

Клеточные технологии в лечении терминальной стадии хронической ишемии нижних конечностей

А.Б. Смолянинов¹, Е.В. Пыхтин¹, Д.В. Булгин¹, М. Томонага²

¹Центр клеточной и генной терапии, Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия

²Департамент молекулярной медицины и гематологии, Медицинский факультет Университета Нагасаки, Япония

Cell technologies in the treatment of critical lower limbs ischemia

A.B. Smolyaninov¹, E.V. Pykhtin¹, D.V. Bulgin¹, M. Tomonaga²

¹Center of Cell and Gene Therapy, Stem cell Bank «POKROVSKI», St.-Petersburg, Russia

²Department of Molecular Medicine and Hematology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

В статье представлен обзор вариантов применения клеточных технологий в лечении терминальной стадии хронической ишемии нижних конечностей. Основным методом лечения сосудистых заболеваний нижних конечностей остается хирургическое вмешательство. Высокая эффективность применения хирургического метода, достигается при поражении магистральных артерий, в то же время, при поражении дистальных сегментов периферических артерий (облитерирующий эндартериит и тромбангиит – болезнь Бюргера) оперативное лечение мало эффективно вследствие повторного образования тромбов и последующего стенозирования. Основные усилия хирургов при лечении таких заболеваний направлены на обеспечение адекватного притока крови к дистальным отделам конечности и поддержания эффективной перфузии тканей. Этого можно достичь путем непрямой реваскуляризации. Помимо традиционных методов лечения, таких как остеотомия и поясничная симпатэктомия, в последнее время активно изучается возможность применения клеточных технологий для создания новых путей коллатерального кровообращения в конечности. Трансплантация больному его собственных стволовых клеток стимулирует ангиогенез в ишемизированных тканях. Проведенные экспериментальные и клинические исследования в этой области подтверждают высокую эффективность и безопасность трансплантации стволовых клеток больным с данной патологией. Однако есть неразрешенные вопросы, касающиеся «качества» и количества клеток, необходимых для образования новых сосудов.

Ключевые слова: терминальная стадия хронической ишемии нижних конечностей, трансплантация стволовых клеток, костный мозг, предшественники эндотелиоцитов.

Клиническая картина хронической ишемии нижних конечностей может быть обусловлена как изолированными, так и сочетанными окклюзиями брюшной аорты, ее бифуркации, подвздошных и бедренных артерий, а также артерий голени и стопы. Основными морфологическими проявлениями хронической ишемии нижних конечностей являются облитерирующий атеросклероз, эндартериит и тромбангиит (болезнь Бюргера). В терминальной стадии этих заболеваний развивается состояние, известное как «критическая ишемия нижних конечностей» (КИНК) [1]. Согласно определению Российского консенсуса по диагностике и лечению пациентов с критической ишемией, European Consensus и Trans Atlantic Inter-Society Consensus (TASC), основными клиническими признаками КИНК являются: наличие хронической артериальной недостаточности нижних конечностей, постоянная боль в покое, требующая обезболивания, в течение 2 недель и более, трофическая язва или гангрена пальцев или стопы [2–4].

КИНК соответствует III Б и IV стадиям ишемии по классификации Покровского–Фонтейна [4]. Основными факторами риска развития обструктивного поражения периферических

This article presents reviews application of cell technologies in the treatment of critical limb ischemia. Surgery treatment remains a basic method in the treatment of vascular obliterans limb diseases. In our days surgical methods are known as the most effective treatment of main artery atherosclerosis, but this kind of treatment is not so good for treatment peripheral arterial diseases such as thromboangitis obliterans (Buerger's disease) because of often restenosis and rethrombosis development. Principal purpose efforts of surgeons according on ensuring of adequate blood flow in terminal parts of limb and also on support effective perfusion of tissue. This aim could be obtain due to undirected revascularization. Recently thanks to development of cells technologies on a level with osteothrepanation and lumbal sympathectomy it became possible to create new ways of roundabout blood flow in ischemic limb. Autological stem cells transplantation to patients with critical ischemic limb provides an appearance of new sites revascularization. In last years experimental and clinical studies in this area confirm safety and efficiency of the stem cells transplantation to patients with ischemic limb disease. However, few questions about quality and quantity of stem cells which are necessary for appearance revascularization remain unknown.

Key words: critical limb ischemia, stem cells transplantation, bone marrow, endothelial progenitors.

сосудов являются: курение, сахарный диабет, гиперхолестеринемия, артериальная гипертензия [4–6].

По результатам национального исследования, проведенного Ангiologyческим Советом Великобритании (1996–2006), частота КИНК составляет 400 больных на 1 млн населения в год [7]. Если учесть, что 3% населения страдают перемежающейся хромотой и у 5% из них в течение 5 лет может развиться КИНК, то частота равна 300 случаев на 1 млн населения в год. Около 90% всех ампутаций выполняется по поводу выраженной ишемии нижних конечностей. 25% пациентов с КИНК проводится ампутация конечности на уровне голени или бедра [6].

Наравне с характерными клиническими проявлениями хронической артериальной недостаточности нижних конечностей (боль в покое, «перемежающаяся хромота», бледность и похолодание кожных покровов, трофические нарушения) существуют инструментальные методы диагностики, позволяющие объективно оценить уровень дефицита артериального кровотока. Первостепенным и наиболее важным показателем, объективно оценивающим состояние гемодинамики при КИНК, является лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ).

Нормальными считаются значения ЛПИ выше 0,9. При КИНК лодыжечное давление < 50 мм рт. ст., пальцевое давление < 30–50 мм рт. ст., ЛПИ < 0,4 [7].

