

На правах рукописи

**ПЛОТНИКОВ МИХАИЛ ВИКТОРОВИЧ**

**ПРИМЕНЕНИЕ ФРАКЦИИ МОНОНУКЛЕАРОВ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ОБОГАЩЕННОЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИМИ  
СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ  
АРТЕРИАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2016

Работа выполнена в ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук Максимов Александр Владимирович

**Официальные оппоненты:**

**Староверов Илья Николаевич**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой хирургии ИПДО ГБОУ ВПО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Калинин Роман Евгеньевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой ангиологии, сосудистой, оперативной и топографической анатомии, ректор ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «30» сентября 2016 г. в «    » часов на заседании объединенного диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д999.052.02 на базе «НМХЦ им.Пирогова» Минздрава России, ГБУ здравоохранения Московской области «МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского» по адресу: 105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института усовершенствования врачей ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 65) и на сайте [www.pirogov-center.ru](http://www.pirogov-center.ru)

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Учёный секретарь объединенного диссертационного совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, учёной степени доктора наук,  
доктор медицинских наук, профессор

С.А. Матвеев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Заболевания периферических артерий (ЗПА) являются одной из наиболее частых причин снижения качества жизни, инвалидизации и занимают большую долю в структуре смертности (Покровский А.В. и др., 2015; Marques L. et al., 2016). Прямая реваскуляризация считается наиболее адекватным методом восстановления кровообращения в конечности, однако, отсутствие адекватного кондуита и/или дистального принимающего русла является причиной неудовлетворительных отдаленных результатов лечения (Покровский А.В. и др., 2015; Reinecke H. et al., 2015). Это определяет сохраняющийся интерес к непрямым методам реваскуляризации, таким как десимпатизация, реваскуляризирующая остоперфорация, артериализация венозной системы и т.д. (Староверов И.Н., 2014; Cherviakov Iu.V. et al., 2015). Отсутствие доказательной базы ограничивает их широкое применение для лечения ЗПА и не рекомендует как альтернативу прямой реваскуляризации (Покровский А.В. и др., 2013; Norgren L. et al., 2007).

На протяжении последних трех десятилетий сформировалась новая тактика улучшения перфузии ишемизированных тканей с помощью усиления естественных процессов неоваскуляризации - терапевтический ангиогенез (Takeshita S. et al., 1994, Suzuki J.I. et al., 2015). Первыми применением теории в клинической практике стали сообщения о лечении ишемии конечности J. Isner в 1994 году с применением гена VEGF-165 в плазмидном векторе и E. Tateishi Yuyama в 2002 году клеточной терапии. Последующие экспериментальные и клинические работы привели к формированию двух направлений терапевтического ангиогенеза: первое – изучение факторов роста и стимуляция их выработки на уровне генома клетки при помощи плазмидных конструкций, вторая – применение проангиогенных свойств прогениторных клеток. В настоящее время существует большое количество работ по применению различных проангиогенных факторов роста (Деев Р.В. и др., 2011; Suzuki J.I. et al., 2015). Однако сложности получения носителей гена и неполное представление о потенциальных патогенетических эффектах данных аллогенных субстанций ограничивает их широкое применение.

В данном контексте выгоднее представляется использование аутологичных,

т.е. собственных, прогениторных клеток пациента. В настоящее время имеется ограниченное количество зарубежных клинических публикаций по трансплантации аутологичных прогениторных клеток больным с ЗПА (Шевченко Ю.Л., 2006; Корымасов Е.А., 2009; Талицкий К.А., 2011; Шойхет Я.Н. и др., 2011; Raval Z. et al., 2014; Peeters Weem S.M. et al., 2015). Оценка терапевтического эффекта в них проводилась исключительно на основе данных инструментальных и физикальных методов обследования. Изучение гистологического материала после введения аутологичных прогениторных клеток носили единичный или случайный характер.

Таким образом, до сих пор ни в одном исследовании не были отражены аспекты патоморфологического механизма клинического улучшения, наблюдаемого у пациентов с ЗПА после введения аутологичных прогениторных клеток.

**Цель исследования:** улучшение результатов лечения пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени путем стимуляции ангиогенеза посредством аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками.

В соответствии с данной целью сформулированы следующие **задачи:**

1. Разработать методику лечения хронической артериальной недостаточности нижних конечностей путем стимуляции ангиогенеза посредством аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в пораженную конечность и оценить её безопасность.
2. Изучить качественную и количественную характеристику аутотрансплантата, полученного при применении предложенной методики.
3. Изучить отдаленные результаты аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени в сравнении с группой пациентов со стандартной терапией.
4. Доказать влияние аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, на стимуляцию ангиогенеза в мышцах пораженной конечности.

**Научная новизна.** Проведено комплексное морфологическое и функцио-

нальное изучение результатов аутологичной трансплантации мононуклеаров периферической крови, содержащих фракцию гемопоэтических стволовых клеток, у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени.

Проведено сравнение отдаленных результатов течения заболевания периферических артерий в группах пациентов со стандартной терапией и после аутотрансплантации мононуклеаров периферической крови.

Впервые выполнено изучение морфологических изменений, происходящих в скелетной мышце нижней конечности в ответ на аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток периферической крови после цитокиновой мобилизации.

Впервые выявлена корреляция между плотностью вновь образованной капиллярной сети и клеточным составом аутотрансплантата.

Впервые установлено минимальное целевое значение количества гемопоэтических стволовых клеток, содержащихся во фракции мононуклеаров при аутотрансплантации, для получения клинически значимых результатов у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени.

**Практическая значимость.** Разработана методика стимуляции ангиогенеза в ишемизированных мышцах нижних конечностей посредством аутологичной трансплантации фракции мононуклеаров периферической крови в мышцы нижних конечностей, после их цитокиновой мобилизации, а также установлена её безопасность.

Доказано улучшение функциональных параметров кровоснабжения конечности после аутологичной трансплантации фракции мононуклеаров периферической крови в мышцы нижних конечностей у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени.

