

В. Н. ВАВИЛОВ<sup>1</sup>, А. Ю. ЗАРИЦКИЙ<sup>4</sup>, Д. Г. ПОЛЫНЦЕВ<sup>3</sup>,  
П. С. КУРЬЯНОВ<sup>2</sup>, А. Н. КРУТИКОВ<sup>4</sup>, Е. А. ЗЕНКОВА<sup>3</sup>,  
Ф. З. ШИРИТОВА<sup>1</sup>

## Эффективность мезенхимных стромальных клеток при лечении больных с критической ишемией нижних конечностей

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия  
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

<sup>2</sup> Городская больница № 14, Санкт-Петербург, Россия  
198099, Россия, Санкт-Петербург, ул. Косинова, д. 19/9

<sup>3</sup> ООО «Транс-Технологии», Банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия  
Россия, Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия  
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2  
E-mail: vnvavilov@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 12.11.20; принята к печати 29.01.21

### Резюме

*Актуальность* исследования определяется тем, что на клеточную терапию у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей возлагают надежды как на метод восстановления кровообращения в пораженной конечности у пациентов, которым невозможно выполнить хирургическое или эндоваскулярное вмешательство. *Цель* – исследовать эффективность аллогенных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК) для лечения критической ишемии нижних конечностей (рандомизированное плацебоконтролируемое исследование). *Материалы и методы.* В исследование были включены 34 пациента с критической ишемией нижних конечностей (4 ст. по Покровскому). Группа МСК – 18 человек, в группе плацебо – 16. Группы были сопоставимы по возрасту, длительности заболевания, коморбидной патологии. Аллогенные МСК (фенотип CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>) вводили в задние мышцы голени. Оценивали клиническую симптоматику, лодыжечное давление, транскутанное напряжение кислорода (tcpO<sub>2</sub>), дистанцию безболевого ходьбы (ДБХ). Наблюдение за пациентами продолжалось 12–36 месяцев. По клиническому течению в каждой группе выделяли пациентов в подгруппы «эффект (+)» или «эффект (-)». У 2 пациентов отмечался «неопределенный клинический результат». При анализе результатов этих пациентов относили в ту или иную подгруппу. *Результаты.* В группах МСК и плацебо клинический результат, оцениваемый как «эффект (+)» или «эффект (-)», не различался – ОШ 1,5 (ДИ 0,34–6,7). При разных вариантах формирования групп с отнесением пациентов с «неопределенным клиническим результатом» в ту или иную подгруппу итоговые результаты также не различались. По данным инструментальных методов исследования (ДБХ, tcpO<sub>2</sub>, лодыжечное давление, ангиография), в группах МСК и плацебо различий не было. *Заключение.* При разных вариантах анализа и формирования групп не получено убедительных данных, что аллогенные МСК могут быть эффективны для лечения критической ишемии нижних конечностей.

**Ключевые слова:** критическая ишемия конечности, аллогенные мезенхимные стромальные клетки, клеточная терапия

**Для цитирования:** Вавилов В. Н., Зарицкий А. Ю., Полинцев Д. Г., Курьянов П. С., Крутиков А. Н., Зенкова Е. А., Ширитова Ф. З. Эффективность мезенхимных стромальных клеток при лечении больных с критической ишемией нижних конечностей. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):41–49. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-41-49.

V. N. VAVILOV<sup>1</sup>, A. Yu. ZARITSKEY<sup>4</sup>, D. G. POLYNTSEV<sup>3</sup>,  
P. S. KURIANOV<sup>2</sup>, A. N. KRUTIKOV<sup>4</sup>, H. A. ZENKOVA<sup>3</sup>,  
F. Z. SHIRITOVA<sup>1</sup>

## Efficiency of mesenchymal stromal cells (MSCs) in the treatment of patients with critical limb-threatening ischemia

<sup>1</sup> Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

6-8, L'va Tolstogo street, Saint Petersburg, Russia, 197022

<sup>2</sup> Saint Petersburg State hospital № 14, Saint Petersburg, Russia

19/9, Kosinova str., Saint Petersburg, Russia, 198099

<sup>3</sup> Stem cells bank «Trans-Tachnologies», Saint Petersburg, Russia

40, Geleznodorogny pr., Saint Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

2, Akkuratova str., Saint Petersburg, Russia, 197341

E-mail: vnvavilov@yandex.ru

Received 12.11.20; accepted 29.01.21

### Summary

**Relevance.** The relevance of the study is determined by the fact that hopes are placed in the cell therapy for patients with critical limb-threatening (CLI) ischemia as a method of the restoration of blood circulation in the affected limb in patients who cannot undergo surgical or endovascular intervention. **Aim.** To evaluate the efficiency of allogeneic MSCs for the treatment of critical lower limb ischemia (randomized placebo-controlled study). **Materials and methods.** The study included 34 patients with critical lower limb ischemia (grade 4 according to Pokrovsky). There were 18 patients in the MSC group, and 16 patients in the placebo group). The groups were comparable concerning age, disease duration, and comorbidities. Allogeneic MSCs (phenotype CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>) were injected into the posterior calf muscles. Clinical outcome, ankle pressure, transcutaneous oxygen tension (tcpO<sub>2</sub>), and pain-free walking distance (PFWD) were evaluated. The patients were followed-up for 12–36 months. According to the clinical outcome in each group, the patients were divided into subgroups with «effect (+)» or «effect (-)». In 2 patients, there was an «uncertain clinical outcome». When analyzing the results, these patients were assigned to one or another subgroup. **Results.** In the MSC and placebo groups, the clinical outcome assessed as «effect (+)» or «effect (-)» did not differ (OR 1.5; 95% CI 0.34–6.7). With different variants of group formation and with the assignment of patients with an «uncertain clinical outcome» to a one or another subgroup, the final results neither differed. According to instrumental research methods (PFWD, tcpO<sub>2</sub>, ankle pressure, angiography), there were no differences in the MSC and placebo groups. **Conclusion.** With different variants of analysis and group formation, no convincing evidence that allogeneic MSCs can be effective for the treatment of critical lower limb ischemia have been obtained.