Несмотря на простоту в диагностике КИНК, лечение этого состояния зачастую сопровождается определенными трудностями. Больные с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний – это, как правило, пожилые и ослабленные люди. У пациентов с сахарным диабетом КИНК наблюдается примерно в пять раз чаще, а трофические нарушения развиваются у 10% пациентов [11].

Во всех случаях основной целью лечения КИНК является реваскуляризация тканей. Она может быть достигнута путем формирования шунта «в обход» места окклюзии сосуда, либо ангиопластикой (тромбэндартерэктомия, стентирование и баллонная дилатация просвета сосуда, лазерная абляция атеросклеротических бляшек и др.) [3, 8–11]. Анализ данных, полученных после шунтирующих операций и чрескожной транслюминальной ангиопластики, не выявил значимых различий в летальности [12].

Летальность после реконструктивных операций составляет 2–13%, а частота ампутаций – до 10%. В сроки до 10 лет проходимость сосудистых протезов сохраняется в аорто-подвздошном сегменте у 80–90% пациентов. Результаты внеполостных операций хуже: через 3 года проходимость 60–70% бедренно-бедренных шунтов и 64% подмышечно-бедренных шунтов [13]. По данным Согласительного документа Российского общества сердечно-сосудистых хирургов, при КИНК через 1 год после бедренно-подколенного шунтирования аутологичной веной сохраняется проходимость 75% шунтов, протезом – 65%. После бедренно-тибиального шунтирования аутологичной веной сохраняется проходимость 70% шунтов и 40% протезов. Результаты ангиопластики показывают, что через 2 года проходимость 85% подвздошных артерий и лишь 50% бедренных и подколенных артерий.

Ситуация осложняется еще и тем, что КИНК в большинстве случаев обусловлена тяжелым и диффузным поражением периферических артерий конечности, часто сочетающимся с выраженным дефицитом кровотока на уровне микроциркуляторного русла. В условиях поражения дистального сегмента конечности и микроангиопатии, а также при неэффективности ранее проведенной реваскуляризации, медикаментозное лечение остается единственным доступным вариантом лечения до ампутации. У пациентов с КИНК при отсутствии условий для «прямой» реваскуляризации стандартная консервативная терапия малоэффективна. В ближайшие сроки от начала лечения положительный результат отмечается лишь у половины пациентов, а 1/3 пациентов являются кандидатами на ампутацию.

Однолетняя выживаемость больных, перенесших ампутацию на уровне голени, составляет около 30%. Смертность остается главной проблемой в этой группе пациентов, 30–40% из них живут менее 5 лет, а при КИНК, сочетающейся с язвами или гангреной, процент летальности еще выше [9]. По данным TASC, среди пациентов с КИНК от 10 до 30% живут не более 6 месяцев, а 25–30% пациентов может потребоваться «массивная» ампутация [3]. Прогноз после ампутации также неутешителен: ранняя послеоперационная летальность составляет около 5–10% после ампутации на уровне голени, и 15–20% после ампутации на уровне бедра. Из пациентов, перенесших операцию, около 30% умирают в ближайшие 2 года. Повторная ампутация требуется 1/3 больных. Полная реабилитация может быть достигнута менее, чем у половины из них [2, 14].

Большое внимание в настоящее время уделяется определению места не прямых методов реваскуляризации в лечении КИНК. Наиболее часто используемыми операциями являются поясничная симпатэктомия (ПСЭ) и реваскуляризирующая

остеотрепанация. В качестве самостоятельных методов лечения они используются только при невозможности выполнения прямых реконструктивных вмешательств. В ближайший послеоперационный период ПСЭ эффективна у 45% пациентов, а спустя 4 года она позволяет сохранить конечность лишь у 35% пациентов. Положительный эффект при проведении остеотрепанации наблюдается в 28% случаев, у 50% из которых сохранность конечностей наблюдается спустя 4 года. Несколько лучшие результаты наблюдаются при сочетании обеих методик: спустя 4 года удается сохранить конечность более чем у 60% пациентов [15]. Сочетание методов не прямой реваскуляризации с реконструктивными операциями (особенно в случае повторного их выполнения) также дает хороший терапевтический эффект [16]. Продолжается поиск альтернативных путей реваскуляризации ишемизированных тканей. Одним из путей стимуляции неоангиогенеза может быть применение клеточных и генных технологий [16].

Биологические и патофизиологические основы клеточной терапии критической ишемии нижних конечностей

В последнее время были проведены исследования, которые показали, что образование кровеносных сосудов в постнатальном периоде обусловлено наличием клеток-предшественников эндотелиальных клеток (ЭК) в стенках сосудов [7]. Есть все основания полагать, что эти клетки-предшественники могут сохраняться на протяжении всей жизни организма и принимать участие в обновлении сосудов [17–19].

Формирование новых сосудов – неоангиогенез, во взрослом организме рассматривается как результат пролиферации, миграции и ремоделирования уже имеющихся зрелых ЭК [20]. В неоваскуляризации участвуют предшественники эндотелиоцитов (ПЭ) CD34⁺ фракции стволовых клеток периферической крови взрослых после их мобилизации из костного мозга (КМ) [7, 19, 21, 22] (рис. 1).

В этом контексте, терапевтический неоангиогенез представляется важной стратегией спасения тканей при КИНК [23–26].

Быстрая реваскуляризация в поврежденных (ишемизированных) и в регенерирующих органах чрезвычайно важна для восстановления функций. Сосудистая травма или ишемия тканей активирует каскад молекулярно-генетических реакций, главным результатом которых является мобилизация из КМ и других источников предшественников эндотелиальных клеток, обеспечивающих реваскуляризацию за счет образования новых сосудистых формаций [25–31].

Проведенные исследования показали, что клетки КМ участвуют в неоангиогенезе при заживлении ран [31–41] и ишемии нижних конечностей [31, 32], эндотелизации сосудистых протезов [42–45], при атеросклерозе [7, 46], васкуляризации в период постнатального роста [47] и при опухолевом росте [33, 48–52].