Доказано наличие процесса ангиогенеза в мышцах нижних конечностей у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей IIБ степени в ответ на трансплантацию аутологичных мононуклеаров периферической крови, содержащих гемопоэтические стволовые клетки.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты исследования внедрены в практику отделения сосудистой хирургии №1 ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» МЗ РТ, отделения сосудистой хирургии ГАУЗ «Городская клиническая больница №7» МЗ РТ, а также используются при проведении практических занятий и лекций на кафедре кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на: 21 (XXI) Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов (Самара, 2009); Межрегиональной междисциплинарной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ангиологии и сосудистой хирургии» (Казань, 2010); 60-ом международном конгрессе Европейского Общества сердечно-сосудистых хирургов (ESCVS) (Москва, 2011), Республиканской научно-практической конференции «День сердечно-сосудистого хирурга» (Альметьевск, 2012); 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в хирургии» (Санкт-Петербург, 2013); совместном заседании кафедры кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии совместном заседании кафедры кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии, кафедры эндоскопии, общей и эндоскопической хирургии, кафедры клинической и лабораторной диагностики, кафедры хирургии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедры хирургических болезней №1, кафедры хирургических болезней №2 ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделения биологии и биотехнологии института фундаментальной медицины ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (Казань, 2016).

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, в том числе 4 работы опубликовано в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК Министерства образования и науки РФ, 1

в виде коллективной монографии.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, четырех глав, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержит 30 рисунков и 20 таблиц. Список литературы представлен 201 источником.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Методика аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками после их цитокиновой мобилизации, в мышцы пораженной конечности у пациентов с хронической артериальной недостаточностью IIБ степени является эффективной и безопасной.
2. Предложенный метод получения аутотрансплантата позволяет получить клеточный материал, объем которого и содержание в нем гемопоэтических стволовых клеток является достаточным для стимуляции ангиогенеза в мышцах конечностей у пациентов с хронической артериальной недостаточностью IIБ степени. Кроме того, применяемая методика позволяет выполнить не только аутотрансплантацию, но и криоконсервирование клеточного материала в банке стволовых клеток.
3. Методика аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов со IIБ степенью хронической артериальной недостаточности нижних конечностей приводит к стойкому и длительному улучшению функциональных параметров кровоснабжения конечности. Течение заболевания на фоне стандартной терапии у пациентов со IIБ степенью хронической артериальной недостаточности нижних конечностей характеризуется прогрессирующим снижением резервов коллатерального кровообращения и нуждается в применении дополнительных методов лечения.
4. Аутотрансплантация фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов со IIБ степенью хронической артериальной недостаточности нижних конечностей стимулирует процесс ангиогенеза, причем эффективность стиму-

ляции носит доза зависимый, от количества гемопоэтических стволовых клеток в аутооттрансплантате, эффект.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Материалы и методы исследования.**

Работа выполнена на кафедре кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» МЗ РФ. Клиническая часть исследования выполнена на базе отделения сосудистой хирургии ГАУЗ РКБ МЗ Республики Татарстан. Морфологические исследования биопсийного материала скелетной мышцы проведены на кафедре нормальной анатомии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет». Протокол исследования и критерии отбора пациентов одобрены Республиканским комитетом по этическим вопросам (Протокол №10 от 23.11.2005 г).

В исследование включено 56 пациентов, разделенных на 2 основные группы. В I группе пациентам выполнена стимуляция, мобилизация и аутологичная трансплантация фракции МПК в мышцы пораженной конечности. II группа – аналогичные по клиническому статусу пациенты, которые, по тем или иным причинам, воздержались от хирургического лечения или применения клеточной терапии. Клиническая характеристика пациентов, отобранных в исследование представлена в таблице 1. Критериями включения являлись: проходимость аорто-бедренного сегмента и глубокой артерии бедра; возраст до 60 лет (включительно); хроническая артериальная недостаточность IIБ степени (по А.В. Покровскому); длительность заболевания и/или время от последнего реконструктивного вмешательства более 6 месяцев при отсутствии эффекта от консервативной терапии; окклюзия подколенной и/или берцовых артерий. Критерии исключения: наличие критической ишемии как состояния, требующего активной консервативной, реконструктивной или органосохраняющей тактики; противопоказания к применению препарата Нейпоген (рекомбинантный G-CSF); тяжелая сердечно-сосудистая недостаточность; нарушение сознания; онкозаболевания; вирусные гепатиты и инфекция ВИЧ.



Таблица 1 - Клиническая характеристика пациентов

Показатели	I группа	II группа
<b>Количество</b>	30	26
<b>Возраст</b>	51,2±1,5	56,4±1,4
<b>Пол</b>	Муж.-30\Жен.- 0	Муж.-26\Жен.- 0
<b>Этиология ЗПА</b>		
Атеросклероз	27(90%)	24 (92%)
Тромбангиит	3 (10%)	2 (8%)
<b>Сопутствующая патология</b>		
Артериальная гипертензия	33,3%	46,2%
Сахарный диабет	10%	7%
Заболевание ЖКТ	20%	30,7%
Заболевание органов дыхания	10%	15,4%
Атеросклероз БЦА	33,3%	15,4%
ИБС	33,3%	38,4%
Мультифокальный атеросклероз	16,7%	8%
<b>Медиана ЛПИ, исходная</b>	0,57 (25-75 перцентиль: 0,43-0,73)	0,6 (25-75 перцентиль: 0,53 – 0,67)

В I группе 16 из 30 пациентов ранее перенесли операции прямой и (или) непрямой реваскуляризации. Во II группе 10 из 26 пациентов ранее перенесли операции прямой и (или) непрямой реваскуляризации. Срок после последнего перенесенного вмешательства в обеих группах составлял от 7 до 101 месяца. На момент включения в исследование проходимость аорто-бедренного сегмента (в том числе аорто-бедренных шунтов) и глубокой артерии бедра была сохранена, все бедренно-подколенные шунты - окклюзированы.

Обследование пациентов включало в себя сбор анамнеза, физикальное обследование, оценку сопутствующей патологии на основании ЭКГ, при необходимости ЭХО-КС, ЦДС прецеребральных артерий, УЗИ органов брюшной полости и забрюшинного пространства, ФГДС, рентгенографии легких (флюорографии). Проводился осмотр терапевта или кардиолога с целью коррекции терапии сопутствующей патологии. Особое внимание было уделено онкологическому анамнезу.

