

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ
НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Каргин В.Д., Солдатенков В.Е., Бессмельцев С.С., Бураков В.В., Волошин С.В.,

Глазанова Т.В., Чубукина Ж.В., Павлова И.Е., Розанова О.Г.

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16

Телефон (812) 717-44-55; e-mail: RNIINT@mail.ru

Резюме

Представлены результаты применения пересадки аутологичных стволовых клеток периферической крови для лечения 20 больных с хронической ишемией нижних конечностей IIa-IV стадии по А.В. Покровскому-Фонтейну. После предварительной мобилизации гранулоцитарным колониестимулирующим фактором с последующим аферезом получено $2,337 \times 10^7$ /л CD34+клеток с маркером ранних предшественников эндотелиоцитов. Лейкоконцентрат вводился интрамускулярно мультифокально под ультразвуковым контролем. По результатам 2-летних наблюдений применение аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток позволило приостановить развитие проявлений прогрессирующей ишемии нижних конечностей у 89,4% пациентов.

Ключевые слова: хроническая ишемия нижних конечностей, ростовые колониестимулирующие факторы, аферез аутологичных стволовых клеток периферической крови.

EFFECTIVENESS OF AUTOLOGOUS PERIFERAL BLOOD STEM CELL THERAPY IN
CHRONIC ISCHAEMIA OF LIMB

Kargin V.D., Soldatenkov V.E., Bessmeltsev S.S., Burakov V.V., Voloschin S.V., Glazanova
T.V., Tcubukina G.V., Pavlova I.E., Rozanova O.

Russian Research Institute Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg

Summary

The results of peripheral blood stem cells transplantation in 20 patients with chronic limb ischemia, stage IIa-IV (according to A.V. Pokrovsky-Fontein) are presented. After preliminary mobilization by G-CSF with the following aphaeresis $2,337 \times 10^7/\text{л}$ CD34-positive cells with the markers of early endothelial cell precursors have been received. Stem cells were introduced intramuscularly by means of numerous injections under ultrasound control. According to the results of 2-year follow up, the application of peripheral blood stem cells transplantation induced stabilization of progressive chronic limb ischemia in 89,4% of patients.

Key words: chronic limb ischemia, colony-stimulating factor of granulocytopoiesis, aphaeresis of autologous peripheral blood stem cells.

Введение

По прогнозам ВОЗ, в ближайшие годы число пациентов с окклюзионными заболеваниями нижних конечностей будет возрастать ежегодно на 5-7%, а смертность увеличится с 25% до 60-70% [1]. Число больших ампутаций конечностей в связи с критической ишемией в Евросоюзе и США превышает 100 тыс. в год [2]. Заболеваемость периферических артерий конечностей и высокая инвалидизация лиц трудоспособного возраста свидетельствует об актуальности и медико-социальной и экономической значимости рассматриваемой проблемы. До настоящего времени реконструктивно-восстановительные операции являются единственным эффективным видом лечения данной категории больных. Однако адекватная реваскуляризация артериального русла нижних конечностей оказывается возможной лишь у 37- 58% пациентов [3]. У пациентов с прогрессирующей ишемией конечностей при отсутствии условий для «прямой» реваскуляризации стандартная консервативная терапия малоэффективна. В ближайшие сроки от начала лечения положительный результат отмечается лишь у половины пациентов, а треть больных являются кандидатами на ампутацию, так как не решается главная проблема – адекватного кровоснабжения в дистальных отделах пораженной конечности [4]. В настоящее время перспективы ангиологии определяются изучением «терапевтического ангиогенеза», который называют биологическим шунтированием. Одним из таких направлений является разработка альтернативных путей реваскуляризации, в частности, способов стимуляции ангиогенеза с применением клеточных и генных технологий [5].

С начала 2000 г., с целью стимуляции терапевтического ангиогенеза с применением клеточной терапии хронической ишемии нижних конечностей, выполнено

значительное число пилотных и рандомизированных клинических исследований. В основном это были пациенты с критической ишемией нижних конечностей (КИНК), у которых хирургическая реваскуляризация была не осуществима. Решающими критериями оценки эффективности клеточной терапии являлось состояние интегральных функций ишемизированной конечности, таких как наличие болей в покое, дистанция безболевого ходьбы, показатели тредмил-теста, сроки заживления язв и сохранение конечности (устранение угрозы ампутации) [6, 7,8]. Однако многие вопросы аутоклеточной терапии хронической ишемии нижних конечностей требуют уточнения [9, 10,11].