Эти исследования свидетельствуют, что во время повреждения сосудов или регенерации органа, происходит высвобождение цитокинов, которые опосредуют миграцию ПЭ и циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в зону неоангиогенеза. Например, тканевая ишемия приводит к включению сосудистых факторов, таких как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), который, связываясь с рецепторами (VEGF-R2 и VEGF-R1) клеток, участвующих в неоангиогенезе, обеспечивает миграцию последних в зону повреждения. Быстрое внедрение клеток в зону неоангиогенеза ускоряет восстановление сосудов, позволяет избежать потенциальных сосудистых осложнений: вторичного тромбоза и гипоксии.

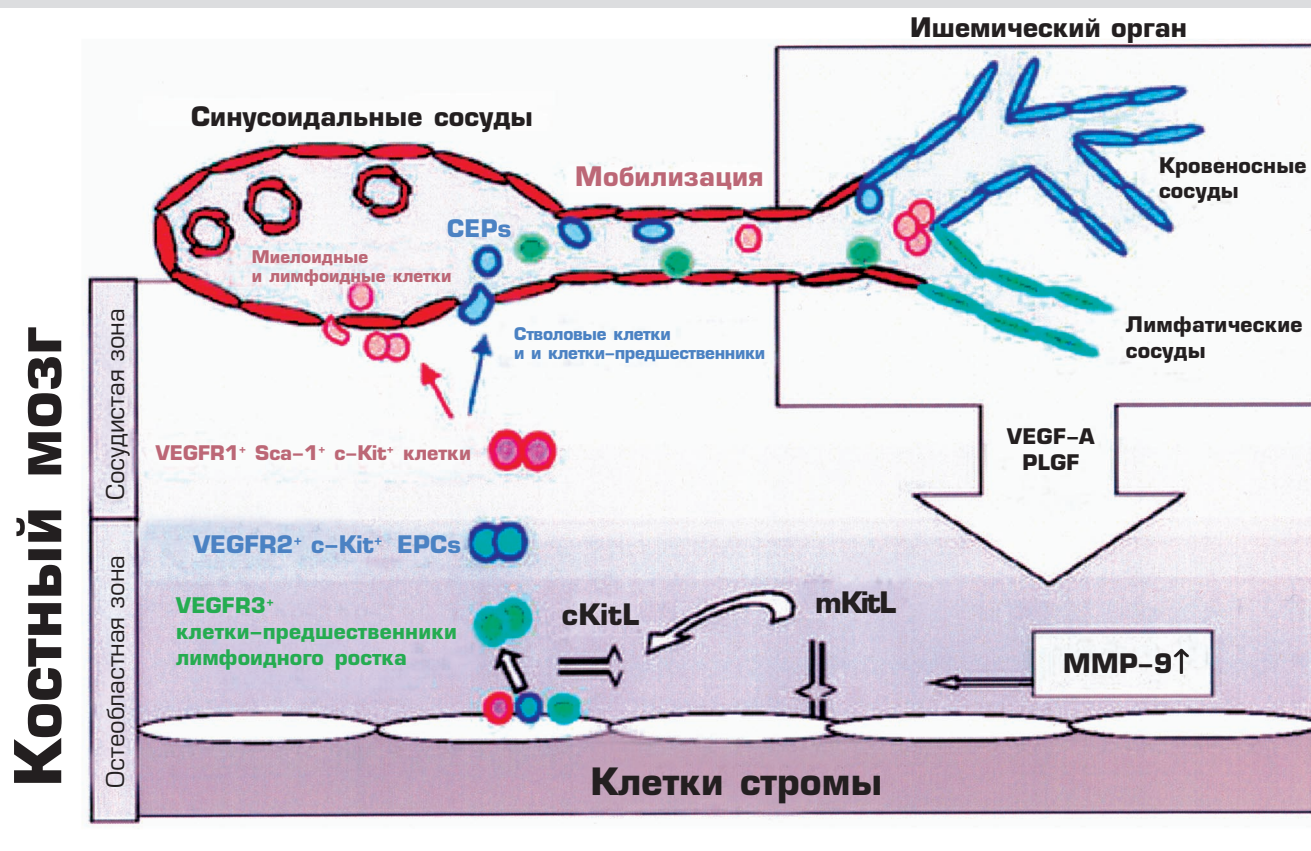


Рис. 1. Межклеточные взаимоотношения и молекулярные механизмы мобилизации эндотелиальных, лимфатических, стволовых гематопозитических и прогениторных клеток. Повреждение стенки сосуда приводит к повышению уровня сосудистых факторов роста, включая VEGF-A и PLGF, которые активируют MMP-9. MMP-9 усиливает биодоступность цитокинов, активных в отношении стволовых клеток, sKit-лиганда, активирует циркуляцию и пролиферацию VEGF-R1⁺c-Kit⁺ гематопозитических клеток, VEGF-R3⁺ лимфоцитов и VEGF-R2⁺c-Kit⁺ клеток-предшественников эндотелиоцитов. Увеличение количества циркулирующих стволовых клеток приводит к появлению клеток-предшественников в зонах ангиогенеза. Содружественная мобилизация проангиогенных VEGF-R1⁺ стволовых гематопозитических клеток-предшественников может усиливать функциональное внедрение VEGF-R2⁺ клеток-предшественников эндотелиоцитов в зоны ангиогенеза. Syk⁺ and SLP-76⁺ гематопозитические клетки участвуют процессах регуляции образования кровеносных и лимфатических сосудов

В настоящее время активно разрабатываются технологии получения сосудистых факторов, которые способны ускорять процессы ревазуляризации тканей [52–59]. Патологические изменения в сосудах и в тканях в большинстве случаев обусловлены недостаточным количеством в зоне повреждения резервных ЭК, которые в норме способны самостоятельно восстанавливать васкуляризацию (см. рис. 1). Таким образом, появилась потребность в дополнительных факторах, способных восстановить васкуляризацию. На роль одного из таких факторов могут претендовать ПЭ.

