

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

**Лікування хворих з важкими
формами ішемії нижніх кінцівок
атеросклеротичного генезу
аутологічними мезенхімальними
стовбуровими клітинами**

Методичні рекомендації

Видання друге

Київ – Вінниця
2024

*Ухвалено до друку науково-технічною радою
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
(протокол № 4 від 27 червня 2023 року)*

Установи-розробники:

- ¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, університетська клініка
- ² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, кафедра внутрішньої медицини Інституту біології та медицини
- ³ ТОВ Медичний центр "Інститут еластографії", Київ, Україна
- ⁴ ТОВ "Медичний центр "М.Т.К."

Укладачі:

- ¹ д. мед. наук, професор **Черняк В. А.** (050) 523-18-81
- ² к. мед. наук **Літвінова Н. Ю.** (067) 290-56-49
- ² д. натур. мед, к. мед. наук **Буцька Л. В.** (097) 433-33-37
- ³ к. мед. наук **Динник О. Б.** (050) 331-96-35

Рецензенти:

*Головний науковий співробітник відділу хірургії магістральних судин Національного інституту хірургії та трансплантології імені О.О.Шалімова НАМН України, д. мед. наук, професор **Чернуха Лариса Михайлівна.***

*Доктор медичних наук, професор кафедри хірургії та трансплантології Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, заслужений лікар України, лауреат державної премії України **Сморжевський Валентин Йосипович.***

*Головний судинний хірург Збройних Сил України, начальник клініки судинної хірургії Національного військово-медичного клінічного центру Міністерства оборони України, полковник медичної служби, заслужений лікар України **Роговський Володимир Михайлович.***

О-60

Лікування хворих з важкими формами ішемії нижніх кінцівок атеросклеротичного генезу аутологічними мезенхімальними стовбуровими клітинами — Методичні рекомендації / Черняк В. А., Літвінова Н. Ю., Буцька Л. В., Динник О. Б. та ін. / Видання 2-ге. — Вінниця : Твори, 2024. — 90 с., іл.

ISBN 978-617-558-062-2

Методичні рекомендації розроблені в рамках науково-дослідної роботи "Визначення критеріїв та показників безпеки і якості гемопоетичних стовбурових клітин у лікуванні хворих з онкогематологічними захворюваннями" (№ державної реєстрації 0120U000230, термін виконання 2020–2023 рр.), що виконується в КЦТОТК. Дослідниками проаналізовано джерела вітчизняної та зарубіжної рецензованої наукової медичної інформації з питань терапевтичного застосування мезенхімальних стовбурових клітин.

Методичні рекомендації розроблені для лікарів загальної практики, судинних хірургів та ангіологів і можуть використовуватись для створення та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги в системі охорони здоров'я України. Наукова робота та створення методичних рекомендацій здійснено за підтримки Центру сучасних клітинних технологій ReoCell (ТОВ "Медичний центр "М.Т.К.").

Методичні рекомендації видаються вперше в Україні.

УДК 616-022.6-085:611-018.1

Зміст

Визначення термінів та умовних скорочень	4
Вступ	7
РОЗДІЛ 1. Характеристики стовбурових клітин та перспективи їх використання	13
1.1. Типи стовбурових клітин та їхні характеристики	13
1.2. Перспективи використання мезенхімальних стовбурових клітин	14
РОЗДІЛ 2. Поточний стан ангіогенної клітинної терапії (світовий досвід)	18
2.1. Доклінічна оцінка ефекту клітинної терапії на реваскуляризацію	18
2.2. Клітинна терапія на основі окремих або комбінованих ізольованих клітин	19
2.3. Клітинна терапія на основі клітинних коктейлів	26
2.4. Клінічні випробування	29
2.5. Обмеження в клітинних клінічних випробуваннях	37
2.6. Секретоми (кондиціоновані середовища)	40
2.7. Мезенхімальні стовбурові / прогеніторні клітини, що походять з жиру	42
2.8. Концентрат аспірації кісткового мозку (ВМАС)	44
РОЗДІЛ 3. Організація надання медичної допомоги у лікуванні мезенхімальними стовбуровими клітинами	46
3.1. Місце оптимізації дозування мезенхімальних стовбурових клітин у "Життєвому циклі медико-технологічних документів"	46
3.2. Проектування клінічного маршруту пацієнта	48
РОЗДІЛ 4. Ведення пацієнтів та контроль за кровопостачанням кінцівки	59
4.1. Оцінка вираженості больового синдрому і знеболення	59
4.2. Розрахунок кісточно-плечового індексу	61
4.3. Визначення площі поверхні та об'єму трофічної виразки	62
4.4. Визначення стану мікроциркуляції ураженої кінцівки	63
РОЗДІЛ 5. Висновки	67
Список літератури	69
Додатки	81
7.1. Шкала градації доказовості та сили рекомендацій	81
7.2. Реферативна інформація щодо джерел походження та механізмів дії МСК	83

Визначення термінів та умовних скорочень

ADRC	– стовбурові клітини / клітини-попередники жирової тканини, які мають здатність регенерувати різні пошкоджені тканини
ADRC / ADSC	– регенеративні клітини жирового походження (стовбурові клітини / клітини-попередники жирової тканини)
AFSC	– стовбурові клітини амніотичної рідини
ASC	– стовбурові клітини, отримані з жирової тканини
ASC, SVF, VSEL	– дуже маленькі ембріоподібні стовбурові клітини
ASO	– облітеруючий атеросклероз
CAC	– циркулюючі ангіогенні клітини
CLI / KIK	– критична ішемія кінцівок
CLP	– спільний лімфоїдний попередник
ECFC	– пізні EPC або ендотеліальні колонієутворюючі клітини з ендотеліальним фенотипом
eEPC	– ранні ендотеліальні клітини
ESCs	– ембріональні стовбурові клітини
G-CSF	– гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор
HBcAg	– HB-core-антиген вірусу гепатиту В
HBeAg	– HBe-антиген вірусу гепатиту В
HBsAg	– поверхневий антиген вірусу гепатиту В
HBV	– вірус гепатиту В
HCV	– вірус гепатиту С
HIV1/2	– вірус імунодефіциту людини 1/2 типу
HLA	– головний комплекс гістосумісності

HSCs	– гемопоетичні стовбурові клітини
IgG	– імуноглобуліни G
IgM	– імуноглобуліни M
iPSCs	– індуковані плюрипотентні клітини
MA	– зрілі адипоцити
MAC	– мієлоїдні ангіогенні клітини з гемопоетичним фенотипом
MSCs	– мезенхімальні стовбурові (стромальні) клітини
NSCs	– нейрональні стовбурові клітини
PAD, ЗПА	– захворювання периферичних артерій
PB	– периферична кров (periferal blood)
PB-MNC	– мононуклеарні клітини периферичної крові
PRP	– плазма, збагачена тромбоцитами
SMPC	– гладком'язові клітини-попередники
SVF	– стромальна судинна фракція
TAO	– облітеруючий тромбоемболізм
UCB	– пуповинна кров
UCB-HSCs	– гемопоетичні стовбурові клітини з пуповинної крові
Ves-клітини	– попередники ангіогенних клітин периферичної крові
АлАТ	– аланінамінотрансфераза
АсАТ	– аспартатамінотрансфераза
АТС	– артерія / артерії тилу стопи
АЧТЧ	– активований частковий тромбопластиновий час
БТЛ	– біотехнологічна лабораторія
ВСМК	– клітини гладких м'язів судин
ВСМК	– клітини скелетних м'язів і клітини гладких м'язів судин
ГАС	– глибока артерія стегна

ГГТ	– гамма-глутамілтранспептидаза
ГМК	– гладком'язові клітини
ЕК / ЕРС	– ендотеліальні клітини
ЕРК / ЕРС	– ендотеліальні клітини-попередники
ЗВГА	– задня великогомілкова артерія
ЗОЗ	– заклад охорони здоров'я
КМ / ВМ	– кістковий мозок (bone marrow)
КПІ, АВІ	– кісточно-плечовий індекс
ЛШСК	– лінійна швидкість систоли кровотоку
МАСК	– мезенхімальні аутологічні стовбурові клітини
ММР	– матриксні металопротеїнази
МНВ	– міжнародне нормалізоване відношення
МНК	– мононуклеарні клітини
МСК	– мезенхімальні стовбурові клітини
Пі	– пульсаційний індекс (Pulsative index – PI)
ПОК	– питомий об'ємний кровотік
ПЯ / ПР	– побічні явища / побічні реакції
Рі	– резистивний індекс (Resistive index – RI)
РСТ	– регіонарний тиск систоли
С-РБ	– С-реактивний білок
ССЗ	– серцево-судинні захворювання
УЗД	– ультразвукова діагностика
ХКІНК	– хронічна критична ішемія нижніх кінцівок
ЦД	– цукровий діабет

Вступ

Критична ішемія кінцівок (KIK/CLI) є найважчою формою захворювання периферичних артерій (ЗПА/PAD), поширеним проявом атеросклерозу та інших судинних уражень, які спричиняють блокаду основних магістральних артерій, включаючи порушення церебрального та коронарного кровопостачання [1]; частіше зустрічається в нижніх кінцівках, ніж у верхніх [2]. ЗПА уражує приблизно 10–15% дорослого населення, будучи недооціненим і недостатньо діагностованим серцево-судинним захворюванням (ССЗ) через малосимптомні початкові стадії [3]. ЗПА пов'язані з такими факторами ризику, як артеріальна гіпертензія, дисліпідемія, літній вік та паління тютюну/куріння [4], і вони більш поширені у діабетиків через метаболічні зміни, а також прогресування системного запалення, ендотеліальну дисфункцію або порушення ангиогенезу [5–8].

Щорічна захворюваність на CLI орієнтовно складає 0,35%, а середня поширеність – 1,33%, уражуючи 500–1000 осіб на 1 мільйон населення у Європі та Сполучених Штатах [9]. Пацієнти з CLI оцінюються на основі клінічних критеріїв дистанції ходьби, трофічних змін, больового синдрому і гемодинамічних параметрів (як-то: реєстрації параметрів пульсу, величин тиску в гомілкках і пальцях ніг, болю в стані спокою та втрати маси тканин кінцівки) [10–12], прийнятих у міжнародних узгоджених рекомендаціях щодо PAD.

Більшість пацієнтів з CLI потребують реваскуляризаційних втручань, таких як шунтування або ангиопластика. За останні десятиліття і на сьогодні спостерігається значне вдосконалення методів і пристроїв, що застосовуються (кріопластика, стент-трансплантати, балони або стенти з лікувальним покриттям тощо). Тим не менш, відсоток пацієнтів, які підходять

для цих операцій, не перевищує 45 % через проблеми, пов'язані з хірургічним втручанням, та важку супутню патологію. Крім того, пацієнтам, які піддаються хірургічному втручанням, іноді потрібна невідкладна ампутація [13]. Рівень ампутації є неприйнятно високим і зазвичай перевищує 15–20 % протягом 1 року та може змінюватися залежно від наявності супутніх захворювань [14], таких як цукровий діабет (ЦД), що підвищує цей показник до 50 % [15].

В той же час за останні десятиліття відзначається значне зростання захворюваності на облітеруючий атеросклероз черевної частини аорти і периферичних артерій, сягаючи 7,7 % у віці 41–50 років, 8,4 % — у віці 51–60 років, 23 % — у віці 61–70 років (*L. N. Mertens et al., 2000*). У 20–40 % таких пацієнтів розвивається хронічна критична ішемія нижніх кінцівок (ХКІНК) (*Management of Peripheral Artery Diseases (PAD). Trans Atlantic Inter — Society Working group (TASG), 2000*). У понад 90 % хворих на ХКІНК протягом першого року після встановлення діагнозу виконується ампутація, проводяться реконструктивні або ангіопластичні операції (*J. P. Pell et al., 1992*). Протягом першого року з моменту встановлення діагнозу потребують високої ампутації кінцівки 25 % хворих і 25 % помирають (*J. Dormandy et al., 1999*). За даними *Fagrell B. (1992)*, кількість хворих, що страждають на ХКІНК, сягає 600–800 на 1 млн жителів (*Critical limb ischaemia: comments on consensus document*). Проведені в Базельському університеті та Фрамінгеймі дослідження дали близькі показники за числом ампутацій серед усіх хворих з переміжною кульгавістю — 1,6 і 1,8 % відповідно. Невтішні віддалені результати ампутацій з приводу ХКІНК. На 5-й рік після операції помирають до 70 %, а на 10-му році — переважна кількість оперованих.

Поєднане атеросклеротичне ураження судин серця, головного і спинного мозку, нирок, шлунково-кишкового тракту, таза і верхніх кінцівок викликає синдром "взаємного

обтяження”, особливо у випадках ХКІНК. Звідси, відповідно, й складнощі у виявленні істинної частоти ХКІНК. З вищенаведеного стає ясно, чому ХКІНК перетворилась у найважливішу соціальну і медичну проблему.

Вищенаведені дані свідчать про наявність низки не вирішених та недостатньо вивчених питань лікування ХКІНК. Як результат, реконструктивні операції з приводу ХКІНК у 12–34 % випадків закінчуються тяжкими ішемічними ускладненнями не тільки з боку кінцівок, а й в інших одночасно уражених артеріальних басейнах. Зустрічаються лише поодинокі відомості про вибір доз та комбінацій медикаментозної терапії, але вони не систематизовані, а також недостатньо розроблено методики лікування таких хворих альтернативними методами.

Невирішеність вищезазначених проблем є основною причиною незадовільних безпосередніх та віддалених результатів лікування хворих на ХКІНК. Для покращення цих результатів необхідно розробити нові, достовірно ефективніші методи терапії ХКІНК. Розв’язання цієї проблеми сприятиме підвищенню ефективності надання допомоги таким хворим в Україні. Актуальність даної проблеми зумовлена також забезпеченням права пацієнтів на якісну медичну допомогу шляхом отримання реципієнтами для трансплантації безпечних та якісних препаратів мезенхімальних аутологічних стовбурових клітин (МАСК). З огляду на те, що ангіогенез і васкулогенез є терапевтичними стратегіями постнатальної неоваскуляризації, ендогенне утворення нових кровоносних судин і мікросудинний ангіогенез є важливими механізмами самозахисту, коли тканина піддається сильній ішемії [16]. Однак такий механізм, як формування ендогенних колатеральних судин, опосередкований проліферацією та міграцією ендотеліальних клітин на основі вивчення модуляції коронарного кровотоку у людей, пригнічується супутніми захворюваннями, такими як цукровий діабет, і такими чинниками, як: куріння, гіперхолестерине-

мія, а також впливом віку, атеросклерозу, гіперхолестеринемії та гіпертонії, тощо [17]. Нерідко трапляються випадки, коли пацієнти з ЦД втрачають деякі частини своїх кінцівок після важкої обструктивної хвороби периферичних артерій через недостатній розвиток колатеральних судин і ангиогенезу. Таким чином, варіант лікування під назвою “терапевтичний ангиогенез” є важливою стратегією порятунку тканин від критичних ішемічних станів [16].

З огляду на це, найбільшу перспективу безпечного використання мають дорослі стовбурові клітини, зокрема мезенхімальні стовбурові клітини. Як відомо, стовбурові клітини наділені властивостями самовідновлення і мають мультилінійний потенціал до диференціювання, що робить їх привабливим інструментом клітинної терапії в клініці. Однак через багато етичних та правових обмежень, клінічний розвиток та прогрес терапії стовбуровими клітинами був відносно повільним. Власні стовбурові клітини дорослого організму звільняються від вищезазначених етичних і законодавчих обмежень, володіючи при цьому чудовими регенеративними властивостями, тому терапевтичне використання стовбурових клітин дорослого організму є безпечнішим, ніж плюрипотентних клітин, наприклад ембріональних або індукованих плюрипотентних. Дослідження показали, що терапія стовбуровими клітинами стає однією з нових стратегій лікування кількох рефрактерних станів і захворювань, для яких не існує дієвого способу лікування, включаючи ХКІНК у випадках відсутності можливостей хірургічної корекції, і МАСК може стати наразі терапією останнього відчаю.

