,001                |

Ангиография нижних конечностей выполнялась всем пациентам до лечения и через 6 мес. после введения клеточного материала. Оценка ангиограмм проводилась отдельно для каждой конечности в баллах, в зависимости от степени развития коллатеральной сети [13]: 0 (отсутствие развития коллатералей); +1 (незначительное развитие коллатералей); +2 (умеренное развитие коллатералей); +3 (богатое развитие коллатералей).

### Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что в I и II группах пациентов, получивших клеточный материал, наблюдается статистически значимое улучшение клинического состояния по сравнению с III группой – плацебо (p<0,001 по критерию Манна-Уитни) (см. табл. 2).

Результаты анализа ангиограмм представлены на рис. 1.

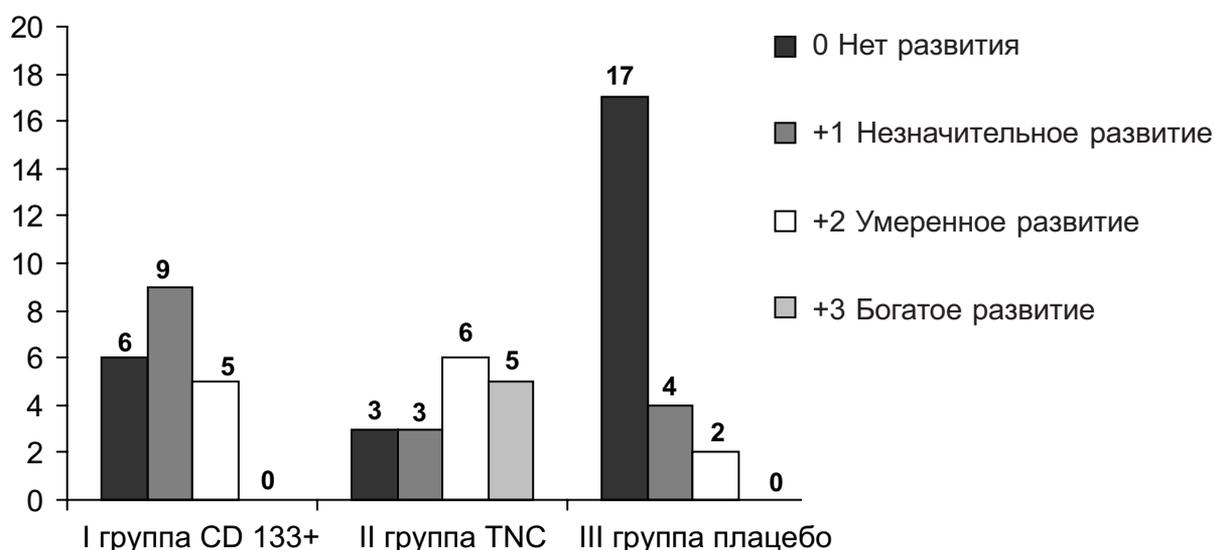


Рис. 1. Оценка результатов ангиографии через 6 мес.

Среди больных, которым вводили клеточный материал (I и II группы), число пациентов с «незначительным», «умеренным» и «богатым» развитием коллатералей было больше по сравнению с пациентами III группы (различия статистически значимые:  $p < 0,001$  по критерию Манна–Уитни). На рис. 2 представлены ангиограммы конечности больного I группы (CD133<sup>+</sup>) до и после введения аутогенных прогениторных клеток.