Исследования последних лет доказали, что в КМ находятся сосудистые прогениторные клетки, которые могут поступать в зону ишемии и принимать участие в процессах ревазуляризации [5].

Участие клеток костного мозга в атеросклерозе и артериосклерозе

Патологическая пролиферация гладкомышечных клеток (ГМК) приводит к изменениям интимы, существующей до формирования атероматозной бляшки, рестеноза после ангиопластики, а трансплантация приводит к зависимой васкулопатии.

Опыты на животных доказали, что гемопоэтические клетки фенотипа Sca1⁺cKit⁺Lin[−] дифференцируются в ГМК и участвуют в рестенозе после ангиопластики, васкулопатии протеза и

атеросклерозе [85]. Механическое повреждение бедренной артерии также приводит к мобилизации клеток костного мозга, отвечающих за пролиферацию ГМК. Получены доказательства участия клеток КМ в образовании атероматозных бляшек в сосудах человека [86].

Рекрутинг ЭК и ГМК из костного мозга либо из донорского трансплантата зависит от основной имеющейся патологии. На моделях атеросклеротического поражения сосудистого протеза большинство ЭК и ГМК были выделены из сосудов хозяина с минимальным участием прогениторов КМ [88]. Однако степень участия клеток КМ может варьировать в зависимости от тяжести сосудистой травмы [93]. Механическая травма сосуда приводит к глубокому проникновению клеток КМ в поврежденную интиму. Каждый инсульт приводит к высвобождению специфических факторов, которые способствуют гиперплазии интимы. Это возможно при тяжелой сосудистой травме и в случае иммуно-опосредованной трансплантационной васкулопатии [87], приводящей к высвобождению цитокинов, которые индуцируют мобилизацию клеток КМ. Были изучены возможности клеток линии Sca1⁺cKit⁺Lin[−] дифференцироваться в разные ткани, включая ЭК и ГМК [89, 94, 95]. Однако, для подтверждения участия клеток КМ в образовании функционально полноценных артерий необходимо проведение дополнительных исследований.

Роль предшественников эндотелиоцитов в васкуляризации тканей

Обновление сосудов происходит посредством мобилизации ПЭ и ЦПЭ. Исследованиями, выполненными молекулярно-генетическими методами, доказали возможность поступления ПЭ КМ в ишемизированные конечности мышей [19, 39, 66]. Другие исследования показали, что трансплантация зрелых эндотелиоцитов, полученных при культивировании *in vitro* мультипотентных предшественников стволовых клеток взрослого организма, выделенных из костного мозга, значительно ускоряет процессы реваскуляризации тканей [22, 67]. Заслуживает внимания экспериментальная работа по замещению у взрослой собаки грудного отдела аорты дакроновым протезом. Перед протезированием собаке выполнялась пересадка аллогенного костного мозга. Через 3 месяца в протезе определялся рост эндотелиальных клеток [43, 66].

Уменьшение содержания ЦЭК в кровотоке коррелирует с высоким уровнем сердечно-сосудистых осложнений [87]. J. Hill et al. [2003] предположили, что снижение уровня ЦЭК ухудшает восстановление поврежденных сосудов [85]. Однако патофизиологическая роль ЦЭК КМ до сих пор не определена.

Трансплантация клеток костного мозга в лечении критической ишемии нижних конечностей

В экспериментальных моделях КИНК для неоангиогенеза были использованы различные типы клеток. Исследования показали, что в ангиогенезе могут участвовать мононуклеарные клетки (МНК) КМ [58, 63], гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) [72–74], мобилизованные эндотелиальные прогениторные клетки [19, 39, 77], клетки стромы костного мозга [75], стволовые клетки, выделенные из жировой ткани [76].

В доклинических исследованиях введение предшественников эндотелиоцитов ускоряло формирование коллатеральных сосудов, минимизируя при этом зону ишемического повреждения [58, 60, 63]. Механизмы участия ПЭ в васкуляризации тканей человека окончательно не изучены. Основная причина – трудности в выделении и распознавании ПЭ и ЦЭК вследствие отсутствия специфических эндотелиальных маркеров и невозможности отличить эти клетки от зрелых эндотелиоцитов сосудистой стенки. Более того, подгруппа миело-моноцитарных клеток может быть неправильно интерпретирована как ПЭ или ЦЭК, поскольку они тоже экспрессируют эндотелий-специфические антигены [90, 91].

ПЭ, выделенные из костного мозга, ЦЭК и зрелые эндотелиоциты, выделенные из сосудистой стенки, экспрессируют схожие эндотелий-специфичные маркеры, включая VEGF-R2, Tie-2, сосудистый эндотелиальный кадгерин (VE-cadherin), CD34⁺, CD146⁺ и E-селектин [19, 39, 41, 91, 92]. Различие между ПЭ, ЦЭК и ЭК также осложняется тем, что ГСК экспрессируют маркеры, сходные с теми, которые экспрессируют ЭК, включая CD34⁺, PECAM (CD31⁺), Tie-2, фактор Виллибранда и VEGF-R1.

Проведенные клинические исследования определили высокий потенциал клеток КМ в восстановлении васкуляризации ишемизированных тканей (рис. 2, рис. 3) [33, 59, 61–63, 81].

Успех этой стратегии зависит от определения механизмов, посредством которых стволовые и прогениторные клетки проходят молекулярные перестройки, необходимые для их направленной пролиферации, мобилизации и дифференцировки, и тем самым определяется их функциональное поведение в тканях взрослого организма.