Отже, перспективи використання мезенхімальних стовбурових клітин та нестача вітчизняних розробок за цим напрямом обґрунтовують актуальність розробки і видання даних методичних рекомендацій на основі проведених міжнародних клінічних досліджень. У роботі проведено оцінку можливості вживання МАСК у хворих з важкими формами

ішемії нижніх кінцівок атеросклеротичного генезу і можливості цього біопрепарату впливати на якість життя, кровообіг у периферичних артеріях, ліпідний обмін і стан атеросклеротичних бляшок у хворих важкими формами ішемії нижніх кінцівок атеросклеротичного генезу в умовах безперспективного хірургічного лікування.

Ці методичні рекомендації призначені для судинних хірургів і ангіологів, лікарів загальної практики, управлінців у сфері охорони здоров'я і може використовуватись для створення та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги в системі охорони здоров'я України. **Методичні рекомендації видаються вперше в Україні.**

Мета розробки, матеріали та методи досліджень

Мета розробки:

На основі поглибленого вивчення певних ланок патогенезу ХКІНК, механізму дії та достовірного розрахунку оптимального дозування МАСК за співвідношенням ефективність/безпечність та з використанням сучасних методів діагностики і контролю, покращити безпосередні та віддалені результати лікування хворих на ХКІНК.

Об'єкти розробки:

- ▶ міжнародний і вітчизняний досвід надання медичної допомоги з використанням МСК у хворих на ХКІНК, що наведений у рецензованих наукових фахових виданнях;
- ▶ технологія забору, виготовлення та застосування аутологічних МСК у хворих на ХКІНК з відповідними методами контролю в процесі лікування;
- ▶ клінічні маршрути пацієнта з ХКІНК на рівні закладу охорони здоров'я.

Предмет розробки:

Хворі з атеросклеротичними оклюзивно-стенотичними ураженнями нижніх кінцівок на різних стадіях їхньої ішемії, насамперед критичної.

Методи досліджень: лабораторні, інструментальні, бібліосемантичний; медико-статистичний, прогнозування, методи системного підходу та методи статистичної обробки, системного аналізу, моделювання.

Розділ 1

Характеристики стовбурових клітин та перспективи їх використання

1.1. Типи стовбурових клітин та їхні характеристики

Уперше феномен генерування всіх ліній клітин крові із самовідновлюваної популяції гемопоетичних клітин кісткового мозку був відкритий Джеймсом Тіллом та Ернестом Мак-Каллоком на початку 1960 років. Ці клітини були названі “стовбуровими клітинами”.

На даний час проведено значний обсяг досліджень, що надало змогу визначити патологічні стани людини, при яких застосування стовбурових клітин приводить до досягнення значного терапевтичного ефекту (<https://parentsguidecordblood.org/en/diseases>). До цих захворювань віднесені: лейкемії, мієлодиспластичний синдром, лімфоми, анемії, спадкові захворювання еритроцитів та тромбоцитів, тяжкі спадкові комбіновані імунодефіцити, спадкові нейтропенії, мієлопроліферативні захворювання, фагоцитарні порушення, рак кісткового мозку, солідні пухлини, мукополісахаридози, лейкодистрофічні порушення, порушення нервової системи, аутоімунні захворювання, ССЗ, ЦД, генетичні та метаболічні порушення, захворювання опорно-рухового апарату тощо.

Слід зазначити, що стовбурові клітини не є однорідними, їм притаманні певні характеристики (*Nagwa El-Badri, 2020*): неспеціалізованість і недиференційованість; відмінна здатність до само-

оновлення і можливість проходити тривалі періоди поділу як *in vitro*, так і *in vivo*; здатність диференціюватись в різні спеціалізовані клітини і клітинні лінії під певними фізіологічними, патологічними і/або експериментальними впливами; здатність до асиметричного поділу на дві неідентичні дочірні клітини з відмінною та різною долею.

Також стовбурові клітини поділяють за здатністю до подальшої диференціації на тотипотентні, плюрипотентні, мультипотентні, олігопотентні й уніпотентні клітини і за типами відповідно до походження.

Стовбурові клітини також визначають як аутологічні, що продукуються у власному організмі майбутнього реципієнта, та аlogenні, чи донорські.

Крім того, важливими характеристиками стовбурових клітин є різна здатність до спонтанної онкогенної трансформації та формування імунної відповіді у реципієнта. Зазначені характеристики слід відносити до ризикоутворюючих при виборі підходів до застосування. Порівняння характеристик різних типів стовбурових клітин наведено у таблиці 1.

Виходячи з вищенаведених даних, мінімальні ризики при терапевтичному застосуванні притаманні дорослим стовбуровим клітинам (*HSCs*, *MCK*, *NSCs*). Водночас ця група характеризується обмеженою здатністю до самооновлення, що пов'язано з походженням із "дорослих тканин".

1.2. Перспективи використання мезенхімальних стовбурових клітин

У сучасній медичній практиці одними з головних трендів при виборі методу лікування і застосуванні того чи іншого лікарського засобу є наявність доведеної інформації про його безпечність для пацієнта та визначеність з оптимальним дозуванням при використанні для лікування різних патологічних станів.

Таблиця 1

Тип клітини	Ембріональні стовбурові клітини (ESCс)	Дорослі стовбурові клітини (HSCs, MCK, NSCs)	Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSCs)
Походження	Плюрипотентні клітини, які походять з внутрішньої клітинної маси бластоцист	Мультипотентні клітини, які походять з дорослих тканин	Соматичні клітини, перепрограмовані в ембріоноподібні плюрипотентні стовбурові клітини
Здатність до самооновлення	Висока	Обмежена	Висока
Потенціал	Плюрипотентні	Мультипотентні	Плюрипотентні
Здатність до диференціації	Може диференціюватись у клітини будь-якого з трьох зародкових листків	Обмежена лінійна диференціація	Може диференціюватись у клітини будь-якого з трьох зародкових листків
Спонтанна онкогенна трансформація	Присутня	Відсутня	Присутня
Імунна відповідь	Присутня	Присутня	Присутня
Етичні проблеми	Так	Ні	Мінімальні

З огляду на це, найбільшу перспективу безпечного використання мають дорослі стовбурові клітини, зокрема МСК.

Дослідниками було проаналізовано 129 джерел зарубіжної та вітчизняної рецензованої наукової медичної інформації з питань терапевтичного застосування МСК в експерименті і клініці

при ХКІНК. Характерною особливістю проаналізованих даних було те, що вони відображали кращу медичну практику, водночас не містили системного підходу до визначення оптимальних доз препарату МСК за співвідношенням ефективність/безпеку. Також була практично відсутня інформація про клінічні маршрути пацієнтів та організацію логістичної підтримки користувачів.

Зазначені перспективи використання МСК та фактична відсутність вітчизняних розробок за цим напрямом обґрунтовують актуальність проведення нашого дослідження.

Засоби і методи оцінки ефективності лікування

Стан регіональної гемодинаміки ураженої і контралатеральної кінцівок слід оцінювати за результатами доплерографії. Реєструється лінійна швидкість систоли кровотоку (ЛШСК), об'ємна швидкість кровотоку, показники периферичного опору: P_i — пульсаційний індекс (*Pulsative index — PI*), R_i — резистивний індекс (*Resistive index — RI*). Морфологічний стан судинної стінки артерій нижніх кінцівок оцінюється за товщиною комплексу "інтима-медіа" (KIM), ступенем стенозування, динамікою зростання атеросклерозних бляшок у магістральних та глибокій артерії стегна (ГАС). Ультразвукові доплерографічні дослідження слід виконувати на ультразвукових апаратах (наприклад, моделі 5000 фірми "ALOKA" (Японія) за допомогою датчиків 4 і 8 МГц. Реєструються швидкість і напрям кровотоку по артерії нижньої кінцівки. Не менш важливим показником, який характеризує регіонарну гемодинаміку, є питомий об'ємний кровотік (ПОК), який також може бути вивчений у хворих.

Ультразвукова доплерографія артерії нижньої кінцівки проводиться з визначенням кісточково-плечового індексу (КПІ) по задній великогомілковій артерії (ЗВГА) і артерії тилу стопи (АТС). З метою виміру регіонарного тиску (РСТ) систоли слід використо-

увати пневматичну манжету, яка накладається на гомілку кінцівки. Тиск у манжеті, при якому поновлюється кровотік у дистальній ділянці кінцівки під час декомпресії, є тиском систоли на рівні накладення манжети. Обов'язковими умовами дослідження має бути максимально близька відстань між пневматичною манжею і місцем локації артерії, реєстрація першого комплексу систоли під час декомпресії манжети; швидкість декомпресії манжети має дорівнювати 0,3 кПа (2 мм рт. ст.) на один комплекс систоли. РСД визначається в положенні хворого лежачи, при температурі комфорту (18–21 °С). Оскільки показник РСТ залежить від системного артеріального тиску, слід розраховувати індекс РСТ як відношення РСТ на артерії гомілки до тиску на плечовій артерії. Таким чином, за об'єктивну величину артеріального перфузійного тиску приймається максимальний тиск систоли (*див. розділ 4*).

Кров для біохімічних досліджень слід брати вранці натще-серце до початку введення/прийому МАСК у проміжку з 8 до 9 години ранку. Для визначення ліпідного спектра крові і С-РБ слід використовувати сироватку крові. Зразки сироватки слід заморожувати і зберігати при –20 °С. Показники ліпідів крові слід визначати ферментативним колориметричним методом, С-РБ — імуноферментним методом *ELISA*. Функціональний стан ендотелію судин слід оцінювати за результатами проби з реактивною гіперемією. Наявність дисфункції ендотелію передбачається, якщо приріст діаметра плечової артерії складає менше 10% лазерної доплерівської флоуметрії (ЛДФ).

Можливі сфери застосування

Дана робота спрямована на розробку нових методик лікування хворих з ХКІНК для покращення безпосередніх та віддалених результатів хірургічного лікування в судинних відділеннях різного профілю та серцево-судинних клініках м. Києва та України.

Розділ 2

Поточний стан ангіогенної клітинної терапії (світовий досвід)

2.1. Доклінічна оцінка ефекту клітинної терапії на реваскуляризацію

Тваринні моделі ХКІНК використовуються не тільки для вивчення самої хвороби [18, 19]; вони також забезпечують відповідний сценарій для оцінки стратегій індукції неоваскуляризації або зменшення запальної відповіді. *Frantisek Jaluvka et al.* [123] зібрали унікальний світовий досвід щодо доклінічної оцінки ефектів клітинної терапії на реваскуляризацію кінцівок. Відслідковані в цих дослідженнях результати з різними моделями дозволяють нам оцінити мобілізацію клітин у відповідь на ішемію [20–23]. Крім того, аналізи біорозподілу є важливими для визначення долі клітини [24, 25] і, що більш важливо, дозволяють оцінити профіль біобезпеки, що вимагається нормативними вказівками перед початком клітинної терапії в клініці [26]. Крім того, для лікування зазвичай застосовують тестування людських компонентів, таких як людські клітини, імунодепресованих тварин (голих, безтимусних тощо) [27].

Таким чином, щоб досягти доклінічної оцінки ефекту клітинної терапії на реваскуляризацію, важливо спочатку мати можливість досягти оптимальної моделі ХКІНК, здатної максимально нагадувати характеристики, виявлені у людей. Дотепер лігуван-

ня стегнової артерії залишається найпоширенішим підходом для створення моделі ХКІНК, яке зазвичай виконується на одній кінцівці, залишаючи іншу під неішемичний контроль. У дослідженнях із залученням тваринних моделей ХКІНК для аналізу потенційної неоваскуляризації зазвичай застосовуються різні стратегії. *Lucía Beltrán-Camacho* зі співавторами зібрали унікальний дослідницький матеріал [126] (табл. 2).

2.2. Клітинна терапія на основі окремих або комбінованих ізольованих клітин

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК/*MSCs*) є найбільш використовуваними клітинами в прогресивній терапії серцево-судинних захворювань [55]. МСК можна виділити з кісткового мозку, периферичної крові або жирової тканини, і з них можна отримати остеобласти, хондроцити, адипоцити, нейрони, ендотеліальні клітини (ЕК), клітини скелетних м'язів і клітини гладких м'язів судин (ВСКМ) [56]. Загальновідомо, що МСК сприяють ангіогенезу через їх здатність індукувати проліферацію, міграцію та утворення трубок ЕК, одночасно зменшуючи апоптоз і фіброз [55, 57, 58]. Крім того, МСК підтримують неоангіогенез, вивільняючи розчинні фактори, які сприяють стимуляції ангіогенезу [59]. Вважається, що ці клітини знижують ішемію задніх кінцівок лабораторних тварин шляхом секреції цитокінів, які регулюють диференціацію макрофагів до рівня *M2* протизапального фенотипу [60]. Подібним чином, крім МСК, ендотеліальні клітини-попередники (ЕРК/*EPC*) також представляють важливу групу клітин, які сприяють регенерації судин. У 1997 році *Асахара та ін.* продемонстрували, що клітини *CD34+* можна виділити з мононуклеарних клітин периферичної крові (*PB-MNC*) і диференціювати *in vitro* в ЕС з демонстрацією потенційного їх використання для посилення росту колатеральних судин в ішемізованих тканинах [61]. Хоча *CD34* не є специфічним маркером одного типу

Таблиця 2. Перелік найважливіших доклінічних досліджень стосовно клітинної терапії

Тип клітин	Автор (рік)	Посилання	Джерело клітин	Тварина (штам)	Доза ($\times 10^5$ клітин)	Шлях введення клітин	Термін дослідження (тижні)	Методика оцінки результату
hESC-ECP	MacAskill (2018)	24	Лінія hESC	Миші (індуктор CDT-1-STZ DM)	10	IM	3	BFP, CD
hBM-MNCs	Rojas-Torres (2020)	25	Кістковий мозок	Миші (Balb-C Nude)	10	IM	3	BFP, CD, FS, VD
hCACs	Beltrán-Samacho (2020)	125	Периферична кров	Миші (Balb-C Nude)	5	IM	4 дні	BFP, CD, FC, VD
aMSCs	Cunha (2013)	28	Кістковий мозок	Миші (Balb-C & C57/BL6)	5	IM	4	VS, CD, TR
hMSCs	García-Vazquez (2019)	29	Жирова тканина	Миші (Athymic nude)	6	IM	3	BFP, CD, VS
aMSCs	Nammián (2021)	30	Кістковий мозок і жирова тканина	Миші (C57/BL6)	5	IM	4	FS, CD

Тип клітин	Автор (рік)	Посилання	Джерело клітин	Тварина (штам)	Доза ($\times 10^5$ клітин)	Шлях введення клітин	Термін дослідження (тижні)	Методика оцінки результату
<i>hMSCs + hECFCs</i>	Rossi (2017)	31	Кістковий мозок і периферична кров	Миші (<i>Athyritic nude</i>)	N/A	IV	2	BFP, CD, VS
<i>hCD34+</i>	Lian (2018)	32	Периферична кров	Миші (<i>Balb-C Nude</i>)	1	IM	3	FS, VS
<i>hEPCs</i>	Kalka (2000)	33	Периферична кров	Миші (<i>Athyritic nude</i>)	5	IC	4	BFP, CD, VS
<i>hEPCs</i>	Urbich (2003)	34	Периферична кров	Миші (безтумусний NMR1 голій)	5	IV	2	BFP, CD
<i>hEPCs</i>	Zhao (2016)	35	Аорта плода	Щур (Гото — Казіаки)	100	IM	8	BFP, CD, VS
<i>hEPCs + hOECs</i>	Yoon (2005)	36	Периферична кров	Миші (<i>Athyritic nude</i>)	2	IM	3	BFP, CD, VS, MP
<i>hEPCs + hSMPCs</i>	Foubert (2008)	37	Пуповинна кров	Миші (<i>Athyritic nude</i>)	5	IV	2	BFP, CD, AD