Для определения и расчета лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) применялась ультразвуковая доплерография на аппарате VasoGuard (Nicolet, США) с использованием датчиков 4 и 8 мГц.

Ангиография выполнялась всем пациентам до и спустя 3 месяца после ауто-

трансплантации фракции МПК с соблюдением условий протокола первичного исследования. Анализ ангиограмм включал в себя оценку состояние путей оттока согласно схеме R. Rutherford и развития коллатералей по адаптированной методике Vajanto I.

Для оценки толерантности к физической нагрузке и объективизации степени перемежающейся хромоты применялся тердмил-тест по методике И.И.Затевахина. С её помощью пациенты были разделены по функциональным классам с «ограниченным» и «критическим» резервом ходьбы.

Оценку изменения в клиническом статусе выполняли при помощи схемы, предложенной R. Rutherford., которая позволяет избежать оценки результатов лечения только на основании симптоматического улучшения.

**Методика стимуляции ангиогенеза с применением фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками.** С целью стимуляции и мобилизации фракции мононуклеаров периферической крови (МПК), обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК), в периферическую кровь пациенту назначался препарат рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Нейпоген®). Подкожные инъекции препарата производились в течение 5 дней в суточной дозе 1 млн. ед./кг. массы тела.

На 6-й день на многофункциональном клеточном сепараторе крови MCS+ (Haemonetics Corporation, USA) проводилась процедура лейкафереза. Выполнялось 3-4 цикла забор\возврата периферической крови пациента общей продолжительностью не более 3-х часов. Забранный материал размещался в гемаконах. Около половины объема полученного от каждого пациента клеточного продукта отбиралась для замораживания и хранения. Остальное доставлялось с пациентом в операционную.

Подсчет абсолютного числа жизнеспособных ГСК с фенотипом  $CD45^{dim}CD34^{+}SSC^{low}$  выполняли по протоколу ISHAGE в модификации на проточном цитометре Facs Calibur (BD, USA) с применением набора Stem-Kit® Reagents (#IM3630, Beckman Coulter, France) по инструкции производителя (Current Protocols in

Cytometry (2003) 6.4.1 -6.4.23. Copyright © 2003 by John Wiley & Sons, Inc). Использовали комбинацию моноклональных антител CD45-FITC/CD34-PE и краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для идентификации нежизнеспособных клеток.

Введение полученной фракции МПК, обогащенной ГСК, производилось в условиях операционной под спинномозговой анестезией. Для пункции использовались стандартные шприцы объемом 20мл с иглами для внутримышечных инъекций размером 8x40 мм. Пункционная инфильтрация передней и задней группы мышцы голени выполнялась в равноудаленных точках примерно одинаковыми объемами

**Методика морфологического исследования скелетной мышцы.** Биопсию производили непосредственно перед имплантацией фракции МПК и спустя 3 месяца. Забор мышечной ткани размерами примерно 0,5x0,5x0,5 см выполняли на уровне середины голени по медиальной или заднемедиальной поверхности. Повторная биопсия икроножной мышцы проводилась в отдалении от места первичной биопсии для исключения влияния перенесенного ранее репаративного процесса.

После фиксации в 10% нейтральном формалине биоптаты заливали по стандартной методике в парафин, полученные парафиновые срезы (4-6  $\mu\text{m}$ ) для визуализации капилляров подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с коммерческими моноклональными антителами к CD31 (клон 1A10, Novocastra, UK, разведение 1:10), CD34 (клон QVEnd/10, Novocastra, UK, разведение 1:75), vWF (клон F8/86, DAKO, Denmark, разведение 1:25) и системы визуализации Novolink (Novocastra, UK). Ядра клеток докрасивали гематоксилином. После визуализации капилляров на срезах биопсий выбирали по 3 случайных поля зрения где определяли относительное количество капилляров на одно мышечное волокно. Полученный результат определяли как «индекс К/М».

**Алгоритм исследования у пациентов, после аутологичной трансплантации мононуклеаров периферической крови** представлен в таблице 2. Функциональные исследования проводились на всех контрольных сроках исследования. Изучение отдаленных результатов на сроке 5 лет (60 месяцев) выполнено на основании анкетирования (почтовая рассылка) и очных осмотров с проведением функциональных исследований.

**Статистическая обработка результатов** производилась при помощи статистических пакетов 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. Наличие корреляций между переменными тестировали при помощи регрессионного анализа и коэффициента Спирмена.

Таблица 2 - Алгоритм наблюдения за пациентами после аутотрансплатации МПК

Исследование	Сроки наблюдения (месяцы)				
	0	3	6	12	60
Ангиография	+	+			
Биопсия икроножной мышцы	+	+			
Определение ЛПИ	+	+	+	+	+
Тредмил-тест	+	+	+	+	+
Время восстановления ЛПИ	+	+	+	+	+

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Изучение течения ЗПА в группе пациентов со стандартной терапией.

Группу составили 26 пациентов, которым проводилась стандартная терапия ЗПА, с применением препаратов АСК в дозе 100 мг 1 раз в день и ингибиторов ГМГ-КоАредуктазы. Установлено достоверное снижение значения ЛПИ на 0,02 через год с 0,6 (25-75 перцентиль: 0,53-0,67) до 0,58 (25-75 перцентиль: 0,48-0,62),  $p=0,00009$ , прогрессивное снижение дистанции безболевого ходьбы в течение года на 19,5% с 149,33 (25-75 перцентиль: 102,22–177,78) метров до 120 (25–75 перцентиль: 80-150) метров,  $p<0,05$ . Также зарегистрировано увеличение времени восстановления ЛПИ после нагрузки на 53,3% с 574 (25–75 перцентиль: 461-1206) сек. до 880 (25-75 перцентиль: 560-1340) сек,  $p<0,05$ .