Цель исследования

Изучить особенности получения стволовых клеток периферической крови (СКПК), выбрать метод их имплантации и оценить эффективность аутологичной трансплантации стволовых клеток у пациентов с заболеваниями периферических артерий нижних конечностей.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились 40 пациентов с заболеваниями периферических артерий нижних конечностей с ишемией IIa-IV ст. по А.В. Покровскому-Фонтейну, из которых 20 человек составили основную группу и 20 больных – контрольную группу. По клинической характеристике, структуре и характеру поражения сосудов нижних конечностей обе группы были сопоставимы. Соотношение мужчин: женщины составило – 17:3; средний возраст пациентов $59,5 \pm 5,1$ лет (от 39 до 77 лет). У 80% пациентов исследуемых групп был установлен облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, у остальных – болезнь Бюргера. У 4-х больных в анамнезе ранее были выполнены шунтирующие операции с последующим тромбозом шунтов. Среди сопутствующих заболеваний следует отметить сахарный диабет 2 типа, который был выявлен у 2 человек.

Критерии включения в исследование: пациенты старше 18 лет; клинические проявления ишемии конечности не менее 1 месяца, IIa-IV стадии по А.В. Покровскому-Фонтейну; проходимость проксимального артериального русла; наличие неоперабельного дистального поражения артерий нижних конечностей с недостаточностью коллатеральных путей кровотока. Обязательно подписание информированного согласия, пациент должен быть способен понять и выполнять суть исследования.

Критерии исключения: острый коронарный синдром или острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) в предшествующий месяц; стенокардия IV функционального класса (ФК); хроническая сердечная недостаточность (ХСН) IV ФК;

неконтролируемая инфекция; онкологические заболевания, в т.ч. в анамнезе; тяжелая почечная и печеночная недостаточность; дыхательная недостаточность III ст; нефротический синдром; полиорганная недостаточность; наличие алкогольной или наркотической зависимости; ВИЧ-инфекция; неспособность пациента понять суть исследования.

Мобилизация СКПК проводилась с использованием гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора филграстима (Г-КСФ) в разовой дозе 10 мкг/кг массы тела больного, который вводился подкожно параумбиликально в течение 3-х последовательных дней [7]. Процедура лейкоцитафереза выполнялась на 4-й день после стимуляции в условиях палаты стационара на аппарате Haemonetics® MCS® + LN 900-220E (далее “аппарат”) с использованием протокола PBSC (стволовые клетки периферической крови) и стандартными параметрами сбора через венозный доступ (кубитальная вена). Профилактика развития тромбоэмболических осложнений при непрямой реваскуляризации проводилась низкомолекулярными гепаринами (фраксипарин 0,3 мл или клексан 0,4 мл 1 раз в сутки подкожно). Анализ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в периферической крови, лейкоцитаферезном концентрате, учет CD34+ клеток выполнялся с помощью проточной лазерной цитофлуориметрии.

Всем пациентам контрольной и основной групп обеих групп сопоставимо проводилась комплексная ангиотропная, метаболическая, антикоагулянтная и антиагрегантная терапия: 1) актовегин 1 г. в 250 мл 0,9% изотонического раствора хлорида натрия, внутривенно, капельно № 10; цитофлавин 10,0 мл в 250 мл 5% раствора глюкозы или 250 мл 0,9% изотонического раствора хлорида натрия внутривенно, капельно, № 10; 2) клексан/ фраксипарин 0,3-0,6 мг подкожно 1 раз в сутки – 5 дней; 3. антиагреганты – тромбоАСС – 100 мг/кардиомагнил 150 мг 1 раз в сутки. Наряду с этим в основной группе для лечения больных использовалась аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Для оценки эффективности лечения выбраны следующие критерии: дистанция безболевой ходьбы (ДБХ); транскутанное определение парциального давления кислорода (ТКНК в мм. рт. ст.); лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ). Дополнительно нами предложено оценивать микроциркуляцию стопы (исследование выявляемости кровотока в межплюсневых артериях стопы) с помощью ADF- программы аппарата Toshiba Aplio. Улучшенный динамический поток (Advanced Dynamic Flow™ – ADF) обеспечивает высочайшее пространственное разрешение в режиме цветового доплеровского картирования, позволяя с непревзойденной точностью и детализацией выявлять самые

мелкие сосуды и зоны со сложным характером кровотока. Технология ADF позволяет получать точные изображения кровотока с учетом направления при высокой частоте кадров, в полной мере сохраняя качество изображений, присущее В-режиму ультразвуковой диагностики.