Тип клітин	Автор (рік)	Посилення	Джерело клітин	Тварина (штам)	Доза ($\times 10^5$ клітин)	Шлях введення клітин	Термін дослідження (тижні)	Методика оцінки результату
<i>a</i> BM-MNCs	<i>Shintani (2001)</i>	38	Кістковий мозок	Кролик (самець ново-зеландський білий)	5	IM	4	BFP, CBP, CD, CVF
<i>a</i> BMCS	<i>De Nigris (2007)</i>	39	Кістковий мозок	Миші (ApoE-/-)	20	IV	2	BFP, CD, CVF
<i>a</i> BM-MNCs	<i>Jeon (2007)</i>	40	Кістковий мозок	Миші (C57/BL6)	20	IM	4	CD, CVF
<i>a</i> BM-MNCs	<i>Gan (2009)</i>	41	Кістковий мозок	Миші (C57/BL6)	30	IM	2	BFP, CD
<i>h</i> BM-MNCs	<i>Liu (2009)</i>	42	Кістковий мозок	Миші (C57/BL6 ApoE-/-)	250	IA	4	BFP, CVF
<i>a</i> BM-MNCs	<i>Brenes (2012)</i>	43	Кістковий мозок	Миші (C57/BL6)	5, 10 і 20	IM	4	BFP, CD, PS
<i>a</i> BM-MNCs	<i>Reis (2014)</i>	44	Кістковий мозок	Миші (Balb-C)	5	IM	4	CD, TR, VS
<i>a</i> BMС-похідний макрофаги	<i>Kawahara (2014)</i>	45	Кістковий мозок	Миші (C57/BL6N)	1	IM	4	BFP, CD

Тип клітин	Автор (рік)	Посилання	Джерело клітин	Тварина (штам)	Доза ($\times 10^5$ клітин)	Шлях введення клітин	Термін дослідження (тижні)	Методика оцінки результату
<i>h</i> ALDH високоактивні клітини	Sarossia (2009)	46	Кістковий мозок	Миші (NOD/SCID <i>b2M</i>)	1-2	IM	3	BFP, CD
<i>a</i> M1AM1 клітини	Rahnemati-Azar (2011)	47	Кістковий мозок	Миші (Balb-C)	10	IM	4	BFP, CD, FS, VS
<i>h</i> PB-MNCs ¹	Li (2006)	48	Периферична кров	Миші (Athymic nude)	10	IM	4	BFP, AI, CD, VS
<i>a</i> PB-MNCs + PRP	Padilla (2020)	49	Периферична кров	Щурі (Вістар)	15	IM	4	AI, VIP
<i>a</i> ASCs	Liu (2020)	50	Жирова тканина	Миші (C57/BL6)	10	IM	3	BFP, CD, VS
<i>a</i> ASCs + макрофаги	Rybalko (2017)	51	Жирова тканина	Миші (C57/BL6)	2	IM	3	BFP, CD
<i>h</i> SVF	Jin (2017)	52]	Жирова тканина	Миші (оголені)	10	IM	2	BFP, VS, CD, MP

Тип клітин	Автор (рік)	Посилання	Джерело клітин	Тварина (штам)	Доза ($\times 10^5$ клітин)	Шлях введення клітин	Термін дослідження (тижні)	Методика оцінки результату
PDX-PAD (прирождена строма клітини)	Prather (2009)	53	Плацента	Миші (Balb-C)	10	IM	3	BFP, CD, PS
PLX-PAD (MCK як строма клітини)	Zahavi-Goldstein (2017)	54	Плацента	Миші (C57/BL6)	0,02–10	IM & SC	3	BFP, VS

Таблиця містить матеріали: Lucía Beltrán-Samacho et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2335, 6–7 of 27. (<https://www.mdpi.com/journal/ijms>).

Таблиця містить: тип використаних клітин, першого автора та рік публікації, номер авторського посилання, джерело клітин, тварину і штам, кількість введених клітин, шлях введення, подальше спостереження та параметри, перевірені для оцінки результату терапії.

Примітка: 1 — клітини, мобілізовані G-CSF.

Скорочення: а: аутологічний; AD: артеріальна щільність; AI: ангіографічний індекс; BFP: перфузія кровотоку; CBP: артеріальний тиск на голміці; CD: капілярна щільність; CVF: утворення колатеральних судин; ESC-ECF: Stem cell-derived endothelial cell product; FS: функціональна шкала; h: людський; IA: внутрішньоартеріальний; IC: внутрішньосерцевий; IM: внутрішньом'язовий; IV: внутрішньовенний; MP: Matrigel plug; SC: підшкірний; TR: регенерація тканин; VD: діаметр судин; VIP: Vascular intersection percentage; VS: візуальна аналогова шкала.

клітин, він здебільшого асоціюється з *EPC*. Багато дослідників досліджували потенціал використання *EPC* у тканинній інженерії як ангіогенного джерела для відновлення судин [62, 63].

В останні роки було описано декілька методів ізоляції та культивування *EPC*. Крім того, залишається суперечка щодо визначення фенотипів *EPC*, оскільки різні дослідження все ще представляють різноманітні результати щодо поверхневих маркерів *EPC* [62, 64, 65].

Принаймні, дві різні субпопуляції були прийняті та чітко визначені на основі їхнього статусу диференціації та здатності утворювати колонії: ранні *EPC* (*eEPC*), також названі циркулюючими ангіогенними клітинами (*CAC*), або мієлоїдними ангіогенними клітинами (*MAC*) з гемопоетичним фенотипом, та пізні *EPC*, або ендотеліальні колонієутворюючі клітини (*ECFC*) з ендотеліальним фенотипом [65]. Вважається, що *EPCs* походять від гемопоетичних стовбурових клітин (*HSCs*), деякі *EPCs* можуть бути отримані з ніші, розташованої поблизу *vasa vasorum* у стінці макросудин. Незважаючи на суперечки щодо природи цих клітин, ніхто не заперечує потенціал *EPC* для сприяння терапевтичному ангіогенезу та неоваскуляризації ішемізованих тканин [32, 33]. Загалом, у відповідь на пошкодження цитокіни та фактори росту мобілізують *EPC* з кісткового мозку в периферичну кров, яка потім бере участь у неоваскулогенезі [32]. Зовсім недавно було показано, як у перші дні після введення *CAC* мишам з ішемічною ХКІНК ці клітини мігрують в ішемізовані тканини, модулюючи рекрутинг імунних клітин і сприяючи збільшенню ангіогенезу та артеріогенезу. Однак введені клітини не залишаються в ішемізованих тканинах з часом; це свідчить про те, що вони можуть сприяти васкулогенезу в паракринній формі [108]. Крім того, ранні *EPCs*, здається, не відрізнялися від *ECs*, причому ця роль призначається *ECFCs* [106, 109]. Дійсно, різні дослідження підтверджують, що регенеративні властивості *eEPC* здебільшого зумовлені паракринними ефектами, тоді як *ECFC* демонструють судиноутворювальну активність *in vivo*. Таким чином, клітинна терапія, опосередкована обома типами

клітин — ранніми та пізніми *EPCs* — може стати хорошою стратегією для лікування серцево-судинних захворювань. *Юн та ін.* оцінили цю комбіновану клітинну терапію, продемонструвавши синергетичну неоваскуляризацію за участю кількох цитокінів і матриксних металопротеїназ (*MMP*) [36]. Нещодавно було підтверджено потенціал *CAC* для сприяння ангиогенезу *ECFC in vitro*, і такий ефект був помічений в атеросклеротичному середовищі. Таким самим чином були протестовані різні комбінації клітин. Так, *Россі та ін.* продемонстрували, що спільне введення *MSC* з *ECFC* у мишачій моделі ХКІНК збільшує щільність судин і перфузію стопи у більшому співвідношенні, ніж клітини, які вводили окремо; це підтверджує теорію про те, що *MSC* підтримують ангиогенні процеси, опосередковані *ECFC* [31]. Крім того, їхні результати показали, що *MSC* прискорюють відновлення м'язів через ендоглінозалежний/ендотеліозалежний механізм. Подібним чином, комбінація *EPC* і гладком'язових клітин-попередників (*SMPC*) також була оцінена для лікування ХКІНК. Ця суміш клітин покращила формування судинної мережі, причому як *EK*, так і гладком'язових клітин (*ГМК*), які брали участь у дозріванні та стабільності судин. Подібним чином *Foubert та ін.* продемонстрували, що спільне введення *EPCs* і *SMPCs* активує неоваскуляризацію, а це приводить до ефективнішої терапії, ніж коли ці клітини вводяться окремо [37]. Дослідження показують, що *ГМК* також можуть походити з клітин кісткового мозку, оскільки *КМЦ* були ідентифіковані в периферичній крові [66].

2.3. Клітинна терапія на основі клітинних коктейлів

Як альтернатива ін'єкції одного типу клітин або комбінації двох раніше ізольованих клітин, введення клітинних коктейлів, отриманих з різних ніш, таких як кістковий мозок, периферична кров або жирова тканина, також є частим підходом до лікування

ХКІНК. Дійсно, регенеративні властивості мононуклеарних клітин (МНК), отриманих з кісткового мозку або периферичної крові, були значною мірою вивчені в останні роки. Терапія з використанням мононуклеарних клітин кісткового мозку є багатообіцяючою альтернативою для пацієнтів з ХКІНК, щоб уникнути або відстрочити невідворотну ампутацію [67]. *BM-MNCs* складаються з гетерогенної суміші мультипотентних стовбурових клітин, які працюють спільно, як *MSCs*, *HSCs*, *EPCs*, моноцити, лімфоцити та плюрипотентні стовбурові клітини [25, 68].

Дослідники повідомили про сприятливий вплив різних комбінацій *BM-MNCs*, що представляє ефективний підхід до сприяння утворенню нових судин, відновлення перфузії та зміни на краще ХКІНК [25, 59]. В ішемізованій тканині *BM-MNC* продукують і секретують різні цитокіни та фактори росту і збільшують неоваскуляризацію та утворення колатеральних судин при ішемії кінцівок [38]. Крім того, *Kikuchi-Taura et al.* нещодавно описали, що трансплантація *BM-MNCs* у модель мишачого інсульту сприяла ангиогенезу *ECs* за допомогою міжклітинних взаємодій, опосередкованих щільними з'єднаннями, що пояснює нову теорію того, як працює клітинна терапія, і припускає, що стовбурові клітини постачають енергію у пошкоджені клітини. В результаті цього дослідження виникло припущення, що в умовах гіпоксії трансплантовані *BM-MNCs* здатні переносити невеликі молекули до *ECs* через взаємодії щільних з'єднань; це призводить до активації *HIF-1 α* , що своєю чергою індукує регуляцію поглинання *VEGF* в *ECs*.

Як альтернатива *BM-MNCs*, *PB-MNCs* утворюються циркулюючими клітинами з ангиогенним потенціалом, тому кілька досліджень, що включають введення цих клітин для лікування ХКІНК, також показали багатообіцяючі результати. *Li et al.* провели порівняння між клітинами *CD34+* і *CD34-* в *PB-MNCs*, дійшовши висновку, що обидві індукують неоваскуляризацію, але лише *CD34+* вбудовуються в нові капіляри [48]. *PB-MNCs* сприяють реваскуляризації в ішемічних кінцівках, навіть більше, коли вони комбінуються зі збагаченою тромбоцитами плазмою (*PRP*)

[49]. *PRP*, джерело тромбоцитів, цитокінів і факторів росту, бере участь у проліферації та диференціації ЕК, взаємодіючи з важливими клітинними рецепторами, пов'язаними з ангиогенезом [49]. Крім того, щоб досягти високих концентрацій стовбурових клітин, гемопоетичні фактори росту часто використовуються для індукції клітинної мобілізації. Наприклад, перед збиранням *PB-MNCs* клітини-попередники зазвичай мобілізують ін'єкцією гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (*G-CSF*). Лікування *BM-MNC* та *PB-MNC* порівнювали, але суттєвих відмінностей між ними не спостерігали. Примітно, що без попередньої мобілізації *PB-MNC* показали вищу концентрацію зрілих клітин, таких як еритроцити, тромбоцити, лімфоцити та моноцити, тоді як *BM-MNC* демонстрували вищі рівні *EPC*. Використання стовбурових клітин, отриманих із жирової тканини (*ASC*), зросло в останні роки через легшу доступність, велику кількість і менш болючий збір порівняно з іншими джерелами, такими як кістковий мозок. Стромальна судинна фракція (*SVF*), отримана з жирової тканини, містить гетерогенні популяції клітин, такі як мезенхімальні клітини-попередники/стовбурові клітини, преадипоцити, ендотеліальні клітини, перицити, Т-клітини та макрофаги *M2*. Мезенхімальні клітини-попередники/стовбурові клітини, отримані з *SVF*, які зазвичай називають самими *ASC*, можуть бути легко розмножені *in vitro* та мають великий потенціал для диференціювання в кілька ліній, включаючи міогенні, остеогенні, нейрогенні та гемопоетичні ланцюги. Ангіогенні властивості цих клітин корелюють із сильною паракринною активністю та секрецією значної кількості пов'язаних з ангиогенезом цитокінів [136]. Крім того, введення *ASC* мишам з ХКІНК сприяло значному відновленню кровотоку в кінцівках мишей, які отримували *ASC*, порівняно з мишами з ішемією без лікування. За наявності *ASC* у м'язах виявляється більша кількість макрофагів з підвищеною присутністю макрофагів саме *M2* [50], і їх введення в мишачій моделі ХКІНК індукувало ангиогенний процес в ішемічній тканині. *ASC* дуже поширені в жировій тканині, що робить майже непотрібним роз-

ширення культури цих клітин. Крім того, забір жирової тканини вимагає мінімально інвазивного втручання.

Нещодавно було опубліковано пілотне дослідження з використанням регенеративних клітин жирового походження (*ADRC*) у пацієнтів з ХКІНК; також розглядалися інші клітини з потенціалом мультидиференціації, такі як стовбурові клітини амніотичної рідини (*AFSC*) або стовбурові клітини/клітини-попередники пуповинної крові та плаценти. Отримані з плаценти стромально-подібні клітини МСК (*PLX-PAD*) у мишей з ХКІНК наразі проходять випробування у III фазі дослідження (*PACE Trial*) з пацієнтами з атеросклеротичною ХКІНК (*NCT03006770*) після багатообіцяючих результатів експериментів на тваринах [54]. На жаль, низька доступність цих клітин разом з етичними проблемами, пов'язаними з їх використанням, обмежує їхній потенціал для клітинної терапії.