При оценке изменений в клиническом статусе по R. Rutherford на сроке 3 месяца установлено отсутствие улучшения у 24 пациентов (+0), минимальное улучшение (+1) у 2 пациентов. К 6 месяцам группа с минимальным улучшением (+1) возросла до 6 пациентов. Однако, уже на сроке 12 месяцев в группе минимальным улучшением (+1) осталось лишь 2 пациента и выявлено 2 пациента с незначительным ухудшением (-1).

Таким образом, естественное течение ЗПА у пациентов в стадии перемежающейся хромоты в целом можно охарактеризовать как благоприятное. Однако, несмотря на стабильные значения ЛПИ (показатель макрогемодинамики), в течение года отмечается прогрессивное ухудшение ДБХ и времени восстановления ЛПИ после нагрузки, характеризующие резерв коллатерального кровообращения.

### **Результаты аутологичной трансплантации мононуклеаров периферической крови у пациентов с ЗПА**

**Непосредственные результаты.** Согласно объему программы Исследования аутологичная трансплантация фракции МПК в мышцы пораженной конечности выполнена 30 пациентам. Медиана ДБХ при включении в исследование составила 86,9 (5-95 перцентиль: 35,6-178,7) метра, медиана ЛПИ - 0,57 (25-75 перцентиль: 0,43-0,73).

Из побочных явлений применения препарата Нейпоген® зафиксированы: снижение тромбоцитов менее  $100 \times 10^9/\text{л}$  у 7 пациентов; болевого синдрома в левом верхнем квадранте живота – 1 пациент; миалгия и головную боль - 2 пациента. Это согласуется с данными мета-анализа литературы G.P. Fadini и др. (2010), и подтверждает безопасность использованного нами вида аутоотрансплантации.

Анализ лейкоформулы периферической показал, что стимуляция приводила в среднем к пятикратному увеличению количества лейкоцитов с 7940 до 43250 в мкл. ( $p < 0,05$ ) (Рис. 1). Начиная с третьих суток, количество лейкоцитов значительно не изменялись (3-и сутки - 43350 в мкл., через 5 дней - 43250 в мкл. ( $p < 0,05$ )). Поэтому, исходя из соображений безопасности и экономической эффективности, применение рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора для стимуляции в течение трех дней можно считать достаточной.

Объем полученной лейкоцитарной массы при лейкоферезе составил  $85,86 \pm 3,49$  мл, медиана мононуклерных клеток в нем  $13,7 \times 10^9$  (5-95 перцентиль:  $5,07 \times 10^9 - 19,75 \times 10^9$ ), а жизнеспособных ГСК  $47,36 \times 10^6$  (5-95 перцентиль:  $19,5 \times 10^6 - 19,4 \times 10^7$ ). Это позволило половине аутоотрансплантата подвергнуть криохранению. Трансплантационный материал содержал  $6,95 \times 10^9$  (5-95 перцентиль:  $3,89 \times 10^9 - 9,87 \times 10^9$ ), из них жизнеспособных имплантированных ГСК  $23,7 \times 10^6$  (5-95 перцен-

тель:  $9,75 \times 10^6 - 97,0 \times 10^6$ ). Жизнеспособных клеток в ауто-трансплантате (по критерию непроницаемости клеточной мембраны для 7-AAD) более 98%.

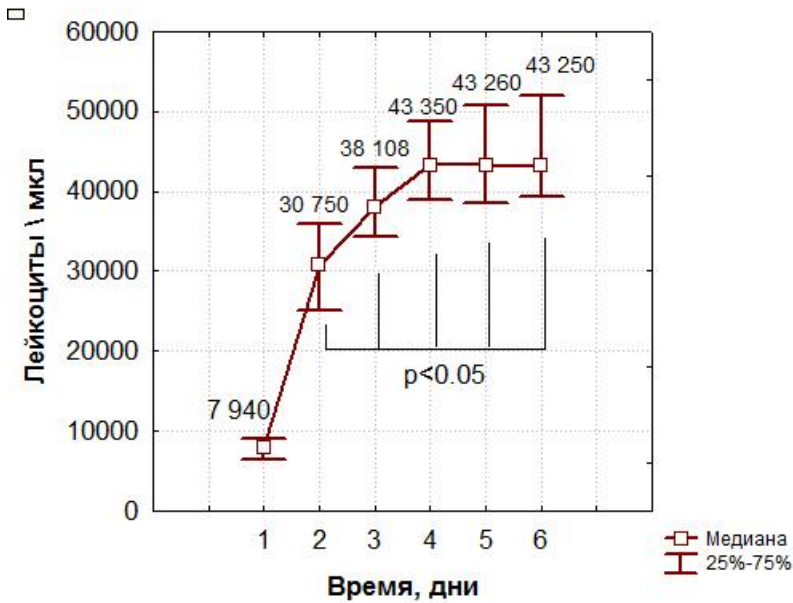


Рис. 1. Индукция лейкоцитоза в периферической крови при стимуляции Нейпогеном®.

Таким образом, проведение повторных циклов лейкофереза позволило бы получить больший объем клеточного материала, достаточного не только для лечебной манипуляции, но и для резервирования его на неограниченный срок хранения. Примененная нами методика стимуляции и мобилизации ГСК позволяет улучшить качество и количество клеточного ауто-трансплантата.

В исследовании нами не было выявлено корреляции между возрастом и общим числом мононуклеаров ( $r=0,26$ ,  $p=0,19$ ), возрастом и количеством ГСК (CD34+ клеток) ( $r=0,0007$ ,  $p=0,997$ ) в трансплантате. Полученные данные могут указывать на возможность увеличения в дальнейшем возрастного ценза при отборе пациентов для клеточной терапии ЗПА.

В целом, процедура мобилизации и ауто-трансплантации фракции МПК, обогащенной ГСК, на протяжении госпитального периода не имела осложнений.

**Отдаленные результаты ауто-трансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, у пациентов с ЗПА** были изучены на сроке до 60 месяцев.

За период наблюдения умерло пять пациентов (2 пациента - ОНМК (36 мес., 42 мес. наблюдения соответственно), патология сердца (ОИМ и ХСН) – 2 пациента

(48 мес., 56 мес. соответственно), рак легкого - 1 пациент (50 мес.). Кумулятивная выживаемость пациентов спустя три года составила 95,8%, через 5 лет 79,2%.