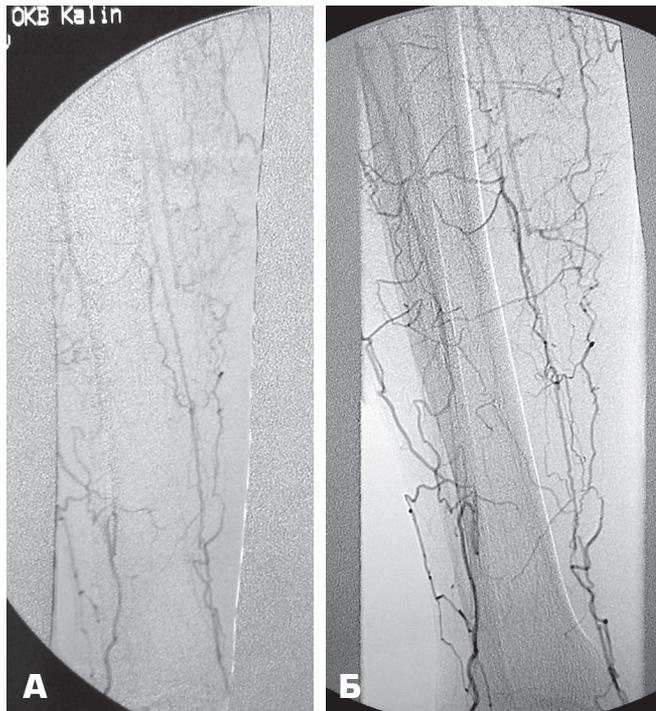


Рис. 2. Ангиограммы конечности до (А) и после (Б) введения аутогенных прогениторных клеток (CD133<sup>+</sup>)

По результатам тредмил-теста до лечения дистанция безболевой ходьбы пациентов в среднем составила  $45,2 \pm 11,09$  м. Через 1, 6 и 12 мес. дистанция безболевой ходьбы достоверно увеличилась в I и II группах (медиана – 50 м (интерквартильный размах 40–100 м), 100 м (20–150 м), 100 м (30–150 м) и 15 м (10–50 м), 90 м (40–100 м), 90 м (50–150 м), соответственно) по сравнению с III группой (0 м (0–10 м), 0 м (0–0 м) и 10 м (0–30 м)) [ $p < 0,05$  по критерию Манна–Уитни] (рис. 3, 4). Статистически значимых отличий в динамике безболевой ходьбы между I и II группами не обнаружено.

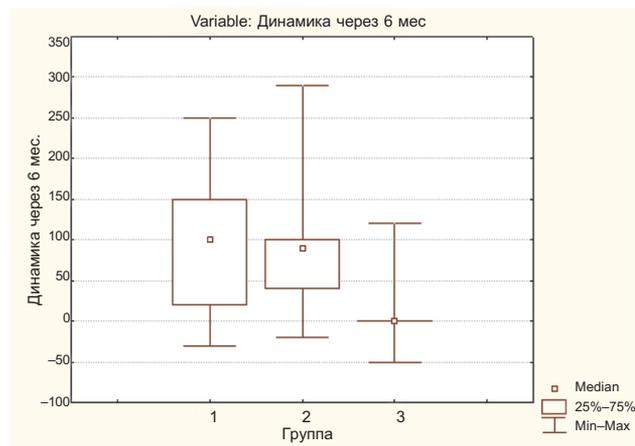


Рис. 3. Динамика безболевой ходьбы через 6 мес.

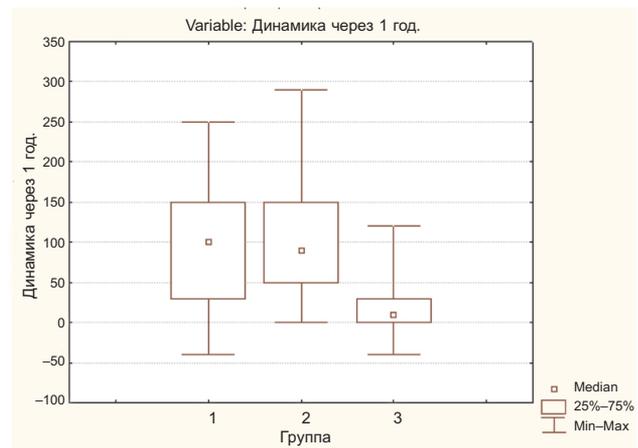


Рис. 4. Динамика безболевой ходьбы через 1 год

Выявлено достоверное улучшение качества жизни пациентов в I и II группах по сравнению с III группой ( $p < 0,05$  по критерию Манна–Уитни) по следующим показателям международной шкалы SF-36: физическая работоспособность, физическое состояние, болевой синдром, общее здоровье, энергичность (рис. 5). Нет достоверной динамики в качестве жизни по показателям социальная роль, эмоциональное состояние, психическое здоровье ( $p > 0,05$  по критерию Манна–Уитни).