2.4. Клінічні випробування

Обнадійливі результати, отримані в результаті доклінічних досліджень, спонукали вчених до початку численних клінічних випробувань: на сьогодні понад 50 досліджень вивчали різноманітні варіанти клітинної терапії, зазвичай із застосуванням МНК, отриманих з КМ або периферичної крові, демонструючи скромні, але обнадійливі покращення ішемічних симптомів [140, 141]. Пацієнти, які брали участь у цих дослідженнях, як правило, страждали від важких стадій ЗПА (Фонтейн III–IV) з болем у спокої через облітеруючий атеросклероз (*ASO*) (не бралися в дослідження облітеруючий тромбоангіїт – *TAO* – та хвороба Бюргера). Перше клінічне дослідження, яке повідомляло про ефективність введення аутологічних *BM-MNC* як клітинної терапії при ХКІНК, було опубліковано у 2002 році [142]. У дослідженні *Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT)* було проведено пілотне дослідження спочатку з 25 пацієнтами, а потім рандомізоване контрольоване дослідження, у якому 22 пацієнтам

з двосторонньою ішемією ніг вводили *BM-MNCs* в одну ногу та *PB-MNCs* в іншу, як елементи керування. Їх результати вказують на значне покращення кісточно-плечового індексу (*ABI*), чезрешкірного тиску кисню ($TcPO_2$) і тривалості ходьби без болю протягом 24 тижнів із покращенням стану кінцівок у 39 із 45 пацієнтів [142]. Таблиця 3 містить далеко не повний перелік клінічних досліджень, які вже завершені та результати яких опубліковані за останні десятиліття, передбачаючи використання різних типів клітин, їх доз та шляхів уведення, із залученням мінімум 10 пацієнтів. Через величезний інтерес до цієї галузі кількість поточних клінічних випробувань із застосуванням клітинної терапії при ХКІНК постійно зростає, включаючи такі приклади, як дослідження фази III *PACE* (клітини *PLX-PAD*, *NCT03006770*) [143] або дослідження фази III *Rexmyelocel-T* (*REX-001*); розчин, збагачений *MNCs*, отриманими з *BM* людини (*NCT03174522* і *NCT03111238*) у хворих на стадії *Rutherford V* (табл. 3). Деякі з цих досліджень є активними та рекрутинговими, тому їхні результати поки що недоступні. Вітчизняна література представлена поодинокими дослідженнями [127–129]. Додаткову інформацію щодо таких та інших досліджень можна знайти за адресою www.clinicaltrials.gov (дата доступу: 14 грудня 2020 р.).

Одним із основних результатів, які спостерігаються в клінічних дослідженнях, є покращення гемодинаміки, представлене як абсолютне збільшення КПІ >10. Подібним чином інші дослідники повідомили про покращене кровопостачання при введенні *BM-MNCs*, *PB-MNCs* або *MSCs* [71, 74, 75, 76, 79, 81, 84, 87]. Гупта та ін. оцінювали вплив алогенних *MSC* у пацієнтів (ступінь 4–6 за класифікацією ступеня ішемії кінцівки Резерфорда), які страждали на ХКІНК внаслідок атеросклерозу і тромбангіїту. Це дослідження підтвердило значне збільшення КПІ ($p = 0,0018$) після 6 місяців лікування *MSC* ($n=10$) порівняно з пацієнтами, яким трансплантували плацебо ($n=10$), хоча позитивних значущих змін не спостерігалось щодо: болю в спокої, загоєння виразки або показників частоти ампутацій. Деякі автори дискутують щодо вибору КПІ як

Таблиця 3. Перелік найважливіших клінічних досліджень щодо клітинної терапії

Автор (рік)	Посилання	Тип терапії (клітини)	Тип вивчення	Причина PAD / ХКІНК	Стадія захворювання	Кількість пацієнтів (Т/С)	Контроль	Доза (x10 ⁶ клітин)	Шлях введення	Термін дослідження (місяців)	Оцінка результатів
Walter (2011) PROVASA	69	BM-MNCs	RCT	ASO& TAO	Фонтейн III-IV	40 (19/21)	Плацебо	153	IA	3	ABI, AR, DR, RPS, TcPO ₂ UH
Matoba (2008)	70	BM-MNCs	NC	ASO& TAO	Фонтейн III-IV	115	N/A	N/A	IM	25,3	ABI, APS, DR, PFWD, RPS, TcPO ₂ UH
Amann (2009) BONMONT-1	71	BM-MNCs BM-TNCs	NC	N/A	Резерфорд 4-6	12 39	N/A	1100 3000	IM	13,5	ABI, AFS, PFWD, TcPO ₂
Guo (2018)	72	BM-MNCs	NR	TAO	N/A	59 (40/19)	Пустий	3500	IM	129,5	ABI, AFS, AR, RPS, TcPO ₂ UH
Ruiz-Salmeron (2011)	73	BM-MNCs	NC	ASO та інші	Резерфорд 4-6	20	N/A	100-400	IA	12	ABI, AR, DR, TcPO ₂
Huang (2005)	74	PB-MNCs ¹	RCT	ASO	Фонтейн III-IV	28 (14/14)	Пустий	3000	IM	3	ABI, AR, DR, PFWD RPS, UH

Автор (рік)	Посилання	Тип терапії (клітинні)	Тип вивчення	Причина РАД / ХКІНК	Стадія захворювання	Кількість пацієнтів (Т/С)	Контроль	Доза (x10 ⁶ клітин)	Шлях введення	Термін дослідження (місяців)	Оцінка результатів
Mohammadzadeh (2013)	75	PB-MNCs ¹	RCT	N/A	Фонтейн III-IV	21 (7/14)	Пустий	900–1200	IM	3	ABI, AR, UH, PFWD
Ozturk (2012)	76	PB-MNCs ¹	RCT	N/A	Фонтейн III-IV	40 (20/20)	Пустий	24,8/мл (CD34+)	IM	3	ABI, AR, PFWD, RPS, TCPO ₂ , UH
Dubsky (2013)	77	PB-MNCs BM-MNCs	NR	N/A	Резервфорд 4-6	33 (11/22) 39 (17/22)	Пустий	10400 1800	IM	6	AR, TCPO ₂ , UH
Tateishi-Yuyama (2002) TACT	78	BM-MNCs BM-MNCs	NR	ASO	Фонтейн III-IV	252	Пустий	700–2700	IM	6	ABI, TCPO ₂ , RPS
Arai (2006)	79	BM-MNCs	RCT	N/A	Фонтейн III-IV	26 (13/13)	Пустий	1000–3000	IM	1	ABI, TCPO ₂ , RPS
Huang (2007)	80	PB-MNCs BM-MNCs	NC	ASO	N/A	76 74	N/A	7200 580	IM	3	ABI, AR, PFWD, RPS, TCPO ₂ , UH

Автор (рік)	Посилання	Тип терапії (клітинні)	Тип вивчення	Причина РАР / ХКІНК	Стадія захворювання	Кількість пацієнтів (Т / С)	Контроль	Доза (x10 ⁶ клітин)	Шлях введення	Термін дослідження (місяців)	Оцінка результатів
Li (2013)	81	VM-MNCs	RCT	ASO	Фонтейн III-IV	58 (29/29)	Плацебо	10/мл	IM	6	ABI, AFS, AR, DR, RPS, UH
Teraa (2015) JUVENTAS	82	VM-MNCs	RCT	ASO	Фонтейн III-IV	160 (81/79)	Плацебо	500	IA	6	ABI, AR, DR, TcPO ₂ , UH
Pignon (2017) BALI	83	VM-MNCs	RCT	ASO	Резерфорд 4-5	36 (17/19)	Плацебо	1300	IM	12	ABI, AR, RPS, TcPO ₂ , UH
Lu (2011)	84	VM-MNCs VM-MSCs	RCT	ASO	Фонтейн IV	212 202	Пустий	930 960	IM	6	ABI, AR, PFWT, RPS, TcPO ₂ , UH
Dash (2009)	85	VM-MSCs	RCT	ASO Бюргер	N/A	6 (3/3) 18 (9/9)	Пустий	N/A	IM	3	PFWD, UH
Gupta (2013)	86	VM-MSCs (алогенний)	RCT	ASO&TAO	Резерфорд 4-6	20 (10/10)	Плацебо	200	IM	6	ABI, AR, RPS, UH
Szabò (2013)	87	Ves-Cell	RCT NC	N/A	Фонтейн III-IV	20 (10/10)	Пустий	66.4	IM	3 22.6	ABI, AR, DR, PFWD, RPS, TcPO ₂ , UH ABI, AFS, AR, DR, PFWD, RPS, TcPO ₂ , UH

Автор (рік)	Поси- лання	Тип терапії (кліти- ни)	Тип ви- вчення	Причина РАД / ХКІНК	Стадія захво- рювання	Кількість пацієнтів (Т / С)	Кон- троль	Доза ($\times 10^6$ клітин)	Шлях вве- дення	Термін дослі- дження (міся- ців)	Оцінка результатів
Raval (2014) SCRIPT-CLI	88	CD133+ ¹	RCT	ASO	N/A	10 (3/7)	Плаце- бо	50-400	IM	12	AFS, AR, DR
Lara-Heman- dez (2010)	89	EPCs ¹	NC	ASO & TAO	Фонтейн III-IV	28	N/A	N/A	IM	14,7	ABI, RPS, UH
Kinoshita (2012)	90	CD34+ ¹	NC	ASO & Buerger	Резер- форд 4-5	17	N/A	0,1/к2 (LD) 0,5/к2 (MD) 1/к2 (HD) 0,1/к2 (LD)	IM	12	AR, DR, PFWD, RPS, TcPO ₂ , UH
Dong (2013)	91	CD34+ ¹	NC	ASO, TAO та інші	Резер- форд 4-5	25	N/A	0,1/к2 (LD) 0,5/к2 (MD) 1/к2 (HD)	IM	6	ABI, AR, DR, PFWT, RPS TcPO ₂ , UH
Fujita (2014)	92	CD34+ ¹	NC	ASO & Buerger	Резер- форд 4-5	11	N/A	1/к2	IM	12	AR, PFWD, RPS, TcPO ₂
Powell (2012) RESTORE-CLI	93	Ісмієло- цел-Т	RCT	N/A	N/A	72 (48/24)	Плаце- бо	35-295	IM	12	AFS, AR, DR

Автор (рік)	Поси- лання	Тип терапії (кліти- ни)	Тип ви- вчення	Причина РАД/ ХКІНК	Стадія захво- рювання	Кількість пацієнтів (Т/С)	Кон- троль	Доза ($\times 10^6$ клітин)	Шлях вве- дення	Термін дослі- дження (міся- ців)	Оцінка результатів
Losordo (2015)	94	CD34+ ¹	RCT	N/A	Резер- форд 4–5	28 (16/12)	Плаце- бо	0,1/кє (LD) 1/кє (HD)	IM	12	ABI, AR, DR, PFWD, UH
Liotta (2018)	95	BM-MSCs	R	N/A	Резер- форд 4–6	17	Пустий	50	IM	12	ABI, PFWD, RPS, TcPO ₂ , UH
Fang (2020)	96	PB- MNCs ¹	RCT	TAO	Резер- форд 4–5	23		250			ABI, AFS, PFWT, RPS, TcPO ₂
Sharma (2021)	97	BM-MSCs	RCT	ASO та інші	Фонтейн ІІС-ІV	81 (41/40)	Плаце- бо	71,51	IA	6	ABI, AR, PFWD, RPS, TcPO ₂ , UH

Скорочення: ABI – кістково-плечовий індекс; AFS – виживання без ампутації; AR – швидкість ампутації; ASO – обліте-
руючий атеросклероз; DR – смертність; ECEPC – збагачені циркулюючі ендотеліальні клітини-попередники; HD – висока
доза; LD – низька доза; MD – середня доза; NC – неконтрольований; NR – нерандомізований; PFWD – відстань без болю;
РКД – рандомізоване контрольоване дослідження; RPS – оцінка болю у спокої; TAO – облітеруючий тромбангіт;
TcPO₂ – червезшкірний тиск кисню; UH – застоєнна виразка.

Примітки: 1. Клітини, мобілізовані G-CSF; 2. Іншу кінцівку використовували як контрольну ін'єкцію сольової сироватки.
3. Кожна кінцівка була рандомізована для RB-MNCs/BM-MNCs; 4. Використовувався той самий контроль; 5. Ретроспектива.

Таблиця містить матеріали: Lucía Beltrán-Camacho et al: *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2335 (<https://www.mdpi.com/journal/ijms>). *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2335 11–13 of 27

У таблиці вказано: ім'я першого автора та рік публікації, номер посилання, тип клітинної терапії, тип дослідження, пов'язану причину ЗПА/ІЛК, стадію захворювання, кількість пацієнтів (Т = Ліковані / С = Контрольні групи), використані контролю, кількість введених клітин, шлях уведення, подальше спостереження та параметри перевірено для оцінки результату клітинної терапії. Параметри, що фіксують загальне поліпшення порівняно з базовими рівнями/контролями, виділено (**жирним шрифтом**).

первинної кінцевої точки, оскільки цей параметр деякими авторами не вважається корисним предиктором для оцінки довгострокової ефективності ангіогенної терапії з використанням клітин кісткового мозку [69, 78].

За іншими, достовірнішими даними, клітинна терапія сприяла полегшенню симптомів і, отже, покращенню якості життя цих пацієнтів [92, 94]. Таким чином, покращення болю у стані спокою визначається як > 50% зниження балів болю, оцінених за допомогою візуальної аналогової шкали (VAS) у різні моменти часу. У нерандомізованому дослідженні пацієнти з *CLI-TAO* ($n = 40$) отримували аутологічні *BM-MNCs*, і після середнього періоду спостереження протягом 129 місяців було помічено значне покращення VAS ($p = 0,0001$), а також і в інших первинних кінцевих точках (виживання без ампутації, статус виразки, ABI, пальцево-плечовий індекс та $TcPO_2$) [72]. $TcPO_2$ як показник вимірювання гемодинаміки використовувався в кількох інших клінічних дослідженнях (як вторинна кінцева точка): підвищення тиску кисню спостерігалось у випадках з використанням *PB-MNC*, *BM-MNC*, *MSC*, а також попередників ангіогенних клітин периферичної крові (Ves-клітини) [69, 71, 72, 76, 77, 78, 79, 84, 87].

Крім того, ізольовані клітини CD34+ або CD133+ також були протестовані в дослідженнях на предмет ХКІНК. У рандомізованому односліпому дослідженні за ефективністю терапії пацієнтів розділили 1 : 1 на тих, хто отримував або *PB-MNC* та/або очищені клітини CD34+.

Хоча кількість пацієнтів, включених у це дослідження, була невеликою, було отримано подібні результати щодо збереження кінцівок та покращення якості життя. Але не було виявлено суттєвих відмінностей між обома методами лікування щодо виживання без ампутації. З іншого боку, група *CD34+* досягла швидшого полегшення болю та загалом ранішого полегшення ішемії, ніж група *PB-MNCs* [166]. У дослідженні *Stem Cell Revascularization for Patients with Critical Limb Ischemia (SCRIPT-CLI)* суб'єктів із ХКІНК через атеросклероз розділили на дві групи у співвідношенні 2:1, які отримували активне лікування *G-CSF* протягом 5 днів перед лейкоферезом і *CD133+* ін'єкцію в обидві ноги, а група плацебо отримувала ін'єкції фізіологічного розчину плюс фіктивний лейкоферез і плацебо — буферний розчин замість клітин. Безпека процедури була доведена через 12 місяців після лікування, тоді як у кількох пацієнтів було виявлено слабку мобілізацію клітин *CD133+* разом із вищою частотою старіння клітин *CD133+*. Ці результати відображали необхідність досліджень з більшою кількістю пацієнтів. Тим не менш, ці автори припустили, що цей терапевтичний підхід може бути не зовсім успішним для відібраних пацієнтів [88].

Нарешті, іншим типом клітин, які набувають популярності як потенційне лікування пацієнтів на ХКІНК, є *ASC*, *SVF* або дуже маленькі ембріоноподібні стовбурові клітини (*VSEL*).

2.5. Обмеження в клітинних клінічних випробуваннях

Незважаючи на багатообіцяючі результати, отримані від використання стовбурових клітин у пацієнтів на ХКІНК, варіабельність і гетерогенність, виявлені в ході клінічних випробувань, є високими. Примітно, що після 20 років використання терапії стовбуровими клітинами при ХКІНК залишається незрозумілим, який тип клітин або джерело клітин викликає найбільші переваги

з точки зору відновлення перфузії крові кінцівки або полегшення симптомів ішемії. Перші випробування були зосереджені на використанні гетерогенних клітинних препаратів з кісткового мозку або периферичної крові. Такі неочищені клітинні суміші часто містять значно нижчу частку "активних" клітин або клітин із документально підтвердженими проангіогенними функціями [74, 78]. З іншого боку, велика кількість клітин необхідна під час клітинної терапії, але проангіогенні клітини-попередники не присутні у великих пропорціях у людей, що є необхідним для розробки оптимізованих і клінічно застосовних методів розширення культури для майбутніх перспектив лікування. Клітини можуть бути ефективно відібрані за їхньою експресією *CD34*, *CD133* або також за їхньою активністю *ALDH*, хоча цей підхід також має негативні сторони, оскільки вважається, що розширена культура негативно впливає на регенеративну функцію клітин. Проте оптимізація цих культур може вирішити проблему, пов'язану з дисфункцією EPC або MSC у пацієнтів на ХКІНК, а також посилити ангіогенний потенціал клітин шляхом попередньої стимуляції перед трансплантацією. У цьому сенсі наступне питання полягає в тому, чи використовувати для цих пацієнтів аутологічну чи алогенну стратегію. Аутологічне введення дозволяє уникнути проблем, пов'язаних з відторгненням, але також має кілька недоліків, таких як труднощі з забором і вирощуванням значної кількості клітин, і, крім того, вже згадана клітинна дисфункція у відповідь на атеросклероз та/або пов'язані супутні захворювання.

