

УДК 615.38:611.018.5:616.718:616-005.4

ОСОБЕННОСТИ ЗАГОТОВКИ И ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Каргин В.Д., Чечеткин А.В., Солдатенков В.Е., Бессмельцев С.С., Волошин С.В., Бураков В.В., Глазанова Т.В., Чубукина Ж.В., Павлова И.Е., Розанова О.Е.

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: RNIHT@mail.ru

Проведен анализ особенностей получения и применения аутологичных стволовых клеток у больных с критической ишемией нижних конечностей. Установлено, что процедура лейкоцитафереза на сепараторе клеток крови на 4-й день от начала введения филграстима позволяет у пациентов с ишемией нижних конечностей получать концентрат стволовых клеток периферической крови, годный для клинического использования, и не вызывает развития осложнений. Использование ультразвукового исследования для контроля введения концентрата стволовых клеток повышает безопасность клеточной терапии. Ближайшие и отдаленные результаты внутримышечного введения аутологичных стволовых клеток показывают благоприятное влияние на клиническое течение у пациентов облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей.

Ключевые слова: ишемия, аутологичные стволовые клетки, клеточная терапия, аферез стволовых клеток

FEATURES OF PREPARATION AND APPLICATION OF AUTOLOGIC BLOOD STEM CELLS IN PATIENTS WITH CHRONIC ISCHEMIA OF LOW EXTREMITIES

Kargin V.D., Chechetkin A.V., Soldatenkov V.E., Bessmeltsev S.S., Voloshin S.V., Burakov V.V., Glazanova T.V., Chubukina Z.V., Pavlova I.E., Rozanova O.E.

FSBI «Russian scientific research institute of hematology and transfusiology of Federal medical biologic agency», Saint Petersburg, Russia, e-mail: RNIHT@mail.ru

The analysis of features of preparation and application of autologous blood stem cells in patients with a critical ischemia of low extremities is carried out. It is established, that leukocytapheresis procedure by a separator of blood cells for 4-th day from the beginning of introduction filgrastim allows in patients with an ischemia of low extremities to receive a concentrate blood stem cells from peripheral blood, suitable for clinical use, and does not cause development of complications. Use of ultrasonic research for the control of introduction of a concentrate blood stem cells raises safety of cellular therapy. The nearest and remote results of intramuscular introduction blood stem cells show beneficial effect on clinical current at patients of obliterating atherosclerosis of vessels of low extremities.

Keywords: ischemia, autologous blood stem cells, cellular therapy, apheresis of blood stem cells

Медико-социальная значимость заболеваний периферических артерий (ЗПА) нижних конечностей определяется их общей распространенностью, составляющей 15-30% в популяции в зависимости от возраста [6], с развитием критической ишемии с частотой 500 на 1 млн. [8]. У 40-60% пациентов этой группы возможности хирургической реваскуляризации ограничены из-за декомпенсации дистального русла [1]. Одним из способов терапевтического ангиогенеза как методологии стимуляции естественных процессов компенсации нарушений коллатерального кровообращения конечности, является клеточная терапия аутологичными стволовыми клетками, являющимися, в том числе и стволовыми предшественниками эндотелиальных клеток (СПЭК), мобилизованными из костного мозга. Банк данных клинических исследований по стимуляции неоваскулогенеза постоянно