До имплантации

24 недели после

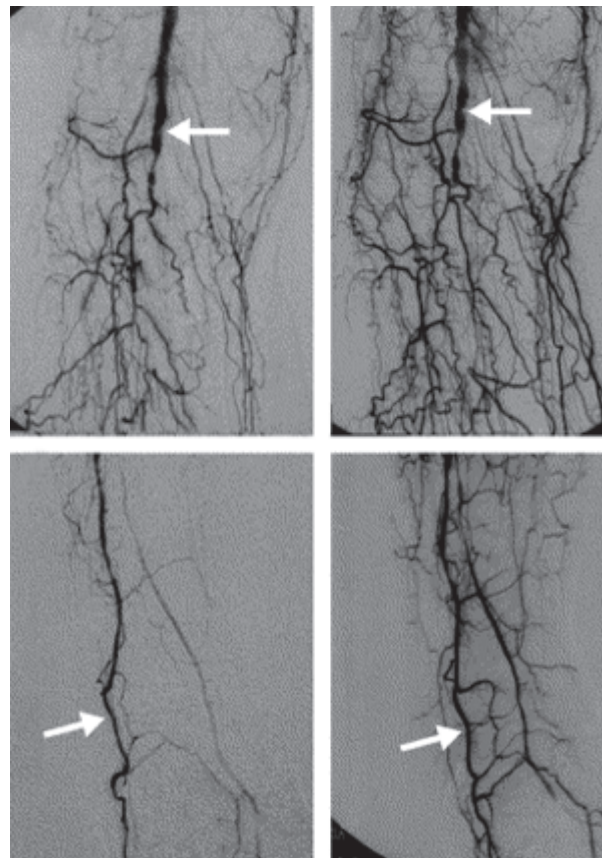


Рис. 2. Ангиограммы больного с поражением дистальных сосудов нижней конечности до и после (через 24 недели) имплантации мононуклеарных клеток, выделенных из костного мозга.

Введение мононуклеарных клеток стимулирует ангиогенез в тканях нижней конечности

До имплантации

8 недель после



Рис. 3. Пример заживления длительно существующих трофических язв после проведения клеточной трансплантации аутологичными мононуклеарными клетками, выделенными из костного мозга больного с критической ишемией нижних конечностей

Первое клиническое исследование по применению стволовых клеток в лечении КИНК опубликовано в 2002 г. E. Tateishi-Yuyama et al., которые исследовали эффективность и безопасность имплантации аутологичных МНК из КМ больным с КИНК [67]. Под общей анестезией они аспирировали 500,0 мл КМ из гребня подвздошной кости. Через 3 часа после аспирации фракция изолированных МНК была введена в икроножные мышцы посредством 40 инъекций по 0,75 мл. Количество введенных клеток составило $0,7-2,8 \times 10^9$. Пациентов разделили на 2 группы. Первой группе вводили МНК, выделенные из КМ, второй группе вводили МНК, выделенные из КМ, в мышцы одной конечности, а в мышцы другой конечности вводили ГСК после стимуляции G-CSF. Результатом лечения через 4 недели было появление коллатералей, повышение чрезкожного напряжения кислорода, уменьшение болей и увеличение времени ходьбы до появления болей. Во второй группе значительное улучшение перечисленных параметров было в области введения МНК КМ. Осложнений, связанных с проведенным лечением, отмечено не было. Исследование показало, что трансплантация аутологичных МНК КМ является безопасной и эффективной процедурой для проведения терапевтического ангиогенеза.

В двух других исследованиях пациентам с КИНК производилась трансплантация предшественников ЭК в сочетании с введением сосудистых факторов роста. Получен стойкий эффект спустя 6 месяцев с момента трансплантации. Авторы также указывают на безопасность и эффективность данной методики [68, 69]. Аналогичное по методике исследование проведено группой под руководством K. Esato (2002). Ими проведена трансплантация МНК, выделенных из костного мозга 8 больных с хроническими обструктивными заболеваниями артерий нижних конечностей, осложненных образованием трофических язв [76]. В сроки до 6 месяцев от начала терапии наравне с клиническим улучшением и исчезновением большинства симптомов отмечено заживление язв.

P. Huang et al. (2004) предложили другой подход к аутологичной трансплантации МНК, мобилизованных в периферическую кровь посредством G-CSF [77]. В исследовании приняли участие 5 человек, страдающих облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей III и IV степени. Все пациенты имели трофические нарушения в виде язв или гангрены. Этим пациентам в течение 5 дней подкожно вводили G-CSF в дозе 600 м/сут [78]. Для снижения потенциального риска артериального тромбоза на фоне введения G-CSF пациентам вводили гепарин в дозе 10000 ЕД/сут. Стимуляция G-CSF позволила увеличить содержание CD34⁺ клеток в периферической крови в 100 раз. После стимуляции из периферической крови пациентов была получена суспензия 300 мл, содержащая фракцию МНК, обогащенную CD34⁺. Методика введения МНК аналогична описанной ранее. Через 3 месяца наблюдений основные клинические симптомы значительно улучшились более чем у половины больных. При ангиографии отмечалось существенное улучшение коллатерального кровотока.

N. Van Royen et al. (2003) было проведено пилотное исследование, которое заключалось в проведении монотерапии G-CSF у пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей. Были получены хорошие результаты, дающие место данному методу лечения среди других методов не прямой реваскуляризации [79].

Все исследования, изучающие влияние трансплантации прогениторных сосудистых клеток на неоангиогенез при КИНК, так или иначе базируются на введении МНК КМ большей или меньшей степени «чистоты». Способы доставки в основном представлены внутримышечным и внутрисосудистым

введением. Разработка способов идентификации ПЭ и ЦЭК позволила ряду исследователей провести трансплантацию тканеспецифичных клеток [33, 35, 63].