Іншим питанням невідповідності є доза клітин, яку слід застосувати залежно від типу/джерела клітин, оскільки кількість МНК і очищених клітин з МНК завжди різниться між пацієнтами і може залежати від самої хвороби. На жаль, деякі дослідження навіть не надали такої інформації [70]. Так само шлях адміністрування ще не досяг консенсусу. У більшості досліджень було обрано внутрішньом'язову доставку клітин, вважаючи це більш здійсненною та менш інвазивною стратегією [81, 84]. Інші автори припускають, що внутрішньоартеріальне введення краще розподілятиме клі-

тини в ділянки з достатньою кількістю кисню для продовження проангіогенної функції, намагаючись уникнути тимчасового приживлення та інтеграції клітин після внутрішньом'язової ін'єкції [69, 46, 82]. У зв'язку з цим кілька досліджень порівнювали як внутрішньом'язові, так і внутрішньоартеріальні стратегії, показуючи подібні результати з точки зору клінічного результату.

Загалом, порівняння результатів, отриманих під час різних випробувань, становить важке завдання, у якому метааналіз стає все кориснішим для підтримки доказової медицини, що дозволяє узагальнити накопичені докази, а також стимулювати майбутні дослідження. Метааналіз, виконаний *Rigato et al.*, включає надійний статистичний аналіз рандомізованих, контрольованих і неконтрольованих досліджень. Їхні результати показали, що у пацієнтів, які не підлягають хірургічній ревазуляризації, терапія аутологічними клітинами має потенціал для зниження ризику великої ампутації на 36%, покращуючи ймовірність загоєння рани на 59%. Більше того, видається, що він покращує кілька сурогатних кінцевих точок перфузії кінцівок, болю та функціональної здатності. Подібним чином *Gao et al.* проаналізували результати понад тисячі пацієнтів, які брали участь у рандомізованих контрольованих дослідженнях, вказуючи на те, що імплантація клітин покращила швидкість загоєння виразки, КПІ, $TcPO_2$ відстань без болю, а також зменшила частоту ампутацій і біль у стані спокою порівняно зі стандартним доглядом/традиційним лікуванням. Зовсім нещодавно в огляді, що включає 11 метааналізів, оцінено поточні докази клітинної терапії при ЗПА. Таке дослідження підтверджує ефективність використання клітинної терапії для пацієнтів на ХКІНК, що сприяє зменшенню кількості великих ампутацій і покращенню загоєння ран. Крім того, для вторинних результатів, таких як КПІ, $TcPO_2$ та *RPS*, спостерігається загальне покращення. Незважаючи на це, для підвищення статистичної значущості потрібні масштабніші дослідження, а також дизайн плацебо-контрольованих досліджень, оскільки відмінності клінічних результатів нечіткі порівняно з ефектом плацебо.

Розбіжності, виявлені між клінічними випробуваннями, вказують на те, що потрібно провести ще багато роботи, щоб досягти консенсусу щодо оптимального лікування. Це, у свою чергу, також вимагає кращого розуміння того, як працюють клітини, щоб реалізувати їхнє використання в клінічній практиці. Тим не менш, ці дослідження поділяють загальний висновок: у половини пацієнтів з діагнозом ХКІНК без можливості хірургічної ревазуляризації є доцільним використання клітинної терапії з високим компонентом безпеки [73, 98].

2.6. Секретоми (кондиціоновані середовища)

Завдяки зростанню кількості досліджень, які підтверджують, що регенеративна здатність стовбурових клітин здебільшого зумовлена їхньою паракринною дією на ішемізовані тканини, використання вивільнених факторів (секретом) без клітин (так звані екзосоми) як альтернатива клітинній терапії, в даний час досліджується. У різних дослідженнях секретоми також називають кондиціонованим середовищем (КМ), маючи на увазі фактори, що виділяються в середовище, де культивуються клітини. Модулюючий ефект цих секретомів може залежати від присутності різних факторів росту, ангіогенних факторів, гормонів, цитокінів, білків і протеаз позаклітинного матриксу, гормонів, ліпідних медіаторів і генетичного матеріалу, що виділяється зі стовбурових клітин або клітин-попередників для клітинної комунікації, втручаючись у різні біологічні функції, такі як ріст, поділ, диференціація, апоптоз і сигналізація. Секретом стовбурових клітин показав великий потенціал і може опосередковувати внутрішньоклітинні шляхи у пошкоджених клітинах або активувати секрецію суміжних тканин.

Секретоми, отримані з різних клітин-попередників або стовбурових клітин, вивчаються, особливо завдяки підходам мас-спектрометрії. Таким чином *Barberg et al.* проаналізували склад секретому МСК, визначивши білки, пов'язані з ростом

клітин, трансдукцією сигналу та клітинною комунікацією, а також цитокіни та фактори росту, що беруть участь у фізіологічній регуляції кровотворення. Так само *Maffioli et al.* описано, що в прозапальному середовищі МСК збільшують секрецію білків, пов'язаних з імунomodуляцією та ангиогенезом. Хоча секретони МСК є найбільш вивченими, секретони інших стовбурових клітин /клітин-попередників також демонструють багатообіцяючі результати. Зовсім нещодавно було проаналізовано за допомогою протеомного підходу секретони *CAC*, виявивши значну кількість ангиогенних факторів, і, крім того, продемонстровано, що інкубація *ex vivo ECFC* із цим секретомом посилює ангиогенез *ECFC*, що узгоджується з попередніми дослідженнями [36]. Крім того, секретом *ASCs* містить численні ангиогенні фактори, які, як видається, сприяють, серед іншого, і виживанню, проліферації та міграції *ECs*, а також васкулогенезу. Дійсно, було показано, що кондиціоноване середовище *ASC* посилює проліферацію та виживання ендотеліальних клітин *in vitro*. Деякі з цих секретонів вже були протестовані як терапія *in vivo*, що показало обнадійливі результати, оскільки вони такі ж ефективні, як клітинна терапія. Повне розуміння активності секретонів та їхніх факторів дозволило б нам штучно відтворити їх за допомогою біоактивних молекул для використання в регенеративній медицині. Нарешті, введення секретонів як альтернативного підходу до клітинної терапії дозволяє наблизитись до вирішення таких проблем, як імунне відторгнення або канцерогенез. У даний час оцінюються нові стратегії, такі як підходи до звільнення секретонів для посилення їх ангиогенних властивостей.

Наприклад, *Felice et al.* використовували наночастинки для досягнення контрольованого секретону *EPCs*, демонструючи потенціал цієї системи на моделях щурів *FAL*. Подібним чином позаклітинні везикули, отримані зі стовбурових клітин або клітин-попередників, також звані "екзосомами", теж беруть участь у регенераційній ролі клітинних секретонів. Екзосоми, отримані з МСК, здається, сприяють регенерації кісток і ангиогенезу. Таким

же чином було показано, що екзосоми, отримані з клітин *CD34+*, беруть участь в ангіогенезі та є важливими для властивостей сполучення, присвоєних цим клітинам.

Нарешті, ці мікро-РНК нещодавно визначились як багатообіцяюча альтернативна терапія проти ішемічних захворювань. Мікро-РНК, короткі некодуєчі РНК, які інгібують трансляцію мессенджерних РНК, можуть регулювати всю мережу або шлях одночасно; крім того, у відповідь на ішемію вони беруть участь у регуляції ангіогенезу та артеріогенезу.

Різні стратегії проти ЗПА базуються на модуляції факторів, пов'язаних із розвитком судинної системи. Однак модифікації одного фактора, здається, недостатні для лікування цього захворювання, і тому розробка терапевтичних стратегій на основі мікро-РНК є дуже перспективною, оскільки цей підхід дозволить регулювати кілька шляхів одночасно. Одними з найбільш вивчених мікро-РНК у хворих на ХКІНК є *miR-494*, *miR-487b*, *miR-329* і *miR-495*. Таким чином, інгібування деяких із цих молекул, описаних як антиангіогенні мікро-РНК, як видається, сприяє відновленню кровотоку у мишей, хворих на ХКІНК. Деякі дослідження показують, що мікро-РНК можуть бути передані стовбуровими клітинами або клітинами-попередниками через екзосоми до ЕС, сприяючи ангіогенезу в цих формах.

Хоча мікро-РНК є найвідомішими та найбільш вивченими некодуєчими молекулами РНК щодо їхнього терапевтичного потенціалу, існують інші споріднені типи РНК, такі як кільцева або довга РНК.

2.7. Мезенхімальні стовбурові / прогеніторні клітини, що походять з жиру

Останні дослідження показали, що підшкірна жирова тканина містить стовбурові клітини/клітини-попередники, які можуть давати ростки до кількох клітин мезенхімального ряду. Крім того,

ці мезенхімальні клітини-попередники вивільняють різноманітні ангіогенні фактори росту, включаючи фактор росту ендотелію судин, фактор росту фібробластів, фактор росту гепатоцитів і фактор-1, отриманий зі стромальних клітин хемокіну. Ці біологічні властивості регенеративних клітин жирового походження (*ADRC*) вказують на те, що аутологічна підшкірна жирова тканина може бути корисним джерелом клітин для терапевтичного ангіогенезу у людей. Примітним є і те, що підшкірну жирову тканину можна зібрати мініінвазивною технікою. Тому одним із привабливих джерел виділення клітин для терапевтичного ангіогенезу була б аутологічна підшкірна жирова тканина з майбутніми перспективами *ADRC*-опосередкованого терапевтичного ангіогенезу [99–110]. Жирова тканина в основному складається з двох класів клітин. Один — це зрілі адипоцити (*MA*), які утворюють великий об'єм жирової тканини, а інший — стромальні клітини, які називаються *SVF*. Дослідженням *Zuk P. A. та ін.* було вивчено багатолінійні клітини з жирової тканини людини, які показали, що *SVF* містить мультипотент мезенхімальних стовбурових клітин/клітин-попередників, які у свою чергу можуть диференціюватися в клітини різних ліній, включаючи адипоцити, фібробласти, міоцити, перицити, остеобласти, хондроцити тощо [99, 100]. Нещодавно *Miyazaki T. і співавтори* після виділення двох популяцій фібробластичних клітин людини з множинним, але чітким потенціалом мезенхімальної диференціації показали, що жирова тканина містить мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини, які називаються стовбуровими клітинами/клітинами-попередниками жирової тканини (*ASC* або *ADSC*) або *ADRC*, які мають здатність регенерувати різні пошкоджені тканини. *ADRC* можна виділити навіть з невеликої кількості підшкірної жирової тканини людини та розширити культурально [100]. Аутологічні *ADRC* можуть бути ізольовані за допомогою мінімально інвазивних методів, таких як локальний метод ліпосакції, навіть у пацієнтів з ХКІНК. *ADRC* можуть бути ізольовані жировою тканиною та безпосередньо імплантовані у власні ішемічні скелетні м'язи па-

цієнта. Імплантовані *ADRC* вивільняють ангіогенні речовини, цитокіни/хемокіни, позаклітинні мікровезикули, включаючи мікро-РНК, які стимулюють місцеву ангіогенну відповідь. Частина *ADRC* диференціюються в перицити і підтримують ангіогенез.

2.8. Концентрат аспірації кісткового мозку (ВМАС)

Головною пересторогою щодо аспірації кісткового мозку для клітинної терапії при ХКІНК є анемічні явища у пацієнтів, хоча, за даними літератури, частота анемії внаслідок відбору кісткового мозку після відділення клітинного концентрату становить лише від 0,6% до 0,8%. *Frantisek Jaluvka et al.* детально вивчили цю проблему [123]. Потенційні ризики, пов'язані з застосуванням клітинної терапії, включають також прогресування ниркової недостатності, діабетичну ретинопатію, ризик ССЗ і можливе потенціювання або прискорення раку. Інфекційні ризики також нівелюються, адже аспірат кісткового мозку походить із власного організму пацієнта і ризик перенесення інфекційних захворювань (ВІЛ, гепатит С та ін.) чи побічних імунологічних реакцій абсолютно відсутній. Клітинний концентрат вводиться глибоко у внутрішньом'язовий простір, по передбачуваному ходу гомілкових артерій, і можна припустити, що таке введення у пошкоджену ішемією м'язову тканину може призвести до локального рабдоміолізу та погіршення хронічної ниркової недостатності. Однак опубліковані дослідження не підтвердили жодної ниркової недостатності у зв'язку з клітинною терапією [117].

Ендотеліальні клітини-попередники беруть участь у регенеративних процесах; однак вони не викликають патологічного васкулогенезу капілярів сітківки, який міг би погіршити ретинопатію [118]. У наведених вище метааналізах не було повідомлено про статистично значущу різницю в частоті виникаючих серцево-судинних захворювань.

Не виявлено зв'язку між застосуванням клітинної терапії та підвищеним ризиком захворюваності на рак [119–122], хоча у більшості досліджень злоякісні новоутворення в анамнезі вважалися протипоказанням для застосування клітинної терапії. Такі перестороги виходили з концепції, що деякі пухлини експресують хемотаксичні сигнали для мобілізації моноклональних клітин з кісткового мозку, і у випадку цих клітин була підозра, що вони можуть якимось чином брати участь у патологічній васкуляризації пухлин [119, 120]. Але, за даними *D. Gao*, простої наявності стовбурових клітин і пухлини недостатньо для ініціації процесу патологічного ангиогенезу [52, 121]. *A. Wickersheim та ін.* також продемонстрували на тваринній моделі, що ендотеліальні попередники, отримані з кісткового мозку, відсутні в пухлинному ендотелії первинних або вторинних метастатичних пухлин [122].

Розділ 3

Організація надання медичної допомоги у лікуванні мезенхімальними стовбуровими клітинами

3.1. Місце оптимізації дозування мезенхімальних стовбурових клітин у “Життєвому циклі медико-технологічних документів”

Для моделювання процесів внесення змін щодо оптимізації дозування МСК у локальні нормативні документи ЗОЗ використана схема “Життєвого циклу медико-технологічних документів”, затверджена чинним Наказом МОЗ України від 28.09.2012 №751 “Про створення та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги в системі Міністерства охорони здоров’я України”.

Впровадження медико-технологічних документів може здійснюватись шляхом розробки клінічних маршрутів пацієнтів у ЗОЗ із врахуванням кросфункціональних відносин та залучення інших ЗОЗ чи організацій, що виконують суміжні чи допоміжні функції.

На рисунку 1 представлено життєвий цикл медико-технологічних документів з визначенням у ньому місця впровадження “4. Впровадження”.