увеличивается. Однако многие вопросы оценки эффективности, анализа особенностей технологии мобилизации, эксплантации СПЭК, профилактики нежелательных явлений терапии далеки от оптимального решения [7]. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является существенным звеном программы получения ангиогенного трансплантата, способного стимулировать активацию образования новых сосудов в зоне ишемии. Наиболее часто в клинической практике в качестве мобилизующего агента используется гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). В зависимости от целевой программы сроки Г-КСФ-индуцированной стимуляции составляют 3-5 дней в дозе 10 г/кг в день [2]. Есть данные, указывающие, что у лиц пожилого возраста наблюдается обеднение количества циркулирующих эндотелиальных предшественников и их ангиогенного потенциала [3]. Следовательно, представляет интерес изучить Г-КСФ-индуцированный ответ у разных возрастных групп пациентов с хронической ишемией как возможного критерия ожидаемого эффекта клеточной терапии. Важным является характеристика переносимости такой трансфузиологической операции как аферез, так как реципиентами являются больные с выраженной сопутствующей патологией, прогрессирующим болевым синдромом. Другим актуальным вопросом технологии регенеративных методов лечения у пациентов с облитерирующими заболеваниями периферических артерий нижних конечностей с использованием аутологичных СКПК является оптимизация введения СКПК в анатомическое образование, перспективное для терапевтического неангиогенеза. Процедура введения аутологичного трансплантата должна обеспечивать минимальные потери стволовых клеток, точное введение в мышечные ткани и достаточное равномерное распределение концентрата клеток, отсутствие повреждения сосудов при пункции атрофированного мышечного массива.

Целью работы явилось исследование особенностей получения и применения аутологичных стволовых клеток у больных с критической ишемией нижних конечностей.

Материал и методы исследования. Под наблюдением находились 58 пациентов, разделенных на две группы. В первой группе (26 человек) в составе комплексной терапии применяли внутримышечное введение аутологичных стволовых клеток. Средний возраст больных I группы составил $60,9 \pm 7,7$ лет. По клиническим проявлениям ишемии нижних конечностей (классификация А.В.Покровского - Фонтейна) пациенты распределились следующим образом: Па ст. – 8 пациентов (25%); Пб ст. – 12 пациентов (45%); Пв ст. – 4 пациента (20%); IV ст. – 2 пациента (10%). Во второй (контрольной) группе (n=32) мужчин было 24 человека, женщин – 8. Средний возраст составил $59,5 \pm 5,1$ лет. Критерии включения в исследование: возраст старше 18 лет; клинические проявления ишемии конечности не менее 1 месяца Па-IV стадии по А.В. Покровскому-Фонтейну; проходимость

проксимального артериального русла; наличие неоперабельного (для выполнения открытой или чрескожной реваскуляризации) дистального поражения артерий нижних конечностей или анатомо-функциональной недостаточности коллатеральных путей кровотока. Противопоказания к включению в исследование: острый коронарный синдром или острое нарушение мозгового кровообращения в предшествующий месяц; стенокардия IV функционального класса (по NYHA), наличие инфекционных осложнений; наличие онкологических заболеваний, в т.ч. в анамнезе; тяжелая почечная и печеночная недостаточность; дыхательная недостаточность III ст; нефротический синдром; наличие алкогольной или наркотической зависимости; ВИЧ-инфекция. Процедура мобилизации СКПК у пациентов проводилась в соответствии с стандартным монорежимом с использованием филграстима (Г-КСФ). Выбранная доза филграстима – 10 мкг на килограмм массы тела больного вводилась подкожно в течение 3-х последовательных дней. Процедура лейкоцитафереза производилась на 4-й день от начала введения филграстима на аппарате Haemonetics MCS+ с использованием протокола PBSC (стволовые клетки периферической крови) через венозный доступ (кубитальная вена). Объем удаляемой плазмы был – 30 мл. В качестве антикоагулянта использовался АСД-А, соотношение антикоагулянта к объему крови – 1:9. Конечный объем продукта, содержащего СКПК и удовлетворяющий целям исследования, был 50-60 мл. Анализ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в периферической крови, в лейкоцитаферезном концентрате выполнялся с помощью проточной цитофлуориметрии. Исследование проводилось на проточном лазерном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США) с использованием набора реагентов «Stem-KIT Reagents» («Beckman Coulter», США). Анализ учета CD34+ клеток проводится в модифицированном протоколе ISHAGE. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием методов описательной статистики.