**Keywords:** critical limb ischemia, allogeneic mesenchymal stromal cells, cell therapy

**For citation:** Vavilov V. N., Zaritskey A. Yu., Polyntsev D. G., Kurianov P. S., Krutikov A. N., Zenkova H. A., Shiritova F. Z. Efficiency of mesenchymal stromal cells (MSCs) in the treatment of patients with critical limb-threatening ischemia. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2021;20(1):41–49. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-41-49.

### Введение

Использованию клеточной терапии для лечения больных, страдающих критической ишемией нижних конечностей (КИНК), посвящено большое число работ. С первых публикаций в 2002 г. [1] сейчас их насчитывается несколько сотен (включая описание отдельных клинических наблюдений). Если в первые 5–10 лет преобладали положительные отзывы и впечатления от обсуждаемого метода, то в последующие годы результаты клеточной терапии выглядели менее оптимистично. В большинстве исследований отмечали большую скорость заживления язв, уменьшение болей покоя, увеличение транскутанного напряжения кислорода. Однако по таким критическим показателям, как частота ампутаций (безампутационный интервал, безампутационная выживаемость), разницы в группах клеточной терапии и контрольной получено не было [2, 3].

В ранних исследованиях использовали преимущественно аутологичные моноклеарные клетки костного мозга и отсутствие значимого результата клеточной терапии связывали с их низкой секретор-

ной активностью, особенно у пациентов с сахарным диабетом, составляющих более половины рекрутируемых пациентов [4, 5].

Определенные надежды возлагали на использование других популяций клеток, в частности, мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК) (Международное общество по клеточной и геной терапии (ISCT – International Society for Cell & Gene Therapy) рекомендует использовать не термин «мезенхимные стволовые клетки», а термин «мезенхимные стромальные клетки», добавляя их источник получения, при этом сохраняется акроним «МСК» [6]. Обоснованием таких надежд было то, что секретом МСК составляет около 40 биологически активных факторов, влияющих на репаративные, иммунные процессы в организме, в том числе и на ангио/артериогенез [7, 8]. Однако и при использовании МСК в лечении КИНК получены противоречивые результаты – как положительные [9–11], так и отсутствие эффекта по частоте ампутаций [12].

Кроме того, при анализе публикаций отмечается, что подавляющее большинство исследований по

## Характеристика включенных в исследование пациентов

Table 1

## Baseline characteristics of the patients included in the study

Показатель	Гр. плацебо (n=16)	Гр. МСК (n=18)	p
Мужчины/женщины	1/15	3/15	ОШ 0,33 (ДИ 0,03–3,6)
Длительность КИК 1–6 месяцев	12	14	ОШ 0,86 (ДИ 0,2–4,2)
Длительность КИК 7–12 месяцев	3*	3*	ОШ 1,13 (ДИ 0,2–6,5)
Трофические изменения на стопе	6	9	ОШ 0,6 (ДИ 0,15–2,4)
ЛПИ	0,32±0,16	0,28±0,12	p=0,18
tсpO <sub>2</sub> , мм рт. ст.	11,8±8,6	11,3±11,5	p=0,34
Дистанция безболевого ходьбы (ДБХ), м	35±13	57±22	p=0,08
ГБ	11	13	ОШ 0,85 (ДИ 0,2–3,7)
ИБС	8	10	ОШ 0,8 (ДИ 0,2–3,1)
ИБГМ	6	5	ОШ 1,44 (ДИ 0,3–6,2)

\* – у 2 пациентов (по 1 в каждой группе) длительность КИК не удалось установить.

клеточной терапии при КИНК обладают «низким качеством доказательств» [13].

Нами в 2006–2010 гг. проведена работа, в которой были использованы аутологичные МСК при лечении больных, страдающих КИНК. В работе были получены положительные результаты клеточной терапии [14]. Однако исследование было не рандомизированным и не плацебоконтролируемым, что снижало степень доказательности. Учитывая это и противоречивость данных об эффективности МСК при КИНК, мы провели рандомизированное, плацебоконтролируемое исследование, результаты которого представлены в настоящей публикации.

**Цель** – оценка клинической эффективности использования аллогенных МСК костного мозга для лечения критической ишемии нижних конечностей.

**Дизайн исследования:** двойное слепое рандомизированное плацебоконтролируемое исследование. Рандомизация проводилась в Банке стволовых клеток ООО «Транс-Технологии» (лицензия № ЛО-78-01-009099 от 21.08.2018 г., выдана Комитетом по здравоохранению Санкт-Петербурга) методом генерации случайных чисел.

**«Ослепление»** в исследовании: в клинику материал для введения пациенту (МСК или плацебо) поступал из Банка стволовых клеток ООО «Транс-Технологии», врач и пациент не были информированы о составе вводимого материала.

Исследование было разрешено Этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова (протокол № 185 от 30 мая 2016 г.), протокол исследования утвержден Ученым советом ПСПбГМУ им. И. П. Павлова. Больные были осведомлены о сути исследования и давали информированное согласие на участие в нем.