Оценка эффективности клеточной терапии у больных проводилась непосредственно после применения аутологичных СКПК, через 6 месяцев, 1 год и 2-3 года после лечения.

Успешным лечение считали в том случае, когда наблюдали клинические и клинико-лабораторные признаки уменьшения ишемии конечности; к признакам неэффективного лечения относили: формирование и/или нарастание язвенно-некротических изменений тканей стопы и голени; проведение больших и малых ампутаций на леченной нижней конечности.

Результаты и обсуждение

Относительное содержание CD34+клеток в периферической крови больных до стимуляции Г-КСФ было сопоставимо с показателями в группе контроля (0,026% и 0,032% соответственно, $p > 0,05$). Абсолютное содержание СКПК также не отличалось и составило $0,002 \times 10^9/\text{л}$ против $0,004 \times 10^9/\text{л}$ в группе контроля ($p \geq 0,05$). После стимуляции относительное содержание CD34+ клеток в периферической крови возрастало в среднем в 2,6 раза (0,079%), а абсолютное – в 22 раза ($0,044 \times 10^9/\text{л}$ против $0,002 \times 10^9/\text{л}$ в группе до стимуляции ($p \leq 0,005$). В продукте лейкоцитарного афереза отмечалось большее увеличение содержания ГСК по сравнению с показателями в периферической крови после стимуляции Г-КСФ. Так, относительное содержание CD34+клеток в лейкоцитарном концентрате составило 0,28%, что было в 3,5 раза больше, чем в периферической крови после стимуляции (0,079%) и более чем в 10 раз превышало показатели в периферической крови до стимуляции Г-КСФ (0,026%). Хранение и маркировка концентрата СКПК проводились в соответствии с действующими нормативными документами службы крови России как компонента крови аутологичной крови. Среднее время хранения концентрата СКПК от момента окончания афереза до введения пациенту составила $35,3 \pm 21,3$ мин. Введение трансплантата (концентрат СКПК) проведено внутримышечно по проекции икроножных мышц в 30 точках по 1 мл, под контролем УЗИ (Aloka 1700, программа MS, линейный датчик 7,5 МГц). Средняя доза введения пациенту составила $2,337 \times 10^7/\text{л}$ CD34+клеток. Расстояние между пункциями и их глубина определялись под контролем УЗИ. Применялись инъекционные иглы G29 без лазерного усиления эхосигнала. Ультразвуковой мониторинг позволил во всех 20 случаях: тестировать введение СКПК

строго субфасциально, контролировать глубину введения (от 10 мм до 15 мм), распределение СКПК в мышечной ткани по феномену расслоения перистой структуры мышц, добиться равномерного распространения клеточной взвеси по объему мышц без образования полостей накопления вводимого концентрата СКПК (псевдогематом), локализовать малую подкожную вену, мышечные артериальные ветви и, соответственно, избежать пункции сосудов. Таким образом, применение ультразвукового контроля повышает безопасность и точность введения СКПК в мышцы голени у больных с ишемией нижних конечностей. Имплантация СКПК во всех случаях прошла без технических осложнений введения. В 2 случаях в ходе введения развился спастический синдром мышц обеих голеней, носивший характер диффузных клонических сокращений икроножных мышц. Данное состояние было расценено нами как проявление субкомпенсированной гипокальциемии (исходно – 2,15 ммоль/л и после – 2,10 ммоль/л) в раннем постаферезном периоде и было эффективно купировано внутривенным введением 10 мл 10% раствора хлорида кальция. Следует отметить, что у обоих пациентов перед аферезом уровень кальция в плазме находился в пределах нормальных значений. В ближайшем послеоперационном периоде клинически, а также по оценке лодыжечно - плечевого индекса и дистанции безболевой ходьбы, степень артериальной недостаточности не нарастала, трофические изменения мягких тканей стопы не увеличивались; ампутации не проводились. Во всех случаях введение СКПК сопровождалось умеренным болевым синдромом в местах пункций в первые сутки послеоперационного периода без ухудшения трофики мягких тканей.