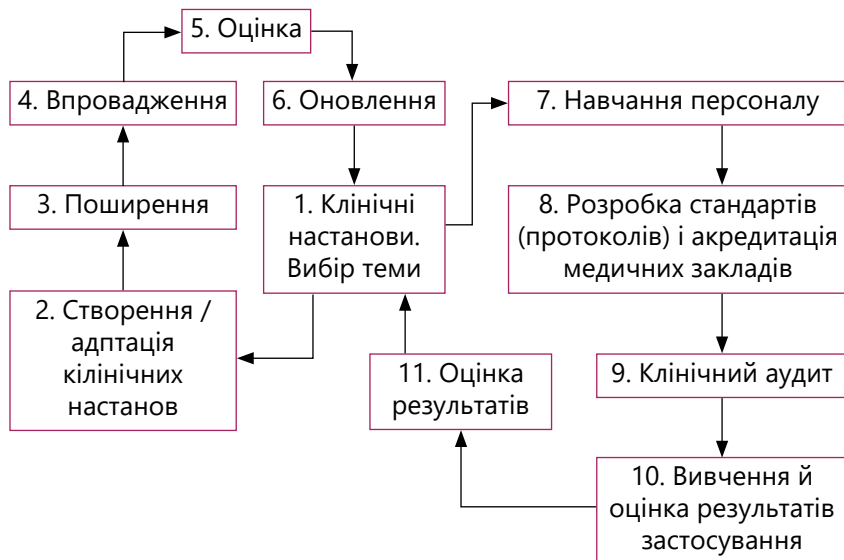


Рис. 1. Життєвий цикл медико-технологічних документів

Подальші зміни у принципах використання та дозуванні МСК, що ґрунтуються на кращій практиці чи появі нових результатів наукових чи клінічних досліджень високого ступеня доказовості, можуть використовуватися після проходження етапів “5. Оцінка”, чи “9. Клінічний аудит”, чи “10. Вивчення і оцінка результатів застосування”, чи “11. Оцінка результатів” безпосередньо на етапі “6. Оновлення”.

Слід зазначити, що відповідно до статті 44 Закону України “Основи законодавства України про охорону здоров’я” “Нові методи профілактики, діагностики, лікування та лікарські засоби, що знаходяться на розгляді в установленому порядку, але ще не допущені до використання, та незареєстровані лікарські засоби можуть використовуватися в інтересах вилікування особи лише після отримання її письмової згоди.”

3.2. Проектування клінічного маршруту пацієнта

У цьому розділі на рисунку 2 наведено схему проектування клінічного маршруту пацієнта з урахуванням кросфункціональних стосунків з установою, що здійснює функції БТЛ. Також наведено приклад деталізації завдань та перелік лабораторних досліджень при наданні медичної допомоги з використанням МСК. Зазначені завдання можливо трансформувати у функціональні обов'язки при розробці посадових інструкцій задіяних медичних працівників.



Рис. 2. Проектування клінічного маршруту пацієнта

A. Запис пацієнта на прийом:

- працівник реєстратури з'ясовує основну причину звернення пацієнта;
- здійснює підбір спеціаліста для первинної консультації;
- визначає зручні дату і час для лікаря і пацієнта;
- здійснює запис пацієнта на первинну консультацію.

B. Первинна консультація

Первинна консультація пацієнта включає в себе:

- збір анамнезу;
- ознайомлення з наявною медичною документацією пацієнта;
- фізикальне обстеження;
- інструментальне обстеження (визначення температури тіла, АТ, ЧСС, сатурації тощо);
- встановлення попереднього діагнозу;
- направлення пацієнта на додаткові лабораторні та інструментальні дослідження;
- направлення на обстеження до суміжних спеціалістів (за потреби).

V. Додаткові лабораторні та інструментальні дослідження

Рекомендований перелік досліджень:

- швидкі тести: анти *HCV*, *HBsAg*, *Anti HBsAg*, *Anti HBeAg*, *Anti HBcAg*;
- ПЛР: антитіл до корового антигену вірусу гепатиту *B* (*IgM* та *IgG*), сумарних антитіл до вірусу гепатиту *C*, сумарних антитіл до *Treponema pallidum*, ДНК *HIV1/2*, ДНК *HBV*, РНК *HCV*;
- загальний аналіз крові;
- глюкоза крові;
- загальний аналіз сечі;
- біохімічний аналіз крові: білок, альбумін, С-реактивний білок, загальний білірубін, прямий білірубін, непрямий білірубін, АлАТ, АсАТ, лужна фосфатаза, ГГТ, сечовина, креатинін, сечова кислота;

- онкомаркери: альфа-фетопротеїн, канцер-ембріональний антиген, простатспецифічний антиген загальний, вільний, онкомаркер раку яєчників, молочних залоз, підшлункової залози;
- коагулограма: АЧТЧ, протромбіновий час, протромбіновий індекс Квіка, МНВ, тромбіновий час, фібриноген;
- УЗД органів черевної порожнини, малого таза, щитоподібної залози, молочних залоз у жінок;
- інші спеціальні дослідження.

1. Для визначення інтенсивності больового синдрому слід використовувати візуально-аналогову шкалу інтенсивності болю, на якій пацієнт суб'єктивно відзначає вираженість больового синдрому. Шкала являє собою градуйовану лінійку завдовжки 100 мм, мінімальною є відсутність болю, максимальною — найсильніший біль з можливих, де:

1–3 = легкий біль; мінімальний вплив на повсякденну діяльність;

4–6 = помірний біль; помірний вплив на повсякденну діяльність;

7–10 = сильний біль; великий вплив на повсякденну діяльність.

2. Визначення площі поверхні трофічної виразки слід проводити всім хворим за допомогою цифрового фотоапарата, обладнаного міліметр-градуйованою виносною рамкою фіксованої довжини (в режимі макрозйомки фотографується уражена частина шкіри). Спосіб характеризується доволі швидким виконанням, на отримання зображення витрачається приблизно 15–20 секунд, на обробку та обчислення цифрового фотознімка в програмі "ImageJ" не більше двох хвилин. Практично спосіб є безконтактним і виконується таким чином: положення пацієнта — довільне. Вимірювальну частину міліметр-градуйованої виносної рамки, фіксованої до фотоапарата двома металевими стержнями на постійній відстані від об'єктива та в паралельній йому площині, прикладають під прямим кутом до здорової шкіри поряд з дефектом шкіри, проводять фотозйомку. За допомогою програми "ImageJ" на отриманих фотознімках задають

референтні значення відстані, відповідно до поділок вимірювальної частини виносної рамки, та окреслюють площу ураження. Автоматично проводять розрахунки площі поверхні дефекту шкіри. Таким чином отримують точні дані.

3. Для неінвазивного визначення об'єму виразки використовується спосіб, що виконується шляхом фотографування її під різними кутами та обробки отриманих даних за допомогою алгоритму *Structure from motion (SFM)* з подальшою тривимірною реконструкцією та подальшим вимірюванням об'єму. В результаті отриману тривимірну модель поверхні виразки калібрують на основі калібрувальної лінійки, відновлюючи реальні розміри; край рани обводиться сплайном; отриманий сплайн конвертується в поверхню і об'єднується із задалегідь відсегментованою поверхнею виразки.
4. Визначення окружності нижніх кінцівок та об'єму гомілок.
5. УЗДГ артерій нижніх кінцівок.
6. МСКТ-ангіографія з контрастуванням (за показаннями).
7. Безконтрастна магнітно-резонансна флебографія (за показаннями).
8. Цифрова субтракційна ангіографія нижніх кінцівок (за показаннями).

Г. Повторна консультація. Прийняття рішення щодо подальшої тактики лікування

Під час повторної консультації лікар приймає остаточне рішення щодо можливості чи неможливості використання клітинної терапії мезенхімальними стовбуровими клітинами у конкретного пацієнта, ґрунтуючись на даних фізикального обстеження, лабораторних та інструментальних досліджень.

Протипоказання до терапії мезенхімальними стовбуровими клітинами:

- активний онкологічний процес, історія лікування онкологічного захворювання протягом останніх 5 років, передраковий стан;
- вагітність та грудне вигодовування;
- нестабільний психічний стан;
- пацієнти з клінічними проявами гострого респіраторного захворювання;

- пацієнти з клінічними проявами порушення згортання крові.

У випадку наявних протипоказань необхідно відмовитись від терапії МСК.

Якщо протипоказання відсутні, лікар обирає тактику лікування відповідно до нозології та подає заявку на нарощування лікувальної дози МСК до Банку пуповинної крові.

Якщо планується застосування аутологічних стовбурових клітин, лікар здійснює забір біоматеріалу від пацієнта (кістковий мозок або жирова тканина) і передає його до БТЛ Банку пуповинної крові для нарощування терапевтичної дози МСК.

Перед забором біоматеріалу необхідно отримати від пацієнта "Інформовану добровільну згоду пацієнта на проведення діагностики, лікування і на проведення операції й знеболення" (форма №003-6/о).

Д. Процедура клітинної терапії

Медикаментозна підготовка пацієнта перед процедурою клітинної терапії

З метою попередження ускладнень під час та після процедури клітинної терапії, пацієнт може отримати медикаментозну підготовку перед початком процедури, яка включає в себе:

- антигістамінні засоби (хлорфенірамін, дексхлорфенірамін тощо);
- глюкокортикостероїди (метилпреднізолон, гідрокортизон тощо);
- прокінетики (метаклопрамід);
- парацетамол у дозі 1 г;
- антикоагулянти та ін.

Е. Алгоритм проведення процедури "Забір аспірату"

Аспірація кісткового мозку — процедура, яка використовується для отримання зразка рідкої частини кісткового мозку з метою наступної обробки та виділення з нього мезенхімальних стовбурових клітин.

Ліпоаспірація — це хірургічна процедура, призначена для забору жирової тканини з метою її наступної переробки та отримання з неї мезенхімальних стовбурових клітин.

Пацієнт заздалегідь обстежується лабораторно, інструментально, визначаються показання та можливі протипоказання.

Всі маніпуляції з біологічним матеріалом відбуваються з дотриманням жорстких правил асептики й антисептики.

Під час забору кісткового мозку знеболення досягається седацією та/або місцевою інфільтративною анестезією під динамічним моніторингом і анестезіологічним супроводом.

За допомогою кісткової голки типу *Jamshidi* через точковий розріз шкіри пунктують до 50 мл червоного кісткового мозку з крила таза (рис. 3).

Перед забором кісткового мозку треба промити шприц та голку розчином гепарину (Гепарин 5000 МО/мл 5 мл). Одразу після забору кісткового мозку треба НЕГАЙНО перенести отриманий аспірат у стерильну пробірку об'ємом 50 мл, яка містить розчин гепарину (Гепарин 5000 МО/мл 5 мл), в кількості 5 мл гепарину на 50 мл кісткового мозку, та обережно перемішати шар аспірату і шар розчину гепарину між собою. Слід пам'ятати,

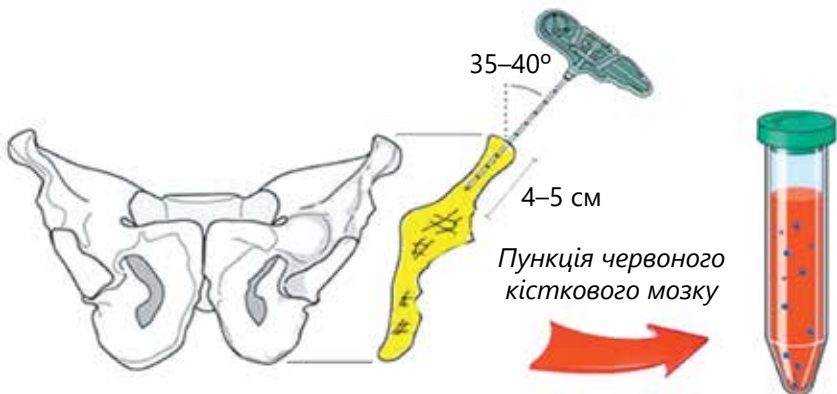


Рис. 3. Техніка забору кісткового мозку

що мінімальним об'ємом кісткового мозку, необхідним для цілей культивування клітин людини, є об'єм від 10 до 25 мл. Але в деяких випадках необхідний об'єм збільшують до 100 мл. Необхідний об'єм кісткового мозку для лабораторного процесу визначається в кожному окремому випадку з офіційними представниками біотехнологічної лабораторії по телефону або електронною поштою заздалегідь перед забором біоматеріалу. Пробірка (стерильна суха) надсилається в необхідній кількості до медичного центру за попередньою заявкою.

Процедура ліпоаспірації виконується за допомогою металеві канюлі, приєднаної до шприца. Перед початком процедури лікар здійснює інфільтрацію (обколювання) підшкірної жирової клітковини у місці забору ліпоаспірату спеціальним розчином, який містить місцевий анестетик та адреналін. Інфільтрація забезпечує знеболення, зменшення крововтрати та полегшення процедури ліпоаспірації. Через розріз невеликого розміру канюлю заводять у підшкірну жирову клітковину, здійснюють декілька поштовхоподібних рухів у напрямку від розрізу до пупка, після чого за допомогою натягування шприцевого поршня отримують від 20 до 100 мл ліпоаспірату (рис. 4).

Після завершення ліпоаспірації на розріз накладають асептичну пов'язку.

Ж. Алгоритм культивування аутологічних стовбурових клітин

Після проведення маркування хворому в операційній після обробки операційного поля проводиться місцева анестезія зони, де буде виконуватися забір кісткового мозку. Для анестезії місця доступу можна використовувати 1% розчин лідокаїну, після чого здійснюється введення голки Франка та забір аспірату кісткового мозку з дотриманням всіх умов асептики та антисептики. Одержаний аспірат кісткового мозку у розмірі не менше 20 мл слід розташовувати у стерильній ємності, з додаванням 5 мл розчину гепарину (5000 МО/мл). Ємність з аспіратом кісткового мозку та гепарином слід закривати й розташовувати у контейнері для транспортування, що

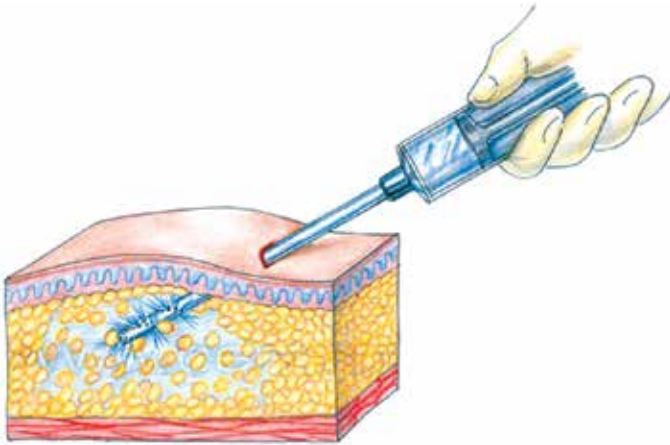


Рис. 4. Процедура ліпоаспірації

містить велику кількість льоду. Робота проводиться в стерильних умовах ламінарного боксу біологічної безпеки II класу.

Суспензію чистого кісткового мозку за допомогою дозатора змінного об'єму слід відібрати, перенести в пробірку, промаркувати й віддати на фенотипування за методом проточної цитометрії. Клітинний матеріал слід розбавляти один до одного середовищем *MEM Alpha* й перемішувати. Необхідно додати розчин гепарину (5000 МО/мл). Обережно шприцем на 20 мл, нахиливши пробірку під кутом 45°, слід внести по стінці аспірат кісткового мозку з середовищем у завчасно підготовлені центрифужні пробірки з розчином гістопаку (зі щільністю 1,077 г/см³). Аспірат кісткового мозку слід відцентрифугувати при 45°, 30 хвилин за температури 15°C. Після центрифугування отримується кістковий мозок, розділений на такі фракції: плазма, мононуклеарні клітини, гістопаки та еритроцити. Надосад у вигляді плазми та осад з еритроцитів слід відібрати на утилізацію. Клітинну суспензію мононуклеарних клітин у вигляді білої борозни над гістопаком разом з плазмою слід перенести в іншу центрифужну пробірку з однократним розчином

DPBS та ще раз відцентрифугувати 15 хвилин. Концентрацію клітин визначають рутинним методом у камері Горяєва або автоматичним лічильником для клітин Luna. Після цього клітинну суспензію слід внести до флаконів з поживним середовищем. У ході моношарового культивування відбувається поступове очищення культур від слабоадгезивних клітин, і на 5-ту добу культивування спостерігається рівномірний ріст клітин по всій поверхні культурального пластику. До 10–12 доби культивування адгезивні клітини, виділені з кісткового мозку, формують 70–80% конфлуентного моношару. В процесі субкультивування гетерогенність вихідної суспензії поступово знижується, і вже після 3–4 пасажів культура мезенхімальних стовбурових клітин представлена популяцією переважно фібробластоподібних клітин. У ході кожного пасажу кількість клітин збільшується в середньому вдвічі. Після проведення 4–6 пасажів клітини слід знімати з питомого середовища, консервувати і транспортувати у відповідних транспортних контейнерах при температурі 2–8°C для пересадки хворому в ішемізовану кінцівку. Кожен отриманий препарат клітин МСК з кісткового мозку повинен супроводжуватися відповідним паспортом біотехнологічного продукту, який містить вказівки про загальну кількість клітин у препараті, кількість ядерних клітин у препараті, життєздатність клітин. Кількість ядерних клітин у препаратах варіює від 15 до 40 млн клітин, життєздатність має складати від 89 до 95%. Препарат клітин перед введенням розводиться на 10 мл фізіологічного розчину.