#### Материалы и методы исследования

В исследование включены 34 больных (30 мужчин, 4 женщины) в возрасте от 36 до 79 лет, страдавших КИНК (4 ст. по Покровскому, Rutherford III–IV). Все

пациенты жаловались на боли в покое, интенсивную перемежающуюся хромоту 15–20 м, у 15 человек имелись трофические изменения на стопе. Длительность заболевания колебалась от 1 до 20 лет, 24 перенесли открытые операции или эндоваскулярные вмешательства на сосудах конечности, 3 пациента – поясничную симпатэктомию, 7 пациентов ранее не оперированы.

У большинства больных, перенесших реконструктивную операцию, наступил тромбоз в зоне реконструкции (этих больных повторно не оперировали из-за отсутствия технических возможностей такого вмешательства или из-за отказа от него). Причины поражения сосудов нижних конечностей у 32 – атеросклероз, у 2 – аортоартериит.

Критериями невключения в исследование были наличие клинически значимой сопутствующей патологии (сахарный диабет, перенесенный инфаркт миокарда или ОНМК менее 1 года, почечная недостаточность, онкологическое заболевание анамнезе и др.), невозможность выполнения в полном объеме протокола исследования, аллергия к любому компоненту препаратов, используемых при трансплантации клеток или при инструментальных исследованиях.

Все больные обследованы физикально, выполнена ангиография конечностей, определен уровень лодыжечного давления, лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ), транскутанное напряжение кислорода голени и стоп на страдающей и «здоровой» ноге. По данным ангиографии, уровень поражения артерий конечности – ниже паховой связки.

В группе плацебо было 16 пациентов/конечностей, в группе МСК – 18 пациентов/конечностей.

Характеристика пациентов обеих групп приведена в табл. 1.

В качестве лечебного материала использованы аллогенные МСК, полученные у молодых здоровых доноров костного мозга. Получение, хранение, культивирование МСК проводили в Банке стволовых клеток ООО «ТрансТехнологии».

Фенотип МСК: CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>.

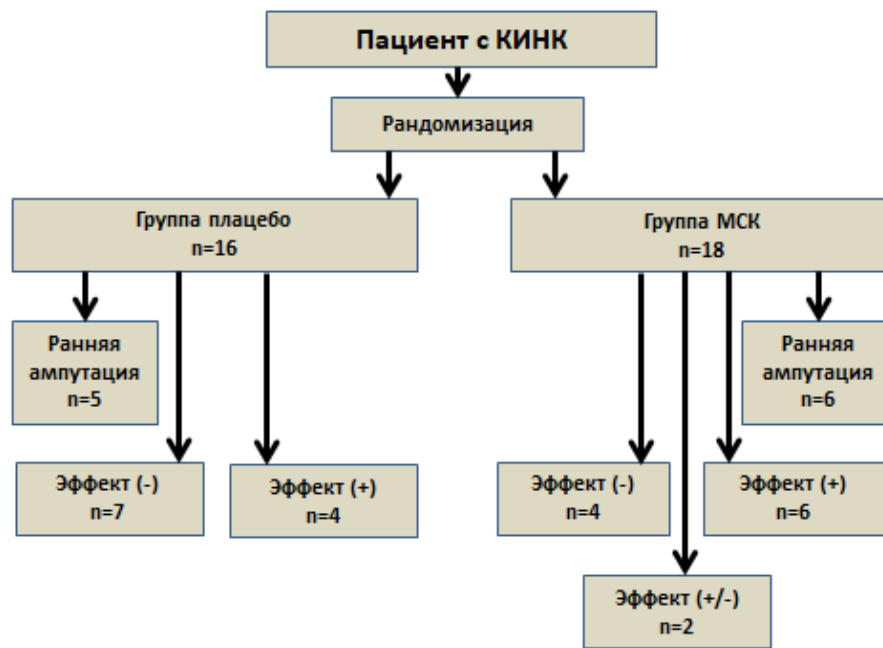


Рис. 1. Распределение групп исследованных пациентов

Fig. 1. Distribution of groups of the studied patients

В качестве плацебо использовали фосфатно-солевой буфер с добавлением жировой эмульсии для парентерального питания, чтобы по физическим свойствам (вязкость и цвет) плацебо-раствор был похож на раствор с клетками.

Полученный материал вводили в мышцы голени под местной анестезией S. Novokaini 0,5 % в 34 точки по задней поверхности голени, по 17 точек на одной и другой ее стороне. В каждую точку вводили по 1,5 мл материала (по 1,5 млн клеток – у пациентов опытной группы или раствора плацебо – у пациентов контрольной группы).

До введения МСК/плацебо и в течение последующего времени все пациенты получали дезагрегантную терапию, препараты, улучшающие реологию крови, и средства, нормализующие тканевой метаболизм (Трентал, Сулодексид, Актовегин).

Контрольные визиты – каждые 3 месяца после введения МСК/плацебо.

Оценивали клиническую симптоматику, лодыжечное давление/ЛПИ, транскутанное напряжение кислорода ( $\text{tcpO}_2$ ) в коже дистальных отделов нижних конечностей. Некоторым больным проведена повторная ангиография сосудов конечностей.

Максимальный срок наблюдения за больными – до 2,5 года. Большое внимание уделяли клинической оценке эффективности проводимого лечения: сохранению или нарастанию, уменьшению или исчезновению болей в покое, увеличению или уменьшению, постепенному исчезновению трофических изменений на стопе, изменению дистанции безболевого ходьбы. Регистрировали сохранение или потерю конечности.

По клиническому течению ишемии нижних конечностей выделено 2 варианта: отсутствие лечебного эффекта и положительный лечебный эффект.