Клинически в раннем посттрансплантационном периоде (1 месяц) отмечены признаки положительной динамики разрешения критической ишемии: стихание болей в покое, купирование ригидности икроножных мышц, улучшение трофики стопы, в частности активная эпителизация язвы 3 пальца у 1 пациента. По результатам ультразвукового исследования (лодыжечно-плечевой индекс, кровоток в 1 межплюсневых артериях стопы по ADF-программе УЗИ) у 9 (47,3%) из 19 пациентов (1 больной отказался от обследования) через 1 месяц после клеточной терапии (КТ) наблюдался прирост ЛПИ на 18%. У 10 больных (52,6%) динамики кровотока в межплюсневых артериях (МП) стопы и ЛПИ по сравнению с исходными данными не наблюдалось. Однако у 5 обследуемых (26,3%) тестировался кровоток в МП артериях стопы. Через 6 месяцев у 10 (62,5%) из 16 обследованных пациентов после пересадки аутологичных СКПК выявлена положительная динамика с приростом ЛПИ на 16%, а у половины пролеченных пациентов улучшился кровоток в пальцевых артериях стопы. У остальных

больных данные УЗИ без положительных сдвигов, но и без ухудшения кровообращения в дистальном отделе мониторируемой конечности.

Через 1 год обследовано 11 пациентов: у 8 (72,7%) из них наблюдался прирост ЛПИ на 24% (рис. 1) и появился кровоток в межплюсневых артериях стопы по ADF-программе. Клинически отсутствовали боли в покое, дистанция безболевого ходьбы увеличилась на 247,6% против 101,9% в контроле. У пациентов основной группы, в отличие от контрольной, отмечалась большая комфортность в состоянии проблемной конечности после аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: у 17 (89,4%) из 19 пациентов, прослеженных в течение 2-х лет, уменьшились или купировались ночные судороги в нижних конечностях, зябкость стоп. Данные проспективного наблюдения за когортой больных, получавших лечение с введением аутологичных СКПК, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Клинико-инструментальные данные наблюдения в основной и контрольной группах

Показатель	Группа	Исходные значения	Через ≥ 2 года	Прирост (увеличение)
ДБХ, метры	основная (n=17)	160,12 $\pm$ 109,98	638,56 $\pm$ 171,02	478,0 (в 3 раза)
	контрольная (n=20)	235,7 $\pm$ 113,32	480,7 $\pm$ 146,13	245,0 (в 2 раза)
ЛПИ		0,45 $\pm$ 0,12	0,58 $\pm$ 0,14	на 28%
Кровоток в межплюсневых артериях (см/с ADF-УЗИ)		5,40 $\pm$ 2,75 см/с у 41,1% больных	10,15 $\pm$ 2,75 см/с у 88,2% больных	Увеличение в 2 раза числа больных с определяемым кровотоком
Основные клинические характеристики, отражающие эффективность лечения				
Большие ампутации (на уровне бедра или голени)	Основная	0	0	0
	Контроль	1	1	2
Трофические изменения стопы, пальцев	Основная	1	0	
	Контроль	2	1	

Примечание. ДБХ – дистанция безболевого ходьбы в метрах; ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс; ADF – программа УЗИ кровотока в межплюсневых артериях на аппарате «Aplio» Япония