Большинство исследований указывают на стойкий положительный эффект после аутологичной трансплантации СК больным с КИНК в сроки до 6–8 месяцев. В 2006 году учеными из Японии закончено пилотное исследование по оценке отдаленных результатов трансплантации МНК больным с облитерирующим тромбангиитом [80]. Из 8 пациентов, вошедших в исследование, трое отмечали непрекращающиеся боли в конечности, кроме того, у всех пациентов имело место язвенное поражение конечности. Через 4 недели отмечено улучшение клинического статуса у всех пациентов. Полное заживление язв произошло у 7 из 8 пациентов. Восстановление кровоснабжения в ишемизированных тканях нижних конечностей зависит от баланса между образованием кровеносных и лимфатических сосудов. Дисфункция лимфатической системы приводит к отеку, который является причиной длительно незаживающих язв. Введение VEGF-C ускоряет восстановление функции ишемизированной нижней конечности посредством увеличения скорости образования лимфатических и кровеносных микрососудов и уменьшением отека [81–83].

Нетромбогенные сосудистые протезы

Недавно в хирургическом лечении атеросклероза коронарных артерий были применены аутологичные сосудистые протезы. Как альтернатива этому, биodeградирующая матрица обеспечила адекватную замену для сосудов большого калибра. Однако осложняющим фактором является образование тромбов на поверхности матрицы из-за контакта с кровью. Один из способов использования эндотелиальных прогениторных клеток — это образование нетромбогенных сосудистых клеток, которые бы покрывали поверхность сосудистого протеза. В одном из исследований клетки КМ были внедрены в синтетический протез перед пересадкой его внутрь аорты собаки, что привело к формированию нетромбогенной эндотелизированной поверхности [95].

Аутологичные ЦЭК также дифференцировались *in vitro* до зрелых эндотелиоцитов и последовательно «заселяли» протезы в сонных артериях. Это привело к образованию нетромбогенных функционально полноценных сосудов, которые оставались интактными на протяжении 120 дней, в противоположность тому, что в сосудистых протезах без эндотелиальной выстилки формировались тромбы. Сократимость и кислород-зависимая релаксация, измеряемые через 120 дней *in vivo*, были сходными с таковыми в нормальных артериях. Эти данные свидетельствуют о том, что предварительная выстилка сосудистых протезов эндотелием из выделенных ПЭ и ЦЭК облегчает ремоделирование *in vivo*, способствует формированию нетромбогенных эндотелизированных поверхностей.

Клинические осложнения, связанные с лечением стволовыми клетками

Внутривенное введение проангиогенных ПЭ и ЦЭК и ГСК может иметь неблагоприятные эффекты. Ряд исследований показали, что у мышей с гиперхолестеринемией, VEGF-A и иммунокомпетентные клетки могут ускорять образование атероматозных бляшек посредством мобилизации ПЭ и моноцитов [96, 97]. Избежать этих потенциальных осложнений можно путем введения ПЭ, ЦЭК, ГСК и гематопозитических прогениторных клеток непосредственно в места повреждения ткани, избегая нежелательного заселения клетками других мест.

Что является более предпочтительным – внутрисосудистое или внутримышечное введение стволовых клеток?

Путь введения СК оказывает важное влияние на васкуляризацию тканей. Экспрессия молекул матрикса и адгезия к поврежденными тканями обеспечивают захват рецепторами мобилизованных ЦЭК, ГСК и гемопоэтических прогениторных клеток при их внутрисосудистом введении.

В настоящее время установлено, что после повреждения сосудистой стенки ПЭ спонтанно поступают в кровоток [98–100]. Возникает вопрос, почему мобилизация этих клеток автоматически не восстанавливает реваскуляризацию тканей и почему необходимо введение этих клеток инъекционным методом? Это объясняется тем, что ПЭ не достигают той степени дифференцировки, которая обеспечивает их внедрение в ишемизированную ткань. Альтернативным объяснением является то, что недостаточность кровотока в ишемизированной ткани мешает этим клеткам распознать поврежденные сосуды. Непосредственное введение ПЭ в зону повреждения позволяет обойти эти препятствия.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. М.: Медицина; 1997.
2. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia. Circ. 1999; 84(IV): 1–26.
3. Dormandy J.A., Rutherford R.B. Management of peripheral arterial disease. TASC Group. Trans Atlantic Inter-Society Consensus. J. Vasc. Surg. 2000; 31: 1–296.
4. Смолянинов А.Б. Современные биотехнологические центры клеточных и генных технологий и банки стволовых клеток. Технология чистоты 2006; 1: 4–5.
5. Смолянинов А.Б., Жарова Е.В., Козлова К.Л., Кириллова Д.А. Основы клеточной и генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. М.; 2005.
6. Baumgartner I., Schainfeld R., Graziani L. Management of peripheral vascular disease. An. Rev. Med. 2005; 56: 249–72.
7. Vascular Society of Great Britain and Ireland. B. J. Surg. 2007; 94: issue 2: 1–13.
8. Emmerich J. Current state and perspective on medical treatment of critical leg ischemia: Gene and cell therapy. Int. J. of Lower Extremity Wounds 2005; 4: 234–41.
9. Dorros G., Jaff M.R., Dorros A.M. et al. Tibioperoneal (outflow lesion) angioplasty can be used as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: five-year follow-up. Circ. 2001; 104: 2057–62.
10. Kudo T., Chandra F.A., Ahn S.S. The effectiveness of percutaneous transluminal angioplasty for the treatment of critical limb ischemia: a 10-year experience. J. Vasc. Surg. 2005; 41: 423–35.
11. Faglia E., Dalla Paola L., Clerici G. et al. Peripheral angioplasty as the first-choice revascularization procedure in diabetic patients with critical limb ischemia: prospective study of 993 consecutive patients hospitalized and followed between 1999 and 2003. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2005; 29: 620–7.
12. Leng G.C., Davis M., Baker D. Bypass surgery for chronic lower limb ischemia. Cochrane Database Syst. Rev. 2000; CD 002000.
13. Бураковский В.И., Бокерия Л.А. Сердечно-сосудистая хирургия. М.: Медицина; 1989.
14. Schainfeld R.M., Isner J.M. Critical limb ischemia: nothing to give at the of-fice? An. Intern. Med. 1999; 130: 442–4.
15. Казьмин З.В. Комплексное хирургическое и консервативное лечение хронической критической ишемии при отсутствии условий прямой реваскуляризации нижних конечностей. Автореф. дисс.... канд. мед. наук. М., 2006.
16. Gavrilenko A.V. Current possibilities of the reconstructive vascular surgery and the outlooks for using genetic engineering in critical ischemia of the lower extremities. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk 2003; (12): 74–7.
17. Nishikawa S.I., Nishikawa S., Hirashima M. et al. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. Dev. 1998; 125: 1747–57.
18. Gehlert U.M., Ergun S., Schumacher U. et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. Blood 2000; 95: 3106–12.
19. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964–7.
20. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat. Med. 1995; 1: 27–31.
21. Asahara T., Masuda H., Takahashi T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ. Res. 1999; 85: 221–8.
22. Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B. et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J. Clin. Invest. 2002; 109: 337–46.
23. Isner J.M., Pieczek A., Schainfeld R. et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. Lancet 1996; 348: 370–4.