Увеличение дистанции безболевой ходьбы уже на сроке 3 месяца составила более 42% с 86,9 до 123,6 метров ( $p < 0,05$ ), а к 12 месяцам дистанция возросла до 137,8 метров (Рис. 2). Таким образом, в течение первого года наблюдения отмечено увеличение дистанции безболевой ходьбы на 55%.

Измерение ЛПИ в покое зафиксировало достоверный рост значений данного показателя на сроке 3 месяца на 17,5% и на 22,8% через полгода наблюдения (Рис. 3). На сроке 12 месяцев выявлена тенденция к регрессу до, практически исходного, к 5 годам наблюдения.

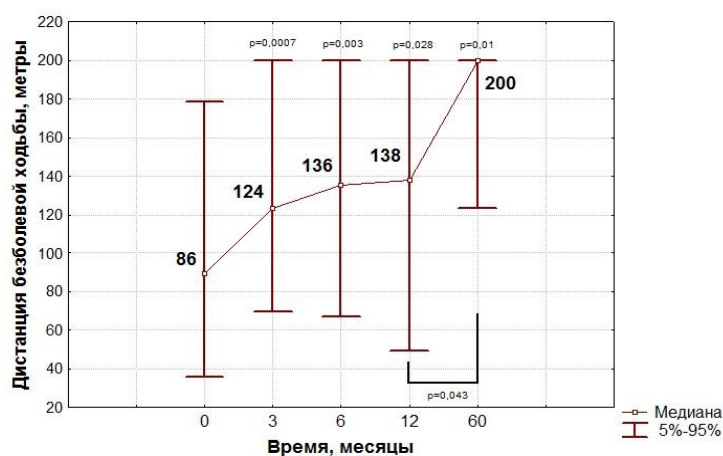


Рис. 2. Динамика дистанции безболевой ходьбы по результатам тредмил-теста.

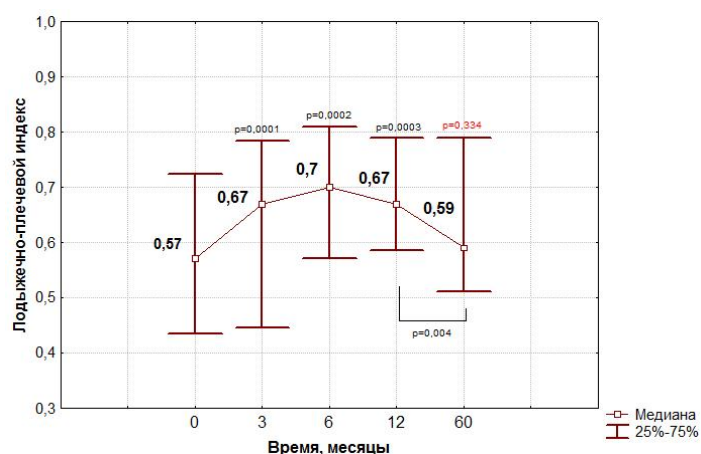


Рис. 3. Динамика изменения лодыжечно-плечевого индекса.

При анализе времени восстановления по методике И.И.Затевахина при включении в исследование все пациенты составляли так называемую группу «критического резерва» - не прошли 200 метров или имели время восстановления более 15,5 минут. По мнению И.И.Затевахина с соавторами (1999), такие пациенты имеют высокий риск развития КИНК и нуждаются в коррекции артериального притока. При

наблюдении пациентов после аутотрансплантации МПК отмечено поступательное перераспределение пациентов из группы с «критическим» в группу с «ограниченным резервом» ходьбы. Уже на сроке 3 месяца количество таких пациентов составило 20%, к 6 месяцам более 30%. На сроке 5 лет пациенты не испытывали проблем в выполнении тредмил-теста, то есть проходили дистанцию в 200 метров полностью, а значения времени восстановления исходного ЛПИ свидетельствовали об отсутствии функциональных нарушений и были близки к значениям нормы. Диаграмма времени восстановления представлена на рис.4.

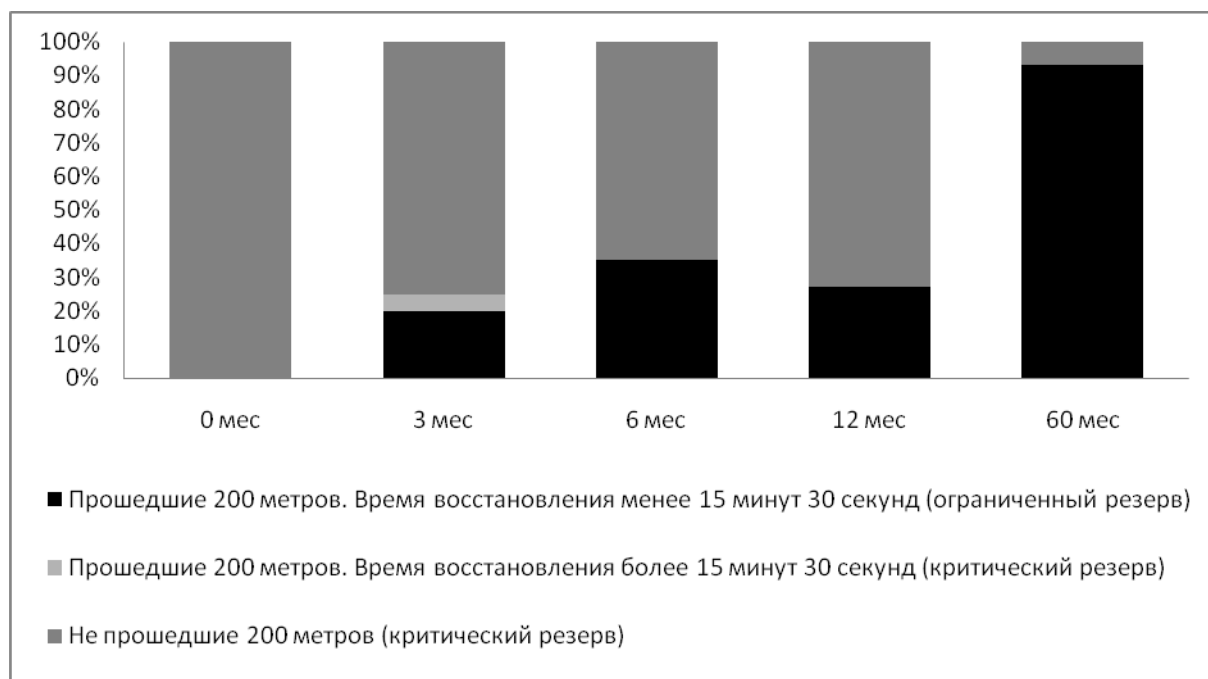


Рис. 4. Распределение пациентов по группам резерва ходьбы.