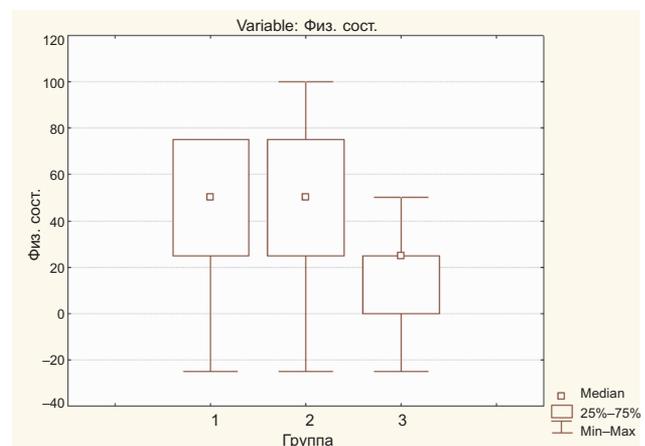


Рис. 5. Динамика качества жизни по шкале «физическое состояние»

Полученные предварительные ближайшие результаты лечения больных со IIБ стадией облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей весьма обнадеживающие. Отсутствие статистически значимых отличий между результатами в I и II группах, при наличии клинического улучшения, позволяет в дальнейшем использовать для лечения только лейкоцитарную фракцию клеток костного мозга. Однако для окончательной оценки необходимо изучение отдаленных результатов лечения, а также дозозависимости эффекта.

Как и любой новый метод лечения со временем находит свое применение, так и предложенный способ займет свое место в арсенале лечения больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.

**Выводы**

Предложенный способ лечения безопасен и эффективен в применении. Его можно рекомендовать для мультицентровых клинических испытаний у пациентов с дистальной формой облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей, у которых нет возможности выполнения реконструктивной операции, а также у больных, которым уже

была выполнена реконструктивная операция или непрямая реваскуляризация, но отмечается прогрессирование ишемии конечности. Научно-практическая работа должна проводиться только в государственных учреждениях здравоохранения, медицинских университетах и профильных НИИ, требует правовой и финансовой поддержки государства.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. М.: Медицина; 1997.
2. Покровский А.В. Клиническая ангиология: руководство для врачей. М.: Медицина; 2004.
3. Казанчан П.О., Попов В.А., Дебелый Ю.В. и др. Хирургическая реваскуляризация при критической ишемии. Ангиология и сосудистая хирургия 2000; 3: 32–5.
4. Константинов Б.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. и др. Отдаленные результаты лечения хронической ишемии нижних конечностей с использованием генно-инженерных конструкций с геном ангиогенина. Анналы хирургии 2005; 3: 23–6.
5. Берсенева А.В. Клеточная аутологичная трансплантация при ишемии нижних конечностей в клинике. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2005; 1: 40–3.
6. Бокерия Л.А., Георгиев Г.П., Голухова Е.З. и др. Клеточные и интерактивные технологии в лечении врожденных и приобретенных пороков сердца и ишемической болезни сердца. Вестник РАМН 2004; 9: 48–55.
7. Шевченко Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. СПб.: Наука; 2006.
8. Гавриленко А.В., Воронов Д.А., Фомичева И.И. Генно-инженерные технологии стимуляции ангиогенеза в лечении хронической ишемии нижних конечностей. Анналы хирургии 2005. 4: 5–8.

9. Смолянинов А.Б., Пыхтин Е.В., Булгин Д.В., Томонага М. Клеточные технологии в лечении терминальной стадии хронической ишемии нижних конечностей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; 2(3): 40–6.
10. Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцев А.Г. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. М.: ИД Медпрактика-М; 2005.
11. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964–7.
12. Canizo M. C., Lozano F., Gonzalez-Porras J. R. et al. Peripheral endothelial progenitor cells (CD133<sup>+</sup>) for therapeutic vasculogenesis in a patient with critical limb ischemia. One year follow-up. Cytotherapy 2007; 9: 1: 99–102.
13. Dong-Ik K., Mi-Jung K., Jin-Hyun J. et al. Angiogenesis facilitated by autologous whole bone marrow stem cell transplantation for Buerger's disease. Stem Cells 2006; 24: 1194–200.
14. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T. 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.
15. Robert B., Rutherford J., Dennis B. et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: Revised version. J. vascular surg. 1997; 26: 517–38.