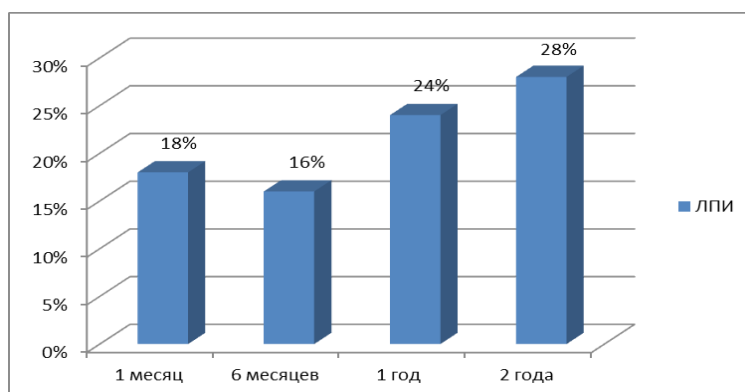


Рисунок 1. Увеличение лодыжечно-плечевого индекса (% в среднем от исходного) у больных через 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года после применения СКПК

Данные таблицы 1 и рис. 1 иллюстрируют возрастающую динамику увеличения показателей периферического кровообращения в конечности после пересадки аутологичных стволовых клеток. Наибольшие значения эта тенденция приобретает по прошествии 1-2 лет, когда у 89,4% пролеченных пациентов с заболеваниями периферических артерий, прирост ЛПИ, по сравнению с исходным состоянием, составил 24% и 28% (соответственно), а микроциркуляция кровотока в межплюсневых артериях стопы по данным УЗИ (ADF-программа) выявлялась у 60% обследованных пациентов. В основной группе показатель сохранения конечности составил 100%, в то время как в контрольной группе 96%. Итоговый прирост дистанции безболевого ходьбы через 2 года после клеточной терапии составил 478 метра, что в 3 раза превышает исходные показатели. Кровоток в межплюсневых артериях выявлялся у 88% пролеченных пациентов по сравнению с 41% исходно (см. табл. 1). Объективно исчезла ригидность икроножных мышц, их болезненность при пальпации, более отчетливо проявлялся венозный рисунок, сократилось время наступления реактивной гиперемии стоп, что в определенной степени можно трактовать как признаки улучшения перфузии дистального ложа конечности. 9 человек работоспособного возраста в основной группе пациентов

после лечения с применением пересадки аутологичных СКПК продолжают трудиться, что свидетельствует об определенном медико-социальном результате клеточной терапии. Случаев потери трудоспособности в основной группе не было.

Выводы:

1. Проведенное исследование подтвердило эффективность применения пересадки аутологичных гемопоэтических стволовых клеток периферической крови для лечения больных с заболеваниями периферических артерий нижних конечностей, позволяющее остановить развитие проявлений прогрессирующей ишемии у 89,4% пациентов.
2. Предложенный метод внутримышечного введения концентрата аутологичных стволовых клеток под УЗИ визуализацией обеспечивает адекватное и безопасное проведение клеточной трансплантации при хронической ишемии нижних конечностей.

Литература.

1. Савельев В.С., Кошкин В.М., Каралкин А.В. Патогенез и консервативное лечение тяжелых стадий облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. – М., 2010. – 216 с.
2. Bypass versus angioplasty in severe ischemia of the leg (BASIL) multicentre randomised controled trial/ Adam D.J., Beard J.D., Cleveland T. et al. // Lancet. – 2005. – Vol. 366. – P. 1925-1934.
3. Талицкий К.А. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей// КТТИ. – 2011. – Том VI, №3. – С.89-98.
4. Asahara T., Vurohara T., Aullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // Science. – 1997. – Vol. 275. – P. 964-967.
5. Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B. et al. Origin of endothelial progenitor in bone marrow // Clin. Invest. – 2002. – Vol.109 – P. 337-346.
6. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs// Circulation. – 1998. – Vol. 97. – P.1108-1110.
7. Nishikawa S.I. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK-EV-cadherin+cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages // Circulation. – 1998. – Vol.125. – P.1747-1757.
8. Asahara N., Murohara H., Takahashi T. et al. Bone marrow origin of endothelial progeniror cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization // Circ. Res. – 1999. – Vol. 85. – P. 221-228.

9. Phelps E.A., Garcia A.J. Update on therapeutic vascularization strategies //Regen Med. – 2009. – Vol. 4. – P. 65-80.
10. Fadini G.P., Agostini C., Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature // Atherosclerosis. – 2010. – Vol.209, № 1. – P. 10–17.
11. Iba O., Matsubara H., Nozawa Y. et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs // Circulation. – 2002. - Vol. 106. – P. 2019-2025.