Результаты наблюдения за больными в отдаленном периоде позволяют говорить о стабильности достигнутого эффекта коллатеральной реваскуляризации. Причем если значения ЛПИ, характеризующие, прежде всего, проходимость магистральных артерий, возрастая к 6 месяцам, имели в дальнейшем тенденцию к снижению, то функциональные пробы, отражающие интегральное кровоснабжение конечности (дистанция безболевого ходьбы, время восстановления ЛПИ после нагрузки), имели отчетливую тенденцию к улучшению у 84,2% (16 из 19) обследованных больных.

Оценка изменений в клиническом статусе по R. Rutherford на сроке 3 месяца выявила отсутствие улучшения у 1 пациента, минимальное улучшение у 50%, уме-



ренное улучшение 42,8%, значительное улучшение у одного пациента. На сроке 6 и 12 месяцев группа с умеренным улучшением возросла до 53,8% и 70,8% соответственно. Два пациента имели стабильное значительное улучшение с 6 месяца. У 2 пациентов не отмечено улучшения, в связи с чем, им была выполнена повторная имплантация МПК, восстановленных из криохраниения. У одного пациента на сроке 60 месяцев отмечен регресс положительного эффекта аутотрансплантации до исходной симптоматики. Ухудшения клинического статуса после аутотрансплантации МПК нами не зафиксировано.

Дистальная ангиография выполнена 28 пациентам, исследованным на сроке 3 месяца. Осложнений местного или системного характера при выполнении ангиографии нами не зафиксировано. При оценке по адаптированной методике Vajanto I. медиана количества коллатералей достоверно увеличилась на 44,8% с 7,25 (25-75 перцентиль: 4,12-8,73) до 10,5 (25-75 перцентиль: 8,18-13,13) ( $p < 0,05$ ).

При анализе ангиограмм на сроке 3 месяца отмечено появление развитой коллатеральной сети и заполнение фрагментов берцовых артерий, которые на первичных ангиограммах не контрастировались (Рис. 5).

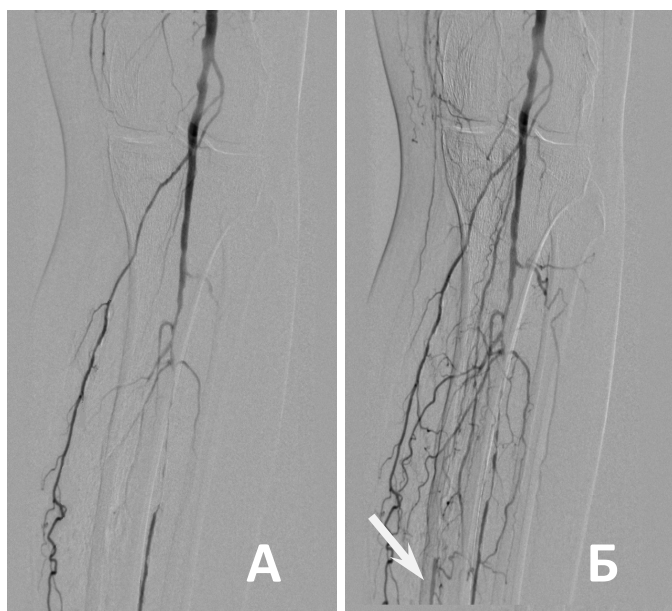


Рис. 5. Ангиография артерий голени пациента до ауто-трансплантации фракции МПК (А) и спустя 12 недель (Б). Стрелкой отмечена задняя большеберцовая артерия, отсутствовавшая на снимках до аутотрансплантации ГСК.

Таким образом, информативность первичных ангиограмм о проходимости берцовых артерий становится сомнительной, а контрастирование их на сроке 3 месяца, по-видимому, связано с развитием коллатерального кровоснабжения.

Для оценки динамики неоваскуляризации мышечной ткани мы применили

иммуногистохимическое исследование биоптатов икроножной мышцы, взятых перед аутотрансплантацией МПК и через 3 месяца. Определяли индекс К/М – соотношение количества капилляров к мышечным волокнам. Верификацию капилляров производили по результатам окрашивания с антителами к CD34, поскольку CD34, являясь маркером прогениторных клеток (в том числе клеток-предшественниц эндотелия), позволяет выявить капилляры на более ранней стадии развития.

Данные иммуногистохимических исследований позволяют утверждать, что источником коллатерального кровообращения, по крайней мере на ранних сроках (3 месяца) после имплантации, является неоангиогенез - соотношение К/М возросло через 3 месяца на 22,4% с 1,52 до 1,86;  $p=0,0005$  (рис. 6).