К *первому* (отсутствие лечебного эффекта – «эффект (-)») отнесены больные, у которых после введения

МСК/плацебо ишемия конечности прогрессировала или признаки ее уменьшения отсутствовали. При этом у части пациентов боли становились интенсивнее, нарастали трофические изменения, и конечность приходилось ампутировать. При анализе результатов выделены больные, которым ампутацию конечности выполняли в течение первых 3 месяцев от момента инъекций. У других больных с отрицательным клиническим эффектом тяжесть ишемии долгое время (не менее 10–12 месяцев) оставалось приблизительно на одном уровне с исходной. У части этих пациентов, с длительным отсутствием лечебного эффекта, исходом была ампутация конечности или попытка, иногда успешная, реваскуляризирующего вмешательства.

Ко *второму* (положительный лечебный эффект – «эффект (+)») отнесены больные, у которых после инъекции МСК постепенно уменьшалась, а затем исчезала критическая ишемия конечности. У них уменьшалась интенсивность болей в покое, а затем они проходили вовсе, переставали беспокоить ночные боли, постепенно увеличивалась ДБХ, улучшалась трофика тканей стопы, заживали трофические язвы или раны на месте ампутированных пальцев стопы и т. п. У всех этих больных сохранены пораженные нижние конечности.

Кроме традиционного представления результатов суммарно по группам, итоги лечения сравнивали также после исключения из обеих групп больных, перенесших ампутацию конечности в первые 3 месяца после введения МСК/плацебо. Помимо этого, рассматривали ситуацию, при которой пациентов с неопределенными клиническими результатами воздействия относили к положительным или отрицательным исходам.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Excel» и online-калькулятора (<https://medstatistic.ru/calculators/calccodds.html>). Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

Таблица 2

## Клинические результаты исследования (общие данные)

Table 2

## Clinical outcome of the studied patients (general data)

	Плацебо (n=16)	МСК (n=18)	ОШ (ДИ)
Вариант 1 формирования подгрупп (2 пациента с неопределенным клиническим результатом из группы МСК отнесены в подгруппу с отрицательным исходом)			
Эффект (-), n (%)	12 (75 %)	12 (66 %)	ОШ 1,5 (ДИ 0,34–6,7)
Эффект (+), n (%)	4 (25 %)	6 (34 %)	
Вариант 2 формирования подгрупп (2 пациента с неопределенным клиническим результатом из группы МСК отнесены в подгруппу с положительным исходом)			
Эффект (-), n (%)	12 (75 %)	10 (66 %)	ОШ 2,4 (ДИ 0,56–10,4)
Эффект (+), n (%)	4 (25 %)	8 (34 %)	

Примечание: здесь и далее ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Таблица 3

## Клинические результаты исследования (исключены пациенты, которым выполнены ранние ампутации конечности)

Table 3

## Clinical outcome of the studied patients (excluded patients with early amputations)

	Плацебо, n=11 (16-5)	МСК, n=12 (18-6)	ОШ (ДИ)
Вариант 1 формирования подгрупп (2 пациента с неопределенным клиническим результатом отнесены в подгруппу с отрицательным исходом)			
Эффект (-)	7 (64%)	6 (50%)	ОШ 1,75 (ДИ 0,33–9,3)
Эффект (+)	4 (36%)	6 (50%)	
Вариант 2 формирования подгрупп (2 пациента с неопределенным клиническим результатом отнесены в подгруппу с положительным исходом)			
Эффект (-)	7 (64%)	4 (34%)	ОШ 3,5 (ДИ 0,63–19,5)
Эффект (+)	4 (36%)	8 (66%)	

## Результаты исследования и их обсуждение

Прежде всего, необходимо указать, что ни у одного больного после введения МСК в мышцы голени не было негативных общих и местных проявлений, т. е. введение аллогенных МСК в данной ограниченной выборке было безопасным.

Ранние ампутации (до 3 месяцев после введения материала): в группе плацебо ампутировано 5 конечностей, в группе МСК – 6.

В группе плацебо в сроки от 12 месяцев до 2,5 года после проведения процедуры постепенное улучшение состояния конечности и ее сохранение имели место у 4 человек. У 12 зафиксирован отрицательный результат. Из них у 5 из-за быстрого прогрессирования ишемии в течение первых 3 месяцев после введения материала проведены ампутации конечностей. У 7 человек сохранялись боли в покое и трофические изменения (если имелись исходно), также не было динамики ДБХ. В дальнейшем у них выполнена либо ампутация конечности, либо попытка реваскуляризации, иногда успешная.

В группе МСК в сроки от 12 месяцев до 2,5 года улучшение состояния конечности, и ее сохранение отмечено в 6 наблюдениях, в 12 – отрицательный

результат. Из них у 6 из-за быстрого прогрессирования ишемии в течение первых 3 месяцев после введения МСК выполнена ампутация конечности. У остальных 6 через 10–20 месяцев после введения МСК проведены либо поздние ампутации (2 больных) либо попытки реваскуляризации конечности (3 пациента), 1 больная продолжает лечиться консервативно. У этой пациентки уже около 2 лет сохраняются боли в покое, интенсивная перемежающаяся хромота, не увеличиваются трофические изменения на пальцах стопы.