Способи застосування мезенхімальних стовбурових клітин при ХКІНК

Способи застосування мезенхімальних стовбурових клітин досить різноманітні і залежать переважно від рівня і дифузності атеросклеротичного процесу.

Найпоширеніші з них:

- внутрішньовенна інфузія (об'єм від 20 до 400 мл зі швидкістю 0,5–6 мл/хв);

- внутрішньом'язові (від 10 до 25 ін'єкцій об'ємом 0,2–0,5 мл);
- тощо.

Особливості проведення внутрішньовенних інфузій:

- інфузію слід здійснювати у товсту вену верхньої кінцівки;
- використовувати систему для внутрішньовенного переливання крові та її компонентів;
- кожен пакет, флакон або шприц із суспензією МСК необхідно струсити перед початком застосування і повторювати цю процедуру кожні 10–15 хв інфузії, щоб попередити осідання клітин на дно флакона (пакета для інфузії);
- починати інфузію варто з повільнішого темпу протягом 10–15 хв, за відсутності серйозних реакцій — швидкість інфузії можна збільшити;
- після завершення інфузії клітинної суспензії можна провести додаткову інфузію збалансованого сольового розчину.

Особливості проведення внутрішньом'язових інфузій:

- інфузію слід здійснювати у м'язи нижньої кінцівки за відповідною схемою (рис. 5);
- кожен шприц із суспензією МСК необхідно струсити перед початком застосування;
- при артеріальній оклюзії вище пупартової зв'язки введення суспензії МСК здійснюється на стегні та гомілці;
- при артеріальній оклюзії нижче колінного суглоба введення суспензії МСК здійснюється на гомілці;
- введення суспензії МСК здійснюється з інтервалом не далі як 6 см одне від одного.

К. Післяпроцедурний супровід пацієнта

Після завершення процедури клітинної терапії слід підтримувати зв'язок з пацієнтом з метою відстеження змін у стані його здоров'я, перебігу захворювання та ефективності проведеного лікування.

Оскільки терапія мезенхімальними стовбуровими клітинами не дає негайного ефекту, максимального лікувального ефекту слід очікувати за 1–6 місяців після процедури.

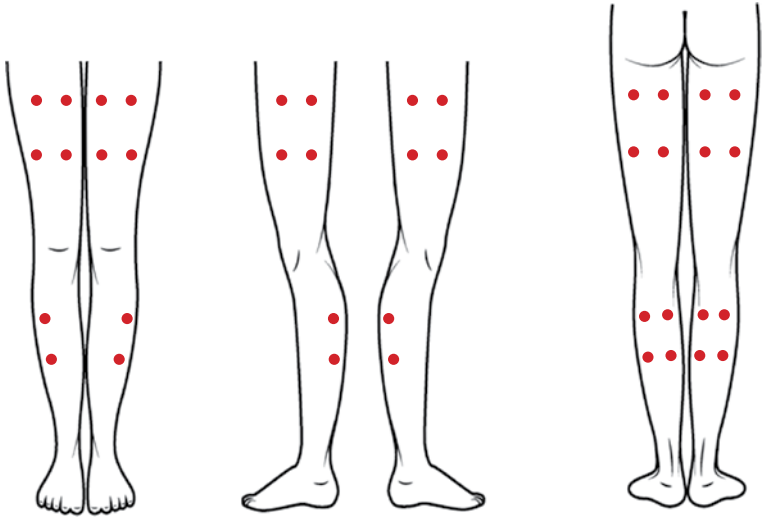


Рис. 5. Схема введення АМСК у м'язи нижньої кінцівки

Розділ 4

Ведення пацієнтів та контроль за кровопостачанням кінцівки

Для контролю оцінки можливостей МАСК зменшувати вираженість больового синдрому в стані спокою, площу трофічних змін, збільшувати дистанцію ходьби, покращувати гемодинамічні показники в ішемізованих нижніх кінцівках застосовуються загальновідомі методики. Оцінюються такі показники: динаміка болю спокою в кінцівці або СПК, динаміка змін площі трофічних розладів, сегментарний тиск на гомілкових артеріях з розрахунком кісточно-плечового індексу (КПІ), стан мікроциркуляції методом ЛДФ до і після закінчення лікування.

4.1. Оцінка вираженості больового синдрому і знеболення

Необхідно дотримуватись положення Монреальської декларації "Право людини на адекватне та професійне знеболення". На сьогодні оцінка болю вважається п'ятим життєвим показником стану хворого. У пацієнтів, які скаржаться на біль, слід відрображати його інтенсивність за візуально-аналоговою шкалою (ВАШ) від 0 до 10 балів. Це можна вказувати на сторінці історії хвороби поряд з температурою та пульсом. Для оцінки болю за візуальною аналоговою шкалою пацієнту видається примірник шкали, в якій він самостійно, базуючись на суб'єктивних відчуттях, відмічає у балах больовий компонент (рис. б).

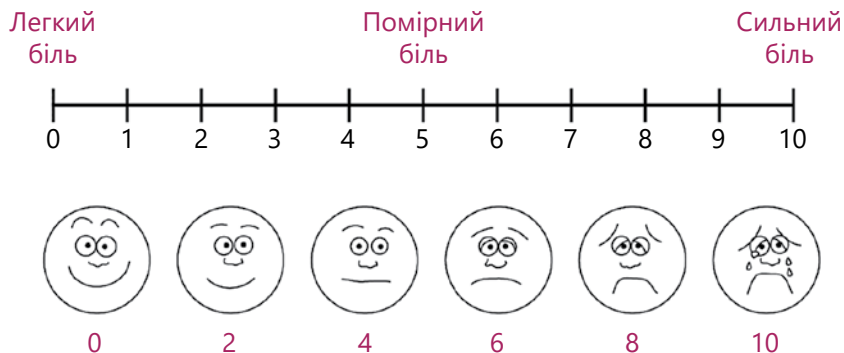


Рис. 6. Візуальна аналогова шкала, де:

1–3 = легкий біль; мінімальний вплив на повсякденну діяльність;
 4–6 = помірний біль; помірний вплив на повсякденну діяльність;
 7–10 = сильний біль; великий вплив на повсякденну діяльність

Принципи знеболення пацієнтів мають базуватися на даних оцінки за шкалою ВАШ за такою, наприклад, схемою:



Легкий біль (ВАШ 10–0 мм):

Інфулган: 1 флакон 4 рази на добу

Кейдекс: 1 ампула в/м, в/в 3 рази на добу



Помірний біль (ВАШ 40–60 мм):

Інфулган: 1 флакон 4 рази на добу

Кейдекс: 1 ампула в/м, в/в 3 рази на добу

Ропілонг: 1 флакон зі швидкістю 6–16 мл/год через епідуральний катетер



Сильний біль (ВАШ 70–100 мм):

Інфулган: 1 флакон 4 рази на добу

Кейдекс: 1 ампула в/м, в/в 3 рази на добу

Ропілонг: 1 флакон зі швидкістю 6–16 мл/год через епідуральний катетер

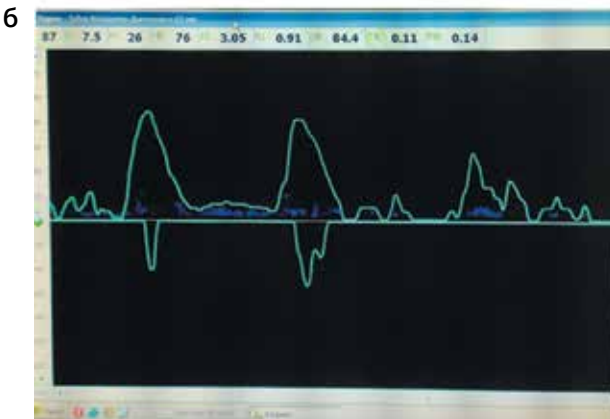
Налбуфін: 1 ампула 1–2 рази на добу

4.2. Розрахунок кісточново-плечового індексу

Ультразвукове дослідження потрібно починати з визначення доплерівського сигналу на кісточкових артеріях з вимірюванням на них тиску та розрахунком кісточново-плечового індексу (КПІ). При цьому застосовується манжета на гомілці і плечі (рис. 7).



*Рис. 7. Вимірювання тиску на кісточкових артеріях та розрахунок кісточново-плечового індексу:
а — фото процедури на лівій кінцівці;
б — фото з екрана (АТ права рука 152/73, нога 68, ліва рука 142/46, нога 47. Коеф.: права 0,45. Коеф.: ліва 0,33)*



4.3. Визначення площі поверхні та об'єму трофічної виразки

Визначення площі поверхні трофічної виразки може проводитися різними методиками, але бажано віддавати перевагу безконтактним способам. Таким є використання цифрового фотоапарата, обладнаного міліметр-градуйованою виносною рамкою фіксованої довжини (в режимі макрозйомки фотографується уражена частина шкіри) (Патент України на корисну модель №128 624). Спосіб характеризується доволі швидким виконанням, на отримання зображення витрачається приблизно 15–20 секунд, на обробку та обчислення цифрового фотознімку в програмі “ImageJ” — не більше двох хвилин. Практично спосіб є безконтактним і виконується таким чином: положення пацієнта — довільне. Вимірювальну частину міліметр-градуйованої виносної рамки, фіксованої до фотоапарата двома металевими стержнями на постійній відстані від об'єктива та в паралельній йому площині, прикладають під прямим кутом до здорової шкіри поряд з дефектом шкіри, проводять фотозйомку. За допомогою програми “ImageJ” на отриманих фотознімках задають референтні значення відстані відповідно до поділок вимірювальної частини виносної рамки та окреслюють площу ураження. Автоматично проводяться розрахунки площі поверхні дефекту шкіри. Таким чином отримують точні дані. Для неінвазивного визначення об'єму виразки використовується інший безконтактний спосіб, що виконується шляхом фотографування її під різними кутами та обробки отриманих даних за допомогою алгоритму *Structure from motion (SFM)* з подальшою тривимірною реконструкцією та подальшим вимірюванням об'єму. Отриману в результаті тривимірну модель поверхні виразки калібрують на основі калібрувальної лінійки, відновлюючи реальні розміри; край рани обводиться сплайном, отриманий сплайн конвертується в поверхню і об'єднується із задалегідь відсегментованою поверхнею виразки (рис. 8).



Рис. 8. Загальний вигляд набору з пристроєм для визначення площі і об'ємів трофічних розладів

4.4. Визначення стану мікроциркуляції ураженої кінцівки

Серед кількісних показників артеріального кровопостачання кінцівок пріоритетним є визначення стану мікроциркуляції за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії (ЛДФ). ЛДФ проводиться за допомогою приладів, призначених для цих цілей; наприклад, в наших дослідженнях вона проводилась на апаратному комплексі LDF "FET-1" (Aston Medical Technology Ltd., <http://www.amedtech.co.uk/>) (Великобританія). Як датчик у приладах застосовується світловий зонд, виконаний з трьох моноволокон. Одне волокно використовується для доставки лазерного випромінювання від приладу до досліджуваного об'єкта; два інших волокна є приймальними для розсіяного в тканині лазерного випромінювання. Доставлене по волокнах розсіяне випромінювання детектується двоканальним фотоприймачем. Електричні сигнали

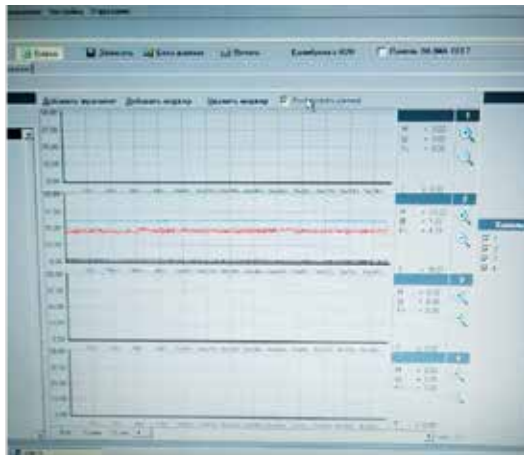
з фотоприймального пристрою надходять у блок обробки аналізатора, де відбувається виділення в зареєстрованому сигналі додаткового зміщення частоти. Після аналогової обробки формується вихідний сигнал, пропорційний добутку співмножників: середньої швидкості руху еритроцитів та їх концентрації в зондованому об'ємі тканини. Найчастіше для реєстрації ЛДФ використовують шкірний покрив у ділянці пальців стопи, а також у нижній третині гомілки (рис. 9).

Для запису ЛДФ-грами датчик аналізатора нерухомо закріплюється за допомогою клейкої стрічки або за допомогою спеціального штатива чи інших пристроїв на досліджуваній поверхні. Запис ЛДФ-грами проводиться в положенні пацієнта лежачи таким чином, щоб вимірювана ділянка знаходилася на рівні серця. У хворих із III-Б ст. ішемії нижніх кінцівок переважає спастикоатонічна форма, коли на тлі спазматичних явищ в артеріальній

а



б



*Рис. 9. Вимірювання перфузійного кровотоку на рівні великого пальця стопи методом ЛДФ:
а – фото процедури вимірювання на правій кінцівці;
б — візуалізація показників на екрані.*

ланці мікроциркуляторного русла спостерігаються виражені зміни у його венозній ланці з переважанням венозного застою та реологічних порушень кровотоку. У хворих із IV ст. ішемії нижніх кінцівок в основному виявляється стазична форма порушень мікроциркуляції, коли за рахунок вираженого стазу відбувається порушення бар'єрної функції мікросудин з порушенням проникності стінки капілярів та діapedезом еритроцитів.

Лазерна доплерівська флоуметрія проводиться за методом Стефановської (згідно з рекомендаціями Європейського товариства лазерної доплерівської флоуметрії). Слід визначити $M\phi$ (пф.од.) — рівень мікроциркуляції шкіри фонового запису на зовнішній поверхні лівого передпліччя, на 3–4 см проксимальніше від міжвідросткової лінії, посередині цієї лінії. Для визначення типу мікроциркуляції визначали $PKK, \%$ — резерв капілярного кровотоку, який визначали за допомогою оклюзивної проби.

Вимірюється Mvk — показник мікроциркуляції, визначений на шкірі, в ділянці трофічної виразки, Mzk — показник мікроциркуляції, що вимірюється на шкірі здорової кінцівки, на поверхні шкіри контрлатеральної проекції трофічної виразки ураженої кінцівки.

Слід визначити показники вейвлет-аналізу (BA) записаних ЛДФ-грам усіх 3 зон. За даними BA визначали:

$AE\phi$ (пф.од.) — максимальну амплітуду ендотеліальних флаксмоцій, фоновий запис.

$AN\phi$ (пф.од.) — максимальну амплітуду нейрогенних флаксмоцій.