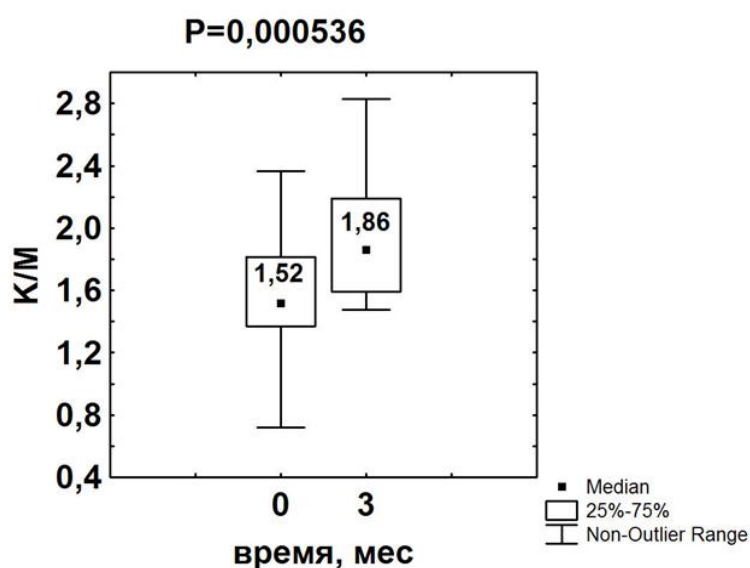


Рис. 6. Подсчет количества капилляров и мышечных волокон на срезах биопсий до и через 3 месяца после введения фракции МПК, окрашенных с антителами к CD34.

Как доказательство причинно-следственной связи между имплантацией ГСК и развитием коллатерального кровоснабжения, можно рассматривать и тот факт, что величина индекса К/М, то есть плотность капиллярной сети, имела положительную корреляцию с абсолютным числом ГСК, содержащихся во введенной в пораженную конечность фракции МПК ( $r=0,5$ ,  $p=0,03$ ) (рис. 7). Полученное нами уравнение регрессии позволяет ориентировочно прогнозировать плотность капиллярной сети (величину индекса К/М) в зависимости от числа трансплантированных ГСК. Исходя из полученного на основании формулы графика, следует, что для достижения значений  $K/M \geq 2$  в большинстве случаев требуется трансплантация не менее  $3 \times 10^7$  ГСК, что можно определить как минимальное «целевое значение». В

литературных данных в настоящее время отсутствуют данные о зависимости терапевтического эффекта от количества вводимых прогенеторных клеток. Есть указания лишь на то, что большее количество клеток CD34+ в трансплантате снижало риск ампутации и смерти у пациентов в отдаленном периоде (Onodera R., Teramukai S., Tanaka S., 2011). Таким образом, выявленная нами зависимость числа трансплантированных ГСК на плотность вновь образованной капиллярной сети, установлена нами впервые.

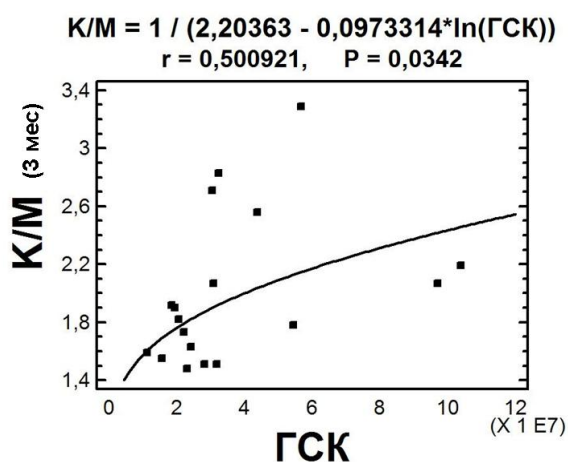


Рис. 7. Статистическая модель зависимости плотности капиллярной сети мышечной ткани от абсолютного числа трансплантированных ГСК.

Также нами получены данные об отрицательной корреляции между нейпоген-индуцированной стимуляцией лейкопоза и исходным временем восстановления ЛПИ. Таким образом, у пациентов с исходно меньшим резервом коллатерального кровоснабжения имеется меньшая эффективность мобилизации ГСК. Это заставляет задуматься о показаниях к клеточной терапии на более ранних стадиях заболевания.

Результаты нашего исследования показали эффективность и безопасность применения фракции МПК, обогащенной ГСК, для лечения хронической артериальной недостаточности ПБ степени (по классификации А.В.Покровского). Полученные данные позволяют утверждать, что морфологическим субстратом клинического улучшения является неоангиогенез.

## ВЫВОДЫ

1. Разработанная методика аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени является эффективной и безопасной. Осложнений, непосредственно связанных с применением методики, ни в раннем, ни в отдаленном периоде не зарегистрировано.
2. Предложенный метод позволяет получить клеточный материал объемом  $85,9 \pm 3,49$  мл, содержащий  $13,7 \times 10^9$  мононуклеарных клеток, из них  $47,4 \times 10^6$  жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток. Количество и объем полученного клеточного материала позволяет выполнить не только аутотрансплантацию, но и криоконсервирование клеточного материала.
3. Методика аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов с хронической артериальной недостаточностью IIБ степени приводит к стойкому и длительному улучшению функциональных параметров кровоснабжения конечности. Выявлено достоверное увлечение дистанции безболевой ходьбы на 55% на сроке 1 год и отсутствие симптомов перемежающейся хромоты у большинства пациентов на сроке 5 лет, во время как течение заболевания у пациентов на фоне стандартной терапии характеризуется прогрессивным снижением резервов коллатерального кровообращения.
4. Аутотрансплантация фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени стимулирует процесс ангиогенеза, что проявляется в увеличении плотности капиллярной сети на 22,4%. Степень увеличения плотности капиллярной сети положительно коррелирует с количеством гемопоэтических стволовых клеток в трансплантате.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложенная методика стимуляции ангиогенеза методом аутотрансплантации фракции моноклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками после их цитокиновой мобилизации, может быть рекомендована как один из способов лечения заболеваний периферических артерий в стадии перемежающейся хромоты.
2. Предложенная методика стимуляции и мобилизации гемопоэтических стволовых клеток может быть использована не только для лечения заболеваний периферических артерий, но для создания банка стволовых клеток.
3. Анализ динамики лейкоцитарного ответа на применение рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора в дозе 1 млн\кг массы тела может свидетельствовать о достаточности 3-х дневного курса стимуляции.
4. Положительная корреляция между количеством гемопоэтических стволовых клеток в аутотрансплантате и плотностью вновь образованной капиллярной сети свидетельствует о необходимости применения методик забора клеточного материала, позволяющих повысить мобилизацию гемопоэтических стволовых клеток в трансплантате, таких как цитокиновая мобилизация и иммуносепарация.
5. Отсутствие корреляции между возрастом и общим числом моноклеаров, возрастом и количеством гемопоэтических стволовых клеток в трансплантате указывают на возможность увеличения возрастного ценза при отборе пациентов для клеточной терапии заболеваний периферических артерий.

### Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

#### **А. В изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. Мавликеев М.О. Регенерация мышечной ткани и активация миосателлитоцитов при аутотрансплантации стволовых клеток периферической крови пациентам с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей / М.О. Мавликеев, Д.И. Андреева, И.М. Газизов, А.А. Гумерова, Т.С. Йылмаз, М.С. Калигин, Г.Г. Кундакчян, А.В. Максимов, Г.О. Певнев, М.В. Плотников, А.В. Таба-

накова, А.А. Трондин, А.П. Киясов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. - Т.4. - С.79-84.

2. Максимов А.В. Результаты применения аутологичных стволовых клеток периферической крови у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей / А.В. Максимов, А.П. Киясов, М.В. Плотников, С.Д. Маянская, И.И. Шамсутдинова, И.М. Газизов, М.О. Мавликеев // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2011. - №2. - С.11-15.

3. Плотников М.В. Отдаленные результаты трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток периферической крови у больных с заболеваниями периферических артерий / М.В. Плотников, А.В. Максимов, М.О. Мавликеев, И.М. Газизов, В.П. Тамакова, Г.В. Черепнев, И.И. Шамсутдинова, А.А. Гумерова, А.П. Киясов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. - №3. - С.133-136.

4. Плотников М.В. Лечение заболеваний периферических артерий с использованием прогениторных клеток / М.В. Плотников, А.В. Максимов // Практическая медицина. - 2014. - №4 (80). - С. 118-123.

**Б. В других изданиях:**

5. Максимов А.В. Первый опыт лечения дистальных форм облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей с применением аутологичных прогениторных клеток / А.В. Максимов, М.В. Плотников // Материалы научно-практ. конференции молодых ученых. - Казань, 2009. - С.244-245.

6. Плотников М.В. Первый опыт лечения дистальных форм облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей с применением аутологичных прогениторных клеток / М.В. Плотников // Материалы 21 (XXI) Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. - Самара, 2009 - С. 304.

7. Маянская С.Д. Результаты применения мононуклеаров периферической крови после цитокиновой мобилизации для лечения хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / С.Д. Маянская, А.В. Максимов, А.П. Киясов, М.В. Плотников, И.И. Шамсутдинова, И.М. Газизов, М.О. Мавликеев //

Материалы Межрегиональной междисциплинарной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ангиологии и сосудистой хирургии». - Казань, 2010. - С. 108-116.

8. Plotnikov M.V. Transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for peripheral arterial disease of the lower extremity / Plotnikov M.V., A.V. Maksimov, S.D. Mayanskaya, A.P. Kiyasov, I.M. Gazizov, M.O. Mavlikeev // Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery. – 2011. - Vol.12, Suppl.1. - P.S74.

9. Максимов А.В. Клеточная терапия ишемии конечностей: аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток стимулирует неоангиогенез у больных хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей / А.В. Максимов, А.П. Киясов, М.В. Плотников, С.Д.Маянская, И.И. Шамсутдинова, М.И. Газизов, М.О. Мавликеев, В.П. Тамакова, М.В. Панасюк, Г.В. Черепнев // Избранные главы фундаментальной и трансляционной медицины: монография (под ред. Р.И. Жданова и Н.А. Агаджанян). – Казань, 2012. – С. 382-389.

10. Плотников М.В. Отдаленные результаты применения аутологичных гемопоэтических стволовых клеток периферической крови у больных с заболеваниями периферических артерий / М.В. Плотников, А.В. Максимов, И.И. Шамсутдинова, М.О. Мавликеев, А.П. Киясов, Г.В. Черепнев, И.М. Газизов // Материалы XIX Всероссийского Съезда сердечно-сосудистых хирургов. - Москва, 2013. - С. 249.

11. Мавликеев М.О. Иммуногистохимический анализ мышечной ткани пациентов с хронической ишемией нижних конечностей после клеточной и генной терапии / М.О. Мавликеев, М.В. Плотников, А.А. Ризванов, И.И. Салафутдинов, И.М. Газизов, И.И. Шамсутдинова, А.В. Максимов, А.П. Киясов // Материалы 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в хирургии». - Санкт-Петербург, 2013. - С.55-57.

12. Плотников М.В. Применение аутологичных мононуклеаров периферической крови при лечении заболевания периферических артерий / М.В. Плотников, А.П. Киясов, А.В. Максимов, М.О. Мавликеев, И.М. Газизов, А.А. Гумерова, В.П. Тамакова, Г.В. Черепнев, И.И. Шамсутдинова // Материалы 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в хирургии». -

Санкт-Петербург, 2013. - С.78-81.

13. Мавликеев М.О. Генные и клеточные технологии в лечении хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / М.О. Мавликеев, М.В. Плотников, Г.Р. Гафиятуллина, А.И. Муртазин, А.А. Ризванов, И.И. Салафутдинов, И.М. Газизов, А.В. Максимов, А.А. Гумерова, А.П. Киясов // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». - Казань, Россия, 2014. - С. 133 (ISBN 987-5-00019-293-1).

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека  
 ГСК – гемопоэтические стволовые клетки  
 ДБХ – дистанция безболевого ходьбы  
 ЗПА – заболевания периферических артерий  
 К/М – соотношение капилляров к мышечному волокну  
 КИНК – критическая ишемия нижних конечностей  
 ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс  
 МПК - мононуклеары периферической крови  
 ОИМ – острый инфаркт миокарда  
 ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения  
 УЗИ – ультразвуковое исследование  
 ФГДС - фиброгастродуоденоскопия  
 ХСН – хроническая сердечная недостаточность  
 ЦДС – цветное дуплексное сканирование  
 ЭКГ – электрокардиограмма  
 ЭХО-КС – эхокардиоскопия  
 CD - мембранный белок, молекула межклеточной адгезии  
 VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста  
 vWF – фактор Виллебранда