Результаты исследования и их обсуждение. Было проведено 26 операций афереза СКПК у 26 пациентов. Все операции проводились при условии достижения лейкоцитоза в периферической крови пациента не менее $10 \times 10^9/\text{л}$. Обязательным было во всех случаях проведение профилактики тромбэмболических осложнений с учетом нарастания лейкоцитоза в периферической крови (на 3 сутки стимуляции содержание лейкоцитов в периферической крови $37,6 \pm 5,9 \times 10^9/\text{л}$). Профилактика развития тромбэмболических осложнений проводилась с помощью низкомолекулярного гепарина (фраксипарин 0,6 мл или клексан 0,4 мл 1 раз в сутки подкожно). Всем пациентам в предоперационном периоде, как и пациентам группы контроля, проводилась комплексная терапия включающая метаболические средства (актовегин 1 г, цитофлавин 10 мл), антиагрегантные препараты

(клексан/ фраксипарин 0,3-0,6 мг, тромбоАСС 0,1 или кардиомагнил 0,15). Показатели проведенных операций афереза приведены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели афереза СКПК у пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий

Длительность афереза, мин	Объем сепарированной крови, мл	Объем концентрата СКПК, мл
72,7± 9,6	1715,7±198,5	48,4±16,1

Установлено, что средняя длительность афереза СКПК составляла 72,7 мин, за этот период времени было переработано 1715,7 мл крови для сепарации стволовых клеток. При этом нежелательные явления в виде усиление болевого синдрома в пораженной конечности наблюдались у 2 пациентов.

Исследование CD34+ клеток в периферической крови больных проводили до начала стимуляции Г-КСФ, в 1-й, 2-й, 3-й день стимуляции филграстимом и в продукте лейкоцитарного афереза (табл. 2).

Таблица 2

Содержание CD34+ клеток в периферической крови в ходе стимуляции, афереза и в концентрате СКПК у пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий

Группы пациентов	Содержание CD34+ клеток, %	Абсолютное содержание CD34+ клеток x10 ⁹ /л	Содержание лейкоцитов, x10 ⁹ /л	Жизнеспособность клеток, %
I группа пациентов				
до стимуляции Г-КСФ в периферической крови (исходные значения)	0,026 ± 0,004	0,0020 ± 0,0003	7,99 ± 0,58	98,1 ± 0,3
после стимуляции Г-КСФ в периферической крови	0,079± 0,012 *, **	0,044± 0,010 *, **	46,47 ± 6,45 *, **	98,3 ± 0,4
в продукте лейкоцитарного афереза	0,280 ± 0,044	0,779 ± 0,167	236,19±28,52	97,7 ± 0,9
II группа пациентов	0,032 ± 0,003	0,0040 ± 0,0010	9,07± ,57	97,7±0,3

Примечание: * - различия достоверны по отношению к показателям контрольной группы; ** - различия достоверны по отношению к исходным значениям.

Установлено, что относительное и абсолютное содержание CD34+клеток в периферической крови больных I группы до стимуляции Г-КСФ не различалось с показателями в контрольной (II) группе, p>0,05. После стимуляции содержание CD34+ клеток в периферической крови возрастало в среднем в 2,6 раза, а абсолютное – в 22 раза

($p < 0,05$). В продукте лейкоцитарного афереза отмечалось увеличение содержания СКПК по сравнению с показателями в периферической крови после стимуляции Г-КСФ. Так содержание CD34+ клеток в лейкоцитарном концентрате было в 3,5 раза больше, чем в периферической крови после стимуляции и более чем в 10 раз превышало показатели в периферической крови до стимуляции Г-КСФ. Жизнеспособность CD34+клеток во всех наблюдениях была выше 95%.

Хранение и маркировку концентрата СКПК осуществляли в соответствии с действующими нормативными документами как компонента аутологичной крови [4, 5]. 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 из 30 точек по 1 мл, под контролем ультразвукового исследования (УЗИ) (аппарат «Аloка 1700», программа MS, линейный датчик 7,5 МГц). Средняя доза введения СКПК пациенту составила $2,337 \times 10^7$ /л CD34+ клеток. Расстояние между пункциями и их глубина определялось под контролем УЗИ, что позволило контролировать введение СКПК строго субфасциально, определять глубину введения (от 10 мм до 15 мм) и распределение СКПК в мышечной ткани (феномен расслоения перистой структуры мышц), добиться равномерного распределения трансплантата по объему мышц без образования полостей накопления (псевдогематом), локализовать малую подкожную вену, мышечные артериальные ветви и избежать пункции сосудов.