У 2 пациентов из группы МСК отмечен «неопределенный клинический эффект». В 1 наблюдении у мужчины 65 лет, страдавшего КИНК (при ангиографии – окклюзия поверхностной бедренной артерии в сочетании с сегментарным поражением артерий голени), после введения клеточного материала наблюдали положительный клинический эффект: исчезновение болей в покое, ДБХ достигла 200 м, наступило заживление трофической язвы стопы. Но через 1 год 3 месяца после введения МСК у пациента возникло тяжелое ОНМК, сопровождавшееся резким ухудшением кровообращения в «леченой» конечности, что потребовало ее ампутации. У другой 55-летней

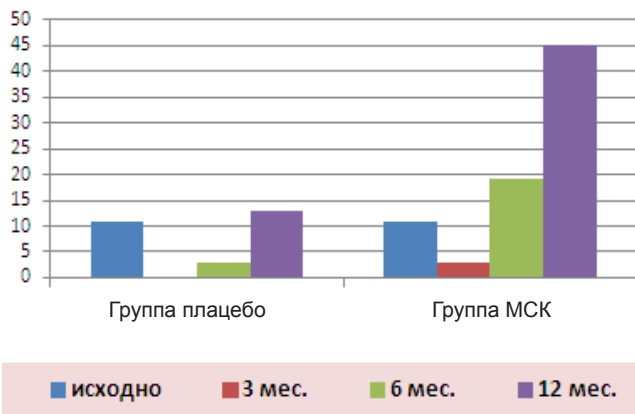


Рис. 2. Динамика транскутанного напряжения кислорода  
Fig. 2. Transcutaneous oxygen pressure during the follow-up period

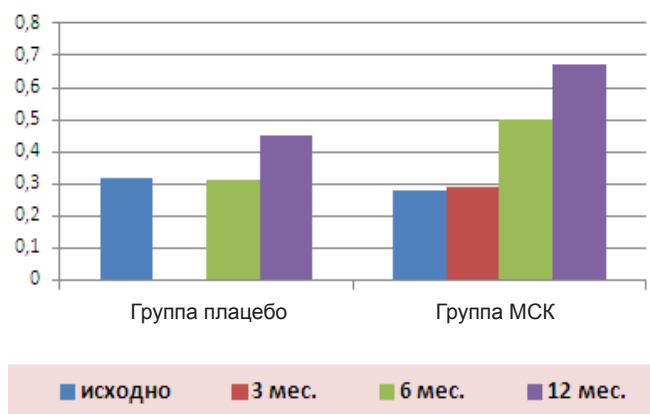


Рис. 3. Динамика лодыжечно-плечевого индекса  
Fig. 3. Ankle-brachial index during the follow-up period

больной, страдающей атеросклерозом в комбинации с артериитом, в связи с КИНК правой ноги на фоне уже стентированной ранее подвздошной артерии, после введения МСК, отмечен положительный клинический эффект. Через 8 месяцев от начала лечения, из-за обострения ревматоидного артрита начала получать цитостатики, что спровоцировало тромбоз стента в правой подвздошной артерии и острую ишемию правой конечности. Острые артериальные тромбозы при введении цитостатиков описаны в литературе [15, 16]. Через 2 месяца после этого пациентке выполнено перекрестное подвздошно-бедренное шунтирование слева направо.

Клинические результаты лечения пациентов с КИНК приведены в табл. 2 (общие данные), в табл. 3 исключены пациенты, которым выполнены ранние ампутации конечности.

При общепринятом варианте формирования подгрупп (табл. 2, вариант 1) достоверной разницы по интегральному клиническому эффекту МСК получено не было.

При исключении из групп плацебо и МСК пациентов, которым выполнены ранние ампутации конечности, также достоверной разницы в клиническом эффекте получено не было.

При отнесении пациентов с «неопределенным клиническим результатом» в подгруппу «эффект (+)» отмечается тенденция к положительному клиническому эффекту в группе МСК (отношение шансов – 2,4 и 3,5), однако достоверных различий между группами также не получено (малое число наблюдений).

Данные инструментальных исследований приведены на рис. 2–4.

Различия исходных параметров и через 1 год наблюдения недостоверны, однако отмечается тенденция к увеличению ЛПИ и  $tcPO_2$  в группе МСК.

Различий по ДБХ в группах не было.

При повторных ангиографических исследованиях у пациентов не выявлено увеличения коллатеральной сосудистой сети.

Прежде чем последовательно обсудить результаты исследования, необходимо остановиться на том, почему столь большое внимание было уделено клинической стороне исследования. Связано это с тем, что клинические особенности развития критической

ишемии у обсуждаемых больных есть фактически интегральный показатель течения дел (нарастание/исчезновение болей в покое, изменение в ту или иную сторону ДБХ, состояние трофических изменений, сохранение или вынужденная ампутация конечности), позволяющий наиболее убедительно оценить эффективность проводимой терапии и имеющий в этом отношении решающее значение [17].

Кроме того, в предыдущем нашем исследовании [14] было показано, что эффект клеточной терапии с использованием аутологичных МСК начинал проявляться, прежде всего, клинически (снижалась интенсивность болей в ноге, пациенты реже опускали ее в ночное время, несколько увеличивалась ДБХ, ярче становились грануляции в зоне трофических изменений и т. д.). Постепенно признаки улучшения становились более очевидными и устойчивыми. Никогда этому не предшествовали убедительно зафиксированные рост лодыжечного давления и повышение  $tcPO_2$  в тканях. Последнее обнаруживали только на фоне очевидного, может быть и умеренного, но клинического улучшения. Эти первые признаки эффективности проводимого с помощью МСК лечения возникали не ранее, чем через 3 месяца от момента введения клеток в мышцу.