Поступила 27.06.2008

**КОММЕНТАРИЙ**

**С.Л. Киселев**

доктор биологических наук  
профессор  
заведующий лабораторией генетических основ клеточных технологий Института общей генетики им. С.И. Вавилова (Москва)

Не смотря на широкий арсенал средств современной медицины, распространенность ряда патологических состояний заставляют искать новые средства для борьбы с ними. Сердечнососудистые заболевания по-прежнему находятся на первом месте, а среди них лидирующее положение занимают заболевания, связанные с ишемизацией тканей. Одним из перспективных инструментов лечения в этих ситуациях могут стать клеточные технологии. Однако, доказательная база возможности их применения еще весьма ограничена. Что обусловлено, в основном, тремя факторами. Во-первых, сложностью биологических процессов, и, как следствие, ограниченностью знания клеточной биологии (недостаточная научная проработка); во-вторых, отсутствием современных медицинских требований по проведению клинических исследований, связанных с клетками или генами (недостаточная клиническая проработка); третий фактор связан со значительной оторванностью медицинской практики от науки и наоборот.

Одним из решений по восстановлению кровоснабжения тканей является стимуляция роста коллатеральных сосудов. Установленным фактом является то, что гемо-

поэтические и эндотелиальные клетки имеют общего предшественника, находящегося во взрослом организме в костном мозге. Считается, что эндотелиальные клетки-предшественницы могут покидать костный мозг, мигрировать по кровеносному руслу и участвовать в восстановлении сосудов. Учитывая это, уже в 2002 г. были опубликованы результаты рандомизированных клинических исследований по терапевтическому ангиогенезу при трансплантации костного мозга [1].

Целый ряд иммунологических маркеров характеризует популяцию клеток, которые предположительно имеют свойства эндотелиоцитов. Среди них поверхностный гликопротеин CD133, однако, кроме них, CD133 обнаруживается на достаточно большом пуле разнообразных специализированных клеток организма, поэтому его нельзя считать специфическим уникальным маркером предшественников эндотелиальных клеток. Вместе с тем, в пионерских работах пятилетней давности именно он был использован для отбора клеток-предшественниц для лечения ишемических заболеваний [2]. Кроме того, недавно специфическая экспрессия CD133 была обнаружена на стволовых клетках глиальных опухолей [3, 4], ряда

новообразований эпителиального происхождения. Это указывает на то, что селекция клеток по этому маркеру может потенциально привести к отбору мигрирующих опухолевых клеток и стимуляции опухолевого процесса не только за счет индукции васкулогенеза. Поэтому развитие исследований по возможности использования тех или иных типов клеток для терапии требует внимательного и взвешенного подхода при выборе терапевтической популяции клеток. В первую очередь, это применение не одного, а ряда селективных маркеров и тщательная характеристика использованного терапевтического материала по ряду параметров, таких как: жизнеспособность, присутствие в отобранной клеточной популяции сопутствующих типов клеток, функциональная характеристика клеток *in vitro* и др. Чем большее количество параметров будет использовано для характеристики клеточного материала на первичном этапе исследований, тем безопаснее и достовернее будут полученные результаты.

Авторами статьи «Результаты рандомизированного двойного слепого плацебо контролируемого исследования эффективности лечения аутогенными прогениторными клетками костного мозга больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей», опубликованной в этом номере журнала, была поставлена задача, основываясь на принципах доказательной медицины, продемонстрировать убедительные заключения о возможности использования различных клеток для стимуляции ангиогенеза при ишемических поражениях конечностей. При этом авторы использовали два типа клеток: отобранные из костномозговой суспензии на иммуноманнитном сепараторе клетки «CD133<sup>+</sup>» и некую лейкоцитарную фракцию костного мозга, обозначенную авторским коллективом как «TCN». Тайна этих букв и характеристики этой клеточной фракции сохраняется до конца статьи.

Современные методы анализа позволяют использовать достаточно широкий спектр иммунологических маркеров для характеристики клеток. Например, у фирмы BD Biosciences существует более полусотни иммунологических маркеров для характеристики клеток костномозгового происхождения. Однако, несмотря на упоминание авторским коллективом метода проточной цитофлуориметрии от BD Biosciences, в наиболее важном для воспроизведения и стандартизации разделе статьи «Материал и методы» терются конкретные инструменты исследования (антитела), а также результаты (данные FACS анализа), поэтому интересующемуся читателю трудно сделать собственные выводы о популяциях клеток, используемых для введения.