Введение СКПК во всех случаях прошло без осложнений. В 2 случаях в ходе введения развился спастический синдром мышц обеих голеней, носивший характер диффузных фибрилляций. Данное состояние было расценено нами как проявление субкомпенсированной гипокальциемии в раннем постаферезном периоде, было эффективно купировано внутривенным введением 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 безболевого 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. Ультразвуковое исследование (лодыжечно-плечевой индекс и пальцевые артерии стопы) не выявило отрицательной динамики состояния кровообращения. Клинически в раннем посттрансплантационном периоде (1 месяц) отмечены признаки положительной

динамики критической ишемии: стихание болей в покое, купирования ригидности икроножных мышц, улучшение трофики стопы.

В сроки наблюдения до 2 лет 6 месяцев изучена эффективность применения пересадки полученных аферезом аутологичных стволовых клеток, достигнуто клиническое улучшение у 89,7% больных, не проводилось больших ампутаций и сохранена трудоспособность у работающей группы пациентов.

Выводы:

1. Процедура лейкоцитафереза на 4-й день от начала введения филграстима (10 мкг на килограмм массы тела) на аппарате Haemonetics MCS+ с использованием протокола PBSC (стволовые клетки периферической крови) позволяет у пациентов с ишемией нижних конечностей получать концентрат СКПК с содержанием CD34+ клеток $0,779 \pm 0,167 \times 10^9/\text{л}$, витальностью $97,7 \pm 0,9\%$.
2. Применение ультразвукового исследования повышает безопасность и эффективность введения СКПК в мышцы голени у пациентов с ишемией нижних конечностей.
3. Осложнений, связанных с лейкоцитаферезом и применением аутологичных стволовых клеток у пациентов, отобранных для клеточной терапии согласно предложенным критериям, не наблюдалось.

Список литературы

1. Казанчан П.О., Попов В.А., Дебелый Ю.В. и соавт. Хирургическая реваскуляризация при критической ишемии // Ангиология и сосудистая хирургия.- 2000.- № 3.- С. 32-35.
2. Куртова А.В., М.А.Эстрина, С.М. Алексеев и соавт. Экспрессия CXCR4 и эффективность мобилизации CD34+ гемопоэтических стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.- 2007.- № 3.- С.29-33.
3. Мавликеев М.О., Андреева Д.И., Газизов И.М. и соавт. Регенерация мышечной ткани и активация миосателлитоцитов при ауотрансплантации стволовых клеток периферической крови пациентам с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. -2010.- №. 4. С.79-84.
4. Организация и технологическое обеспечение аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Методические рекомендации.- СПб., 2011.- 49 с.
5. Приказ МЗ РФ от 2 апреля 2013 года № 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов».- М., 2013.- 32 с.
6. Савельев В.С., Кошкин В.М. Хроническая критическая ишемия нижних конечностей. – М.: Медицина, 1997.- С. 40.

7. Шойхет Я.Н., Хореев Н.Г. Клеточные технологии в лечении заболеваний периферических артерий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.- 2011.- № 3.- С. 15-23.
8. European working group on leg ischemia. Second European consensus document on chronic leg ischemia // Circulation.- 1991.- Vol. 84, № 1.- P. 1-26.

Рецензенты:

Бойченко Э.Г., д.м.н., зав.отделением онкологии, гематологии и химиотерапии, СПб ГБУЗ «Детская больница №1», г. Санкт-Петербург;

Скрябин О.Н., д.м.н., профессор, заместитель главного хирурга Комитета по здравоохранению Петербурга, СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки», г.Санкт-Петербург.