Генетическая модификация используемых факторов улучшает выживаемость и прикрепление сосудистых клеток. Выживаемость сосудистых клеток во время движения их к зоне повреждения является важным для внедрения клеток в ткань–мишень. Например, введение теломеразы гена обратной транскриптазы может увеличивать репликативный и восстановительный потенциал ПЭ [101].

Результаты исследования стволовых клеток могут оказывать существенное влияние на жизнь миллионов людей во всем мире. Осознание того, что стволовые клетки открывают новые подходы к терапии многих заболеваний, требует от нас более детального изучения потенциала стволовых клеток. Данные о биологии стволовых клеток стимулируют биомедицинское сообщество применять эти находки для клинического применения. Стволовые клетки можно использовать для прямой трансплантации или для тканевой инженерии в комбинации с биоматериалами. Рассматривается возможность применения стволовых клеток для генной терапии в качестве средств доставки генов или генетических продуктов к поврежденным тканям.

24. Pearlman J.D., Hibberd M.G., Chuang M.L. et al. Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. Nat. Med. 1995; 1: 1085–9.
25. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O. et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. Circ. 1998; 97: 1114–23.
26. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. Circ. 1998; 97: 1108–10.
27. Hanahan D., Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996; 86: 353–64.
28. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997; 386: 671–4.
29. Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000; 407: 242–8.
30. Carmeliet P., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407: 249–57.
31. Pepper M.S. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997; 17: 605–19.
32. Majka S.M., Jackson K.A., Kienstra K.A. et al. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. J. Clin. Invest. 2000; 111: 71–9.
33. Asahara T., Masuda H., Takahashi T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ. Res. 1999; 85: 221–8.
34. Asahara T., Takahashi T., Masuda H. et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J. 1999; 18: 3964–72.
35. Iwaguro H., Yamaguchi J., Kalka C. et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. Circ. 2002; 105: 732–8.
36. Kalka C., Masuda H., Takahashi T. et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99: 3422–7.
37. Schattman G.C., Hanlon H.D., Jiao, C. et al. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. J. Clin. Invest. 2000; 106: 571–8.
38. Crosby J.R., Kaminski W.E., Schattman G. et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. Circ. Res. 2000; 87: 728–30.
39. Takahashi T., Kalka C., Masuda H. et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat. Med. 1999; 5: 434–8.
40. Luttun A., Carmeliet G., Carmeliet, P. Vascular progenitors: from biology to treatment. Trends Cardiovasc. Med. 2002; 12: 88–96.
41. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J. Clin. Invest. 2000; 105: 17–9.
42. Shi Q., Rafii S., Wu M.H. et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood 1998; 92: 362–7.
43. Bhattacharya V., McSweeney P.A., Shi Q. et al. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells. Blood 2000; 95: 581–5.
44. Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J. et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. Nat. Med. 2001; 7: 1035–40.
45. Noishiki Y., Tomizawa Y., Yamane Y., Matsumoto A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. Nat. Med. 1996; 2: 90–3.
46. Sata M., Saiura A., Kunisato A. et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. Nat. Med. 2002; 8: 403–9.