Следует отметить, что в эти же первые 3 месяца у другой части больных наблюдали, напротив, клиническое прогрессирование ишемии конечности, включая нарастание трофических изменений, если таковые имелись, что и вело к необходимости ампутации. Описанное имело место и в настоящем исследовании. Это позволяет считать, что агрессивное течение ишемии, которое ведет к ранней ампутации конечности, связано, скорее всего, с тем, что предпринятое лечение было начато поздно и механизмы компенсации кровообращения не успевали включиться или их реализация была уже невозможна – возникшие ишемические изменения носили необратимый характер. Это и стало причиной того, что при сравнении результатов воздействия плацебо или МСК проводили анализ эффективности исследуемого метода лечения как в общих группах больных (плацебо – 16 и МСК – 18), так и после исключения пациентов с ранними ампутациями. Близкая частота ранних ампутаций в обеих группах (плацебо – 5 (31%), МСК – 6

(33 %) свидетельствует об их сопоставимости. Они были сопоставимы также по частоте сопутствующих заболеваний, длительности КИНК и частоте трофических изменений конечности.

Выделение больных «с неопределенным клиническим эффектом» отражает реальную клиническую практику и позволяет рассмотреть ситуацию всесторонне. Вариант сравнения исходов воздействия плацебо и МСК, в случае, когда 2 пациента с «неопределенным клиническим эффектом» отнесены к успешным или отрицательным, нам кажется, заслуживает внимания, так как делает анализ более точным.

Несколько подходов при формировании подгрупп и, соответственно, вариантов представления результатов не привели к обнаружению достоверной разницы между плацебо и МСК. Возможно, это объясняется малым числом наблюдений в подгруппах после исключения пациентов с ранними ампутациями.

Инструментальные показатели исходно и при динамическом наблюдении отличались большим разбросом значений, что также не позволяет получить достоверную разницу в исследуемых группах.

Полученные данные согласуются с данными других исследований, в большей части которых отмечали тенденцию к снижению частоты ампутаций конечности, однако в метаанализах подчеркивается большой разброс результатов и низкое качество доказательств [18].

Этому даются разные объяснения: ссылаются на большую разнородность больных, неадекватность их отбора, влияние на результат наличия или отсутствия у больных сахарного диабета, неполное соответствие контрольной и леченой групп по характеру и объему поражения сосудов, длительности предшествующей ишемии, виду проводимого до начала клеточного лечения и т. д.

Каждый метаанализ заканчивается рекомендацией еще и еще раз исследовать эффективность клеточной терапии при лечении КИНК [13]. И в этой связи следует остановиться на механизмах, объясняющих положительное влияние МСК при лечении обсуждаемых больных.

Надо отметить, что точка зрения на эти механизмы, судя по данным литературы, не меняется на протяжении последних 25–30 лет. Согласно данным, полученным в исследованиях на животных, МСК, попадая с мягкие ткани конечности, погибают в течение нескольких недель в результате апоптоза [19, 20].

Но за это время введенные клетки выделяют цитокины («паракринная гипотеза» эффектов клеточной терапии), которые могут стимулировать разрастание капилляров (ангиогенез) и/или артериогенез – увеличение диаметра уже имеющихся коллатералей [21]. Это приводит, в конце концов, к увеличению количества крови, притекающей к ишемизированным тканям, и регионального давления крови до уровня, при котором тканевой обмен может быть вполне адекватным. Следует отметить, что только увеличение числа капилляров (ангиогенез без артериогенеза) не может улучшить кровообращение в страдающих от ишемии тканях [22].

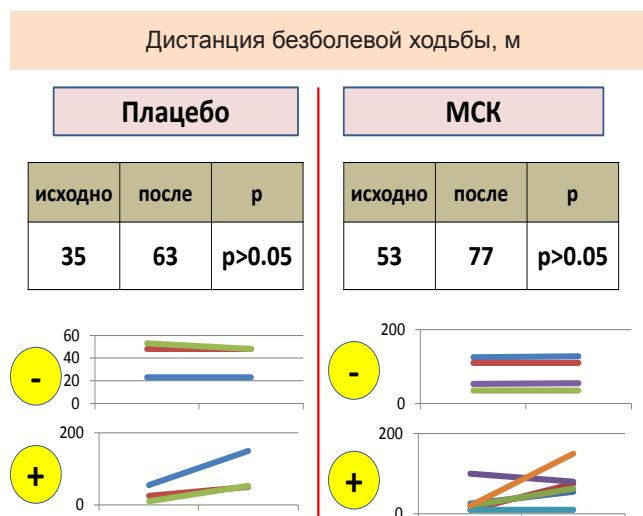


Рис. 4. Динамика дистанции безболевого ходьбы

Fig. 4. Pain-free walking distance during the follow-up period

Дело в том, что в ситуации критической ишемии всегда имеет место очень малое, на грани допустимого, количество поступающей к ткани крови. Если предположить, что МСК увеличит число капилляров, то невозможно представить, что это приведет к увеличению объема поступающей крови, ибо перфузионное давление, под которым поступает кровь к тканям, при этом не увеличивается, а региональное периферическое давление при ишемии, тем более критической, как известно, низкое и далее снижаться не может. Остается, таким образом, наиболее реальное положение о том, что, в первую очередь, эффективность обсуждаемого лечения в случае успеха определяется артериогенезом или увеличением числа обходных путей. Зарегистрировать артериогенез в этом случае в клинике является довольно трудной задачей. Ряд авторов видели и демонстрировали увеличение диаметра малых артериальных сосудов, другие это не отмечали [23, 24].

В тех наблюдениях, где ангиография выполнялась до и после введения МСК, мы ни разу не выявили какой-либо динамики со стороны сосудистого русла. Правда, считается, что для точного суждения об этом необходимо специально поставленное исследование. Но, так или иначе, другого объяснения эффекта от введения МСК у обсуждаемых больных, кроме артериогенеза, едва ли можно предположить.