Дальнейшее изложение методов еще больше интригует читателя, поскольку, цитирую: «В I группе количество введенных ядродержащих клеток на 1 конечность составило  $(2,12 \pm 1,23) \times 10^9$ ; CD133<sup>+</sup> клеток  $(1,26 \pm 0,12) \times 10^6$ . Во II группе среднее количество введенных в одну конечность ядродержащих клеток составило  $(4,65 \pm 1,00) \times 10^9$  и CD133<sup>+</sup>  $(1,84 \pm 0,11) \times 10^6$ ». Итак, по заключению авторов «удельный вес этих клеток (CD133 замечание мое) был больше по сравнению со II группой». Иными словами, т. н. прогениторных клеток костного мозга, вероятно отличных по своим свойствам от лейкоцитарных, в первом случае было 0,06%, а во втором 0,04%, а абсолютное количество клеток, вводимых группе II, было больше вдвое. Таким образом, утверждение авторов об «удельном весе» представляется некоей энигмой. Как следует из существующей теории и предыдущих исследований, эндотелиоцитарные предшественники, находящиеся рези-

дентно в костном мозге, могут проникать в кровеносное русло и, мигрируя по нему, участвовать в образовании сосудов *de novo*. Однако, авторы представленного исследования, производят классическую иммунизацию пациентов, вводя «в мышцы... голени в 10 точек на каждой конечности, по 1,5 мл в каждую точку». Исходя из современных представлений, затруднительно представить, что клетки, совершив инвазию в ткани мышцы, совершат экстравазию в кровоток и, в дальнейшем, каким-то образом будут участвовать в формировании коллатералей. Необходимо отметить, что инвазия и экстравазия – это существенные атрибуты опухолевой клетки, способной формировать метастазы, а селекция клеток в живом организме по этим параметрам является весьма нежелательной.

Полученные в ходе исследования результаты в достаточной степени коррелируют с использованными данными. Однако, не ясно, была ли это монотерапия или пациенты проходили помимо клеточной терапии и стандартное лечение.

Авторами получены интересные данные, показывающие, что по крайней мере в их диапазоне вводимого клеточного живого или мертвого материала, от дозы клеток (в два раза больше во II группе, чем в I) клинический эффект не зависит. Это значит, что вне зависимости от категории клеток, количество первичного материала (костного мозга) может быть существенно меньше без ущерба для эффекта. К сожалению, на снижение инвазивности процедуры авторы публикации внимания не обращают.

Настораживает и недостаточное внимание к оценке состояния пациентов в группе II, когда смерть пациента от инфаркта миокарда толкуется как «Осложненный... после введения препарата не отмечено ни у одного из пациентов» или «Выявлено достоверное улучшение качества жизни пациентов в I и II группах по сравнению с III группой». Почему-то в этом контексте авторами не обсуждается, что повышенная доза иммунизационного клеточного материала (в 2 раза больше чем в группе I) могла вызвать аутоиммунную реакцию угнетения сердечной мышцы из-за введения клеток костного мозга в связи с индивидуальными особенностями организма. В развитых странах случаи трагической смерти не от основного заболевания при проведении клинических испытаний тщательно изучаются, для того чтобы избежать дальнейшего нанесения вреда пациентам. В представленной статье авторским коллективом делается лишь вывод о безопасности применения.

Доказательная медицина требует документальных доказательств эффективности и чистоты метода, а кроме обобщенного тредмил-теста цифровые и усредненные данные по таким общепринятым параметрам как транскутанное напряжение кислорода, ультразвуковая доплерография артерий нижних конечностей с определением лодыжечно-плечевого индекса, лазерная доплеровская флоуметрия, а также свертывающие свойства крови, авторами представлены не были.

Я уверен, что клеточные технологии могут занять действительно достойное место в арсенале средств терапии завтрашнего дня, но для того чтобы приблизить этот день необходимо проведение продуманных и тщательных исследований с их широким обсуждением в кругу научной общественности. Именно этой цели и служит наш журнал. Хочется верить, что мое мнение не отпугнет авторский коллектив Е.А. Корымасова и др. от будущих исследований, а лишь заставит более тщательно подходить к планированию и реализации задуманного.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T. et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427–35.
2. Stamm C., Westphal B., Kleine H.D. et al. Autologous bone-marrow

stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45–6.

3. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(18): 5821–8.

4. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432(7015): 396–401.