47. Young P.P., Hofling A.A., Sands M.S. VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of new-born murine recipients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 11951–6.
48. Lyden D., Hattori K., Dias S. et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 2001; 7: 1194–201.
49. Moore M.A. Putting the neo into neoangiogenesis. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 313–5.
50. Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U. et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106–12.
51. Marchetti S., Gimond C., Ijin K. et al. Endothelial cells genetically selected from differentiating mouse embryonic stem cells incorporate at sites of neovascularization in vivo. *J. Cell. Sci.* 2002; 115: 2075–85.
52. Davidoff A.M., Ng C.Y., Brown P. et al. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculation and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 2870–9.
53. Isner J.M. Myocardial gene therapy. *Nature* 2002; 415: 234–9.
54. Khurana R., Simons M. Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 2003; 13: 116–22.
55. Cao R., Brakenhielm E., Pawliuk R. et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat. Med.* 2003; 9: 604–13.
56. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat. Med.* 2000; 6: 1102–3.
57. Kim S., Han H., Chae G. et al. Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells* 2006; 9(4): 1128–34.
58. Shintani S., Murohara T., Ikeda H. et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circ.* 2001; 103: 897–908.
59. Finney M.R., Greco N.J., Haynesworth S.E. et al. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Biol. Blood Marrow Transpl.* 2006; 12(5): 585–93.
60. Kim D., Kim M., Joh J. Angiogenesis facilitated by autologous whole bone marrow stem cell transplantation for Buerger's disease. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1194–200.
61. Schatteman G.C., Dunnwald M., Jiao C. et al. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292: 1–18.
62. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Epstein S.E. Bone marrow-derived cells for enhancing collateral development: Mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ. Res.* 2004; 95: 354–62.
63. Miyamoto K., Kondo T., Suzuki S. et al. Molecular evaluation of endothelial progenitor patients with ischemic limbs. *Ather. Thromb. and Vasc. Biology* 2004; 24: 192–202.
64. Schatteman G.C., Dunnwald M., Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292(1): 1–18.
65. Shi Q., Bhattacharya V., Hong-De Wu M., Sauvage, L.R. Utilizing granulocyte colony-stimulating factor to enhance vascular graft endothelialization from circulating blood cells. *Ann. Vasc. Surg.* 2002; 16: 314–20.
66. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41–9.
67. 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 randomized controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427–35.
68. Higashi Y., Kimura M., Hara K. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with limb ischemia. *Circ.* 2004; 109: 1215–18.
69. Saigawa T., Kato K., Ozawa T. et al. Clinical application of bone-marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone-marrow cells. *Circ. J.* 2004; 68: 1189–93.
70. Iba O., Matsubara H., Nozawa Y. et al. Angiogenesis is by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circ.* 2002; 106: 2019–25.
71. Dzau V.J., Braun-Dullaeus R.C., Sedding D.G. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 2002; 8: 1249–56.
72. Ribatti D., Vacca A., Roncali L., Dammacco, F. Hematopoiesis and angiogenesis: a link between two apparently independent processes. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2000; 9: 13–9.
73. Hattori K., Dias S., Heissig B. et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 2001; 93: 1005–14.
74. Al-Khaldi A., Al-Sabti H., Galipeau J., Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model // *Ann. Thorac. Surg.* 2003; 75(1): 204–9.
75. Pesce M., Orlandi A., Iachininoto M.G. et al. Myoendothelial Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cells in Ischemic Limb Tissues. *Circ. Res.* 2003; 93: e51–62.
76. Nakagami H., Maeda K., Morishita R. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler. Thromb. and Vasc. Biol.* 2005; 25: 25–42.
77. Esato K., Hamano K., Li T.S. et al. Neovascularization induced by autologous bone cells implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transpl.* 2002; 11(8): 747–52.
78. Huang P.P., Li S.Z., Han M.Z. et al. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Thromb. Haemost.* 2004; 91: 606–9.
79. Van Royen N., Schirmer S.H., Atasever B. et al. START Trial: a pilot study on stimulation of arteriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circ.* 2005; 112: 1040–49.
80. Miyamoto K., Nishigami K., Nagaya N. et al. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclears in patients with thromboangiitis obliterans. *Circ.* 2006; 114: 2679–84.
81. Yoon Y.S., Murayama T., Graveriaux E. et al. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 717–25.
82. Saaristo A., Karkkainen M.J., Alitalo K. Insights into the molecular pathogenesis and targeted treatment of lymphedema. *An. NY Acad. Sci.* 2002; 979: 94–110.
83. Szuba A., Skobe M., Karkkainen M.J. et al. Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF. *C. FASEB J.* 2002; 16: 1985–87.
84. Sata M., Saiura A., Kunisato A. et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat. Med.* 2002; 8: 403–9.
85. Caplice N.M., Bunch T.J., Stalboerger P.G. et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 4754–59.
86. Hill J.M., Zalos G., Halcox J.P. et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 593–600.
87. Hillebrands J.L., Klatte F.A., van Dijk W.D., Rozing J. Bone marrow does not contribute substantially to endothelial-cell replacement in transplant arteriosclerosis. *Nat. Med.* 2002; 8: 194–5.
88. Wagers A.J., Sherwood R.L., Christensen J.L., Weissman I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256–59.
89. Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L. Peripheral blood endothelial progenitor cells are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circ.* 2003; 107: 1164–69.
90. Solovey A.N., Gui L., Chang L. et al. Identification and functional assessment of endothelial P1H12. *J. Lab. Clin. Med.* 2001; 138: 322–31.
91. Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D. et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952–8.
92. Hillebrands J.L., Klatte F.A., Rozing J. Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 380–7.
93. Shimizu K., Sugiyama S., Aikawa M. et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat. Med.* 2001; 7: 738–41.
94. Hu Y., Davison F., Ludewig B. et al. Smooth muscle cells in transplant atherosclerotic lesions are originated from recipients, but not bone marrow progenitor cells. *Circ.* 2002; 106: 1834–9.
95. Noishiki Y., Tomizawa Y., Yamane Y., Matsumoto A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat. Med.* 1996; 2: 90–3.
96. Celletti F.L., Vaughn J.M., Amabile P.G. et al. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* 2001; 1: 425–9.
97. Van Royen N., Hofer I., Bottinger M. et al. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ. Res.* 2003; 92: 218–25.
98. Gill M., Dias S., Hattori K. et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+) AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ. Res.* 2001; 88: 167–74.
99. Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K. et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circ.* 2001; 103: 2885–90.
100. Shintani S., Murohara T., Ikeda H. et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circ.* 2001; 103: 2776–79.
101. Murasawa S., Llevadot J., Silver M. et al. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circ.* 2002; 106: 1133–9.

Поступила 23.04.2007