Как же в свете уже представленного можно объяснить сегодня результаты лечения КИНК с использованием МСК? Кажется, правильнее всего обратить внимание на особенности течения тяжелой ишемии нижних конечностей, известные из ежедневной практики. В частности, при агрессивном течении ишемии исходом является непременно ампутация конечности, как правило, не позже, чем в первые 3 месяца (естественно, это наблюдения, где оперативное лечение в силу разных причин невозможно или оно было безуспешным). Кроме того, среди больных с КИНК есть относительно небольшая часть пациентов, у которых долго, иногда годами, проводя только консервативное лечение, удается не только сохранить конечность, но и добиться, в конце концов, исчезновения

боли в покое, заживления трофических изменений, увеличение ДБХ. У этих больных, по-видимому, заболевание следует рассматривать как пролонгированный вариант КИНК. На это обращает внимание группа авторов из Нидерландов [25]. Об этом фактически говорят результаты большинства рандомизированных слепых исследований по использованию клеточной терапии при лечении КИНК: в группах плацебо почти всегда есть то или иное число пациентов, у которых конечный результат – сохранение конечности – не хуже, чем в группе клеточной терапии. По-видимому, из-за этих двух вариантов течения ишемии конечности у пациентов получить достоверные различия чаще всего и не удается.

По-видимому, клеточная терапия с использованием МСК (использование моноклеаров костного мозга или периферической крови менее оправдано), способствуя ангиогенезу, может быть эффективна только у больных, где тяжелая ишемия протекает относительно медленно. Причины, по которым ишемия течет агрессивно или сравнительно пролонгировано, пока не ясны.

**Перспективы.** В Международных рекомендациях 2019 г. по лечению пациентов с критической ишемией конечностей [26] указано, что до настоящего времени не получены убедительные доказательства положительного влияния клеточной терапии на течение КИНК, и такой вид терапии может проводиться только в рамках научного исследования.

При дальнейшем исследовании эффективности МСК и других популяций клеток у обсуждаемых больных, по-видимому, целесообразны повторные введения клеточного материала, а также комплексность воздействия при консервативном лечении КИНК, включающем в себя, кроме фармакотерапии, также лечебные процедуры, способствующие ангиогенезу, – контролируруемую физическую нагрузку (вызывает рабочую гиперемию) и периодическую пневматическую компрессию (вызывает реактивную гиперемию). Необходим тщательный анализ клинико-инструментальных данных с целью выделения пациентов, у которых клеточная терапия может быть эффективной (респондеры vs нереспондеры), соответственно, при проведении исследований более строгое выделение групп пациентов и модификация критериев включения.

## Выводы

1. При введении аллогенных МСК в исследуемой группе пациентов не было побочных реакций: по-видимому, их использование безопасно.

2. Не получено достоверных доказательств эффективности МСК для лечения пациентов с КИНК.

3. Среди больных с КИНК следует выделить группу пациентов, у которых выраженность ишемии существенно не прогрессирует в течение 1–2 лет.

## Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

## Литература / References

1. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9331):427–435. Doi: 10.1016/S0140-6736(02)09670-8.
2. Abdul Wahid SF, Ismail NA, Wan Jamaludin WF, Muhammad NA, Abdul Hamid MKA, Harunarashid H, Lai NM. Autologous cells derived from different sources and administered using different regimens for 'no-option' critical lower limb ischaemia patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;8(8):CD010747. Doi: 10.1002/14651858.CD010747.pub2.
3. Peeters Weem SM, Teraa M, de Borst GJ, Verhaar MC, Moll FL. Bone Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled Trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2015;50(6):775–783. Doi: 10.1016/j.ejvs.2015.08.018.
4. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*. 2004;109(13):1615–1622. Doi: 10.1161/01.CIR.0000124476.32871.E3.
5. Spinetti G, Cordella D, Fortunato O et al. Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway. *Circ Res*. 2013;112(3):510–522. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300598.
6. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*. 2019;21(10):1019–1024.
7. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076–1084. Doi: 10.1002/jcb.20886.
8. Caseiro AR, Santos Pedrosa S, Ivanova G et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells metabolomic and bioactive factors profiles: A comparative analysis on the umbilical cord and dental pulp derived Stem/Stromal Cells secretome. *PLoS One*. 2019;14(11):e0221378. Doi: 10.1371/journal.pone.0221378.
9. Powell RJ, Comerota AJ, Berceci SA et al. Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2011;54(4):1032–1041. Doi: 10.1016/j.jvs.2011.04.006.
10. Lu D, Jiang Y, Deng W, et al. Long-Term Outcomes of BMMSC Compared with BMMNC for Treatment of Critical Limb Ischemia and Foot Ulcer in Patients with Diabetes. *Cell Transplant*. 2019;28(5):645–652. Doi: 10.1177/0963689719835177
11. Gupta PK, Krishna M, Chullikana A et al. Administration of Adult Human Bone Marrow-Derived, Cultured, Pooled, Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells in Critical Limb Ischemia Due to Buerger's Disease: Phase II Study Report Suggests Clinical Efficacy. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(3):689–699. Doi: 10.5966/sctm.2016-0237.
12. Gupta PK, Chullikana A, Parakh R et al. A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med*. 2013;(11):143. Published 2013 Jun 10. Doi: 10.1186/1479-5876-11-143.
13. Gao W, Chen D, Liu G, Ran X. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):140. Doi: 10.1186/s13287-019-1254-5



14. Седов В. М., Вавилов В. Н., Зарицкий А. Ю. и др. Эффективность клеточной терапии у больных с критической ишемией нижних конечностей // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 45–52. [Sedov VM, Vavilov VN, Zaritskiy AYu i dr. Effektivnost' kletochnoy terapii u bol'nyh s kriticheskoy ishemiej nizhnih konechnostej. Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrocirkulyaciya. 2011;10(2):45–52. (In Russ.)].
15. Molloy RG, Welch GC, Drury JK, Abel BJ. Arterial thrombosis after chemotherapy with cisplatin, vinblastine and methotrexate. *Br J Clin Pract.* 1995;49(1):50–51.
16. Türk SM, Cansu DÜ, Teke HÜ, et al. Can we predict thrombotic tendency in rheumatoid arthritis? A thromboelastographic analysis (with ROTEM). *Clin Rheumatol.* 2018;37(9):2341–2349. Doi: 10.1007/s10067-018-4134-y.
17. Лебедев С. В., Карасев А. В., Кунгурцев В. В. и др. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы) // Вест. Росс. академ. медиц. наук. – 2013. – Т. 68, № 3. – С. 33–44. [Lebedev SV, Karasev AV, Kungurcev VV i dr. Kletochnaya terapiya kriticheskoy ishemii nizhnih konechnostej (problemy i perspektivy). Vest. Ross. akadem. medic. nauk. 2013;68(3):33–44. (In Russ.)].
18. Abdul Wahid SF, Ismail NA, Wan Jamaludin WF, Muhammad NA, Abdul Hamid MKA, Harunarashid H, Lai NM. Autologous cells derived from different sources and administered using different regimens for 'no-option' critical lower limb ischaemia patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;8(8):CD010747. Doi: 10.1002/14651858.CD010747.pub2.
19. Westrich J, Yaeger P, He C, et al. Factors affecting residence time of mesenchymal stromal cells (MSC) injected into the myocardium. *Cell Transplant.* 2010;19(8):937–948. Doi: 10.3727/096368910X494911.
20. Li Y, Liu W, Liu F, et al. Primed 3D injectable microchannels enabling low-dosage cell therapy for critical limb ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(37):13511–13516. Doi: 10.1073/pnas.1411295111.
21. Al-Rifai R, Nguyen P, Bouland N et al. In vivo efficacy of endothelial growth medium stimulated mesenchymal stem cells derived from patients with critical limb ischemia. *J Transl Med.* 2019;17(1):261. Doi: 10.1186/s12967-019-2003-3).
22. Korpisalo P, Hytönen JP, Laitinen JT et al. Capillary enlargement, not sprouting angiogenesis, determines beneficial therapeutic effects and side effects of angiogenic gene therapy. *Eur Heart J.* 2011;32(13):1664–1672. Doi: 10.1093/eurheartj/ehq433.
23. Lee HC, An SG, Lee HW, et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J.* 2012;76(7):1750–1760. Doi: 10.1253/circj.cj-11-1135.
24. Yang SS, Kim NR, Park KB, et al. A phase I study of human cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Int J Stem Cells.* 2013;6(1):37–44. Doi: 10.15283/ijsc.2013.6.1.37.
25. Santema TB, Stoekenbroek RM, van Loon J, Koelemay MJ, Ubbink DT. Not All Patients with Critical Limb Ischaemia Require Revascularisation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2017 Mar;53(3):371–379.
26. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, et al. Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia [published correction appears in *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2020 Mar;59(3):492–493] [published correction appears in *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2020 Jul;60(1):158–159]. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2019;58(1S):S1–S109.e33. Doi: 10.1016/j.ejvs.2019.05.006

### Информация об авторах

**Вавилов Валерий Николаевич** – д-р мед. наук, профессор кафедры факультетской хирургии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: vnvavilov@yandex.ru.

**Зарицкий Андрей Юрьевич** – д-р мед. наук, профессор, директор Института онкологии и гематологии, главный научный сотрудник лаборатории онкогематологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0001-7682-440X, e-mail: zaritskey@gmail.com.

**Полынцеv Дмитрий Генрихович** – канд. мед. наук, президент группы компаний «Алкор Био», Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0002-0130-7739, e-mail: info@alkorbio.ru.

**Курьянов Павел Сергеевич** – канд. мед. наук, врач отделения сосудистой хирургии больницы № 14, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0001-5844-2547, e-mail: pcurjanov@gmail.com.

**Крутиков Александр Николаевич** – канд. мед. наук, внештатный научный сотрудник НИО инфильтративных заболеваний сердца, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0001-6897-6171, e-mail: ankrutikov@yandex.ru.

**Зенкова Елена Анатольевна** – директор Банка стволовых клеток «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0003-2810-543X, e-mail: ezenkova@alkorbio.ru.

**Ширитова Фатима Зауровна** – врач отделения сосудистой хирургии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: zaurovnafatima@gmail.com.

### Information about authors

**Vavilov Valery N.** – MD, PhD, professor of the Department of faculty surgery, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: vnvavilov@yandex.ru.

**Zaritskiy Andrey Yu.** – MD, PhD, director of the Institute of Hematology, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0001-7682-440X, e-mail: zaritskey@gmail.com.

**Polyntsev Dmitry G.** – PhD, President of the AlkorBio Group, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0002-0130-7739, e-mail: info@alkorbio.ru.

**Kurianov Pavel S.** – MD, PhD, Saint Petersburg State hospital № 14, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0001-5844-2547, e-mail: pcurjanov@gmail.com.

**Krutikov Alexander N.** – PhD, leading researcher of the research Department of infiltrative heart disease, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0001-6897-6171, e-mail: ankrutikov@yandex.ru.

**Zenkova Helena A.** – director of the stem cells bank «Trans-Techologies», Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0003-2810-543X, e-mail: ezenkova@alkorbio.ru.

**Shiritova Fatima Z.** – MD, Department of faculty surgery, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: zaurovnafatima@gmail.com.