$AM\phi$ (пф.од.) — максимальну амплітуду міогенних флаксмоцій.

$AD\phi$ (пф.од.) — максимальну амплітуду дихальних флаксмоцій.

$AC\phi$ (пф.од.) — максимальну амплітуду серцевих флаксмоцій.

$AEzk$ (пф.од.) — максимальну амплітуду ендотеліальних флаксмоцій, запис на шкірі здорової кінцівки.

$ANzk$ (пф.од.) — максимальна амплітуда нейрогенних флаксмоцій здорової кінцівки.

$AMzk$ (пф.од.) — максимальна амплітуда міогенних флаксмоцій на здоровій кінцівці.

АДзк (пф.од.) — амплітуда дихальних флаксмоцій здорової кінцівки.

АСзк (пф.од.) — амплітуда серцевих флаксмоцій здорової кінцівки.

АЕвк (пф.од.) — максимальну амплітуду ендотеліальних флаксмоцій на шкірі ураженої атеросклерозом кінцівки, в місці виразки — зона критичної ішемії, до лікування (введення мезенхімальних стовбурових клітин — МСК).

АНвк (пф.од.) — максимальна амплітуда нейрогенних флаксмоцій ураженої кінцівки.

АМвк (пф.од.) — максимальна амплітуда міогенних флаксмоцій ураженої кінцівки.

АДвк (пф.од.) — максимальна амплітуда дихальних флаксмоцій ураженої кінцівки.

АСвк (пф.од.) — максимальна амплітуда серцевих флаксмоцій ураженої кінцівки.

Динамічна оцінка стану мікроциркуляції проводиться через 1 місяць після введення МСК. Слід визначати *Мвк1* — рівень мікроциркуляції на ураженій кінцівці. А також показники вейвлет-перетворення:

АЕвк1 (пф.од.) — максимальна амплітуда ендотеліальних флаксмоцій ураженої кінцівки.

АНвк1 (пф.од.) — максимальна амплітуда нейрогенних флаксмоцій ураженої кінцівки через 1 місяць після введення МСК.

АМвк1 (пф.од.) — максимальна амплітуда міогенних флаксмоцій ураженої кінцівки через 1 місяць після введення МСК.

АДвк1 (пф.од.) — максимальна амплітуда дихальних флаксмоцій ураженої кінцівки через 1 місяць після введення МСК.

АСвк1 (пф.од.) — максимальна амплітуда серцевих флаксмоцій ураженої кінцівки через 1 місяць після введення МСК.

Розділ 5

Висновки

1. Більшість регуляторних органів усвідомили необхідність раннього доступу до інноваційних методів лікування незадоволених медичних потреб, які можуть покращити якість медичної допомоги при небезпечних для життя станах. Оскільки критична ішемія кінцівок із зростаючою частотою є серйозною проблемою для здоров'я, прискорення інноваційних передових методів лікування має важливе значення.
2. Публікації результатів доклінічних експериментальних досліджень засвідчили сприятливий вплив *BM-MNC* та *MSC* на покращення стану ішемії кінцівок.
3. Опубліковані дані метааналізів показують покращення стану ураженої кінцівки у пацієнтів, які проходили клітинну терапію за всіма параметрами (кісточково-плечовий індекс тиску (ABI), транскутанний тиск кисню ($TcPO_2$), ЛДФ, інтервал кульгавості та прояв болю в кінцівці).
4. Є вдвічі вищі шанси уникнути ампутації кінцівок у групі пацієнтів, які отримують клітинну терапію, порівняно з контрольною групою, тому у березні 2016 року Європейське агентство з лікарських засобів оголосило аутологічні моноклеарні клітини кісткового мозку (*BM-MNC*) лікарським засобом передової терапії із запропонованими показаннями для покращення перфузії кінцівок / відновлення кровотоку.
5. Клітинна терапія є відносно безпечним терапевтичним втручанням з низьким ризиком ранніх ускладнень під час процедури та незабаром після неї.

6. Ізолят, призначений для лікування ХКІНК, вводиться глибоко у внутрішньом'язовий простір, уздовж передбачуваного ходу стегнових та/або гомілкових артерій ураженої кінцівки.
7. Внутрішньом'язове застосування біопрепарату, враховуючи високу міграційну активність ізоляту в тканинах, не потрібно проводити під контролем ультразвуку. Після процедури пацієнт може повертатися до звичного способу життя.
8. Чинна законодавча та галузева нормативна бази дають можливість використання мезенхімальних стовбурових клітин при наданні медичної допомоги хворим на ХКІНК.

Список літератури

1. Frank, U.; Nikol, S.; Belch, J.; Boc, V.; Brodmann, M.; Carpentier, P.H.; Chraim, A.; Canning, C.; Dimakakos, E.; Gottsater, A.; et al. ESVM Guideline on peripheral arterial disease. *Vasa* 2019, 48 (Suppl. 102), 1–79. [CrossRef]
2. Aboyans, V.; Ricco, J.B.; Bartelink, M.E.L.; Bjorck, M.; Brodmann, M.; Cohnert, T.; Collet, J.P.; Czerny, M.; De Carlo, M.; Debus, S.; et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: The European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur. Heart J.* 2018, 39, 763–816. [PubMed] *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8999 12 of 15
3. Management of Peripheral Arterial Disease (PAD); TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). Section D: Chronic critical limb ischaemia. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2000, 19 (Suppl. A), 144–243. [CrossRef]
4. De Caridi, G.; Massara, M.; Stilo, F.; Spinelli, F.; Grande, R.; Butrico, L.; de Francis, S.; Serra, R. Effectiveness of prostaglandin E1 in patients with mixed arterial and venous ulcers of the lower limbs. *Int. Wound J.* 2016, 13, 625–629. [CrossRef] [PubMed]
5. Mirenda, F.; La Spada, M.; Baccellieri, D.; Stilo, F.; Benedetto, F.; Spinelli, F. Iloprost infusion in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease and foot ulcers. *Chir. Ital. Milano Roma* 2005, 6, 731–735.
6. Nehler, M.R.; Peyton, B.D. Is revascularization and limb salvage always the treatment for critical limb ischemia? *J. Cardiovasc. Surg.* 2004, 45, 177–184. [CrossRef] [PubMed]
7. Watelet, J.; Soury, P.; Menard, J.F.; Plissonnier, D.; Peillon, C.; Lestrat, J.P.; Testart, J. Femoropopliteal bypass: In situ or reversed vein grafts? Ten-year results of a randomized prospective study. *Ann. Vasc. Surg.* 1997, 11, 510–519. [CrossRef] [PubMed]
8. Norgren, L.; Hiatt, W.R.; Dormandy, J.A.; Nehler, M.R.; Harris, K.A.; Fowkes, F.G.; Bell, K.; Caporusso, J.; Durand-Zaleski, I.; Komori, K.; et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J. Vasc. Surg.* 2007, 45, S5–S67. [CrossRef]

9. Sprengers, R.W.; Moll, F.L.; Verhaar, M.C. Stem cell therapy in PAD. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2010, 39 (Suppl. 1), S38–S43. [CrossRef]
10. Fadini, G.P.; Agostini, C.; Avogaro, A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis* 2010, 209, 10–17. [CrossRef]
11. Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A.; Silver, M.; van der Zee, R.; Li, T.; Witzenbichler, B.; Schattteman, G.; Isner, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275, 964–967. [CrossRef] [PubMed]
12. Tateishi-Yuyama, E.; Matsubara, H.; Murohara, T.; Ikeda, U.; Shintani, S.; Masaki, H.; Amano, K.; Kishimoto, Y.; Yoshimoto, K.; Akashi, H.; 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, 427–435. [CrossRef]
13. Xie, B.; Luo, H.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Zhou, C.; Xu, D. Autologous Stem Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled trials. *Stem Cells Int.* 2018, 7528464. [CrossRef]
14. Tongers, J.; Roncalli, J.G.; Losordo, D.W. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc. Res.* 2010, 79, 200–206. [CrossRef]
15. Urbich, C.; Dimmeler, S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc. Med.* 2004, 14, 318–322. [CrossRef]
16. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231–1236.
17. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 1993;92:652–662.
18. Peichev, M.; Naiyer, A.J.; Pereira, D.; Zhu, Z.; Lane, W.J.; Williams, M.; Oz, M.C.; Hicklin, D.J.; Witte, L.; Moore, M.A.; et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000, 95, 952–958. [CrossRef]
19. Stamm, C.; Westphal, B.; Kleine, H.D.; Petzsch, M.; Kittner, C.; Klinge, H.; Schumichen, C.; Nienaber, C.A.; Freund, M.; Steinhilber, G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003, 361, 45–46. [CrossRef]
20. Bartunek, J.; Vanderheyden, M.; Vandekerckhove, B.; Mansour, S.; De Bruyne, B.; De Bondt, P.; Van Haute, I.; Lootens, N.; Heyndrickx, G.; Wijns, W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: Feasibility and safety. *Circulation* 2005, 112 (Suppl. 9), 178–183.
21. Kocher, A.A.; Schuster, M.D.; Szabolcs, M.J.; Takuma, S.; Burkho, D.; Wang, J.; Homma, S.; Edwards, N.M.; Itescu, S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte

- apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* 2001, 7, 430–436. [CrossRef]
22. Friedenstein, A.J.; Petrakova, K.V.; Kurolesova, A.I.; Frolova, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968, 6, 230–247. [CrossRef]
 23. Ribatti, D.; Nico, B.; Crivellato, E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 2011, 55, 261–268. [CrossRef]
 24. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284, 143–147. [CrossRef]
 25. Lu, D.; Chen, B.; Liang, Z.; Deng, W.; Jiang, Y.; Li, S.; Xu, J.; Wu, Q.; Zhang, Z.; Xie, B.; et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011, 92, 26–36. [CrossRef] [PubMed]
 26. Cobellis, G.; Maione, C.; Botti, C.; Coppola, A.; Silvestroni, A.; Lillo, S.; Schiavone, V.; Molinari, A.M.; Sica, V. Beneficial effects of VEGF secreted from stromal cells in supporting endothelial cell functions: Therapeutic implications for critical limb ischemia. *Cell Transplant.* 2010, 19, 1425–1437. [CrossRef] [PubMed]
 27. Altaner, C.; Altanerova, V.; Cihova, M.; Hunakova, L.; Kaiserova, K.; Klepanec, A.; Vulev, I.; Madaric, J. Characterization of mesenchymal stem cells of “no-options” patients with critical limb ischemia treated by autologous bone marrow mononuclear cells. *PLoS ONE* 2013, 8, e73722. [CrossRef] [PubMed]
 28. Cunha, F.F.; Martins, L.; Martin, P.K.; Stilhano, R.S.; Han, S.W. A comparison of the reparative and angiogenic properties of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of BALB/c and C57/BL6 mice in a model of limb ischemia. *Stem. Cell Res. Ther.* 2013, 4, 86. [CrossRef]
 29. Garcia-Vazquez, M.D.; Herrero de la Parte, B.; Garcia-Alonso, I.; Morales, M.C. Analysis of Biological Properties of Human Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Effect on Mouse Hind Limb Ischemia]. *J. Vasc. Res.* 2019, 56, 77–91. [Cross-Ref]
 30. Namnian, P.; Asadi-Yousefabad, S.L.; Daneshi, S.; Sheikhha, M.H.; Tabei, S.M.B.; Razban, V. Comparative analysis of mouse bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells for critical limb ischemia cell therapy. *Stem. Cell Res. Ther.* 2021, 12, 58. [CrossRef]
 31. Rossi, E.; Smadja, D.; Goyard, C.; Cras, A.; Dizier, B.; Bacha, N.; Lokajczyk, A.; Guerin, C.L.; Gendron, N.; Planquette, B.; et al. Co-injection of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells accelerates muscle recovery in hind limb ischemia through an endoglin-dependent mechanism. *Thromb. Haemost.* 2017, 117, 1908–1918. [CrossRef]
 32. Lian, W.; Hu, X.; Pan, L.; Han, S.; Cao, C.; Jia, Z.; Li, M. Human primary CD34(+) cells transplantation for critical limb ischemia. *J. Clin. Lab. Anal.* 2018, 32, e22569.

[CrossRef] [PubMed]

33. Kalka, C.; Masuda, H.; Takahashi, T.; Kalka-Moll, W.M.; Silver, M.; Kearney, M.; Li, T.; Isner, J.M.; Asahara, T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 3422–3427. [CrossRef] [PubMed]
34. Urbich, C.; Heeschen, C.; Aicher, A.; Dernbach, E.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003, 108, 2511–2516. [CrossRef]
35. Zhao, W.N.; Xu, S.Q.; Liang, J.F.; Peng, L.; Liu, H.L.; Wang, Z.; Fang, Q.; Wang, M.; Yin, W.Q.; Zhang, W.J.; et al. Endothelial progenitor cells from human fetal aorta cure diabetic foot in a rat model. *Metabolism* 2016, 65, 1755–1767. [CrossRef] [PubMed]
36. Yoon, C.H.; Hur, J.; Park, K.W.; Kim, J.H.; Lee, C.S.; Oh, I.Y.; Kim, T.Y.; Cho, H.J.; Kang, H.J.; Chae, I.H.; et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: The role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005, 112, 1618–1627. [CrossRef] [PubMed]
37. Foubert, P.; Matrone, G.; Souttou, B.; Lere-Dean, C.; Barateau, V.; Plouet, J.; Le Ricousse-Roussanne, S.; Levy, B.I.; Silvestre, J.S.; Tobelem, G. Coadministration of endothelial and smooth muscle progenitor cells enhances the efficiency of proangiogenic cell-based therapy. *Circ. Res.* 2008, 103, 751–760. [CrossRef]
38. Shintani, S.; Murohara, T.; Ikeda, H.; Ueno, T.; Sasaki, K.; Duan, J.; Imaizumi, T. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001, 103, 897–903. [CrossRef]
39. de Nigris, F.; Williams-Ignarro, S.; Sica, V.; D'Armiendo, F.P.; Lerman, L.O.; Byrns, R.E.; Sica, G.; Fiorito, C.; Ignarro, L.J.; Napoli, C. Therapeutic effects of concurrent autologous bone marrow cell infusion and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the hypercholesterolemic mouse hindlimb. *Int. J. Cardiol.* 2007, 117, 238–243. [CrossRef] [PubMed]
40. Jeon, O.; Song, S.J.; Bhang, S.H.; Choi, C.Y.; Kim, M.J.; Kim, B.S. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs. *J. Biomed. Sci.* 2007, 14, 323–330. [CrossRef]
41. Gan, L.; Matsuura, H.; Ichiki, T.; Yin, X.; Miyazaki, R.; Hashimoto, T.; Cui, J.; Takeda, K.; Sunagawa, K. Improvement of neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells from diabetic mice by ex vivo pretreatment with resveratrol. *Hypertens. Res.* 2009, 32, 542–547. [CrossRef] [PubMed]
42. Liu, Q.; Chen, Z.; Terry, T.; McNatt, J.M.; Willerson, J.T.; Zoldhelyi, P. Intra-arterial transplantation of adult bone marrow cells restores blood flow and regenerates skeletal muscle in ischemic limbs. *Vasc. Endovascular. Surg.* 2009, 43, 433–443. [CrossRef]
43. Brenes, R.A.; Jadlowiec, C.C.; Bear, M.; Hashim, P.; Protack, C.D.; Li, X.; Lv, W.; Collins, M.J.; Dardik, A. Toward a mouse model of hind limb ischemia to test

- therapeutic angiogenesis. *J. Vasc. Surg.* 2012, 56, 1669–1679; discussion 1679. [CrossRef] [PubMed]
44. Reis, P.E.; de Carvalho, L.P.; Yasumura, E.; da Silva, F.H.; Garcia, B.C.; Beutel, A.; Sacramento, C.B.; Baptista-Silva, J.C.; de Campos, R.R.; Takiya, C.M.; et al. Impact of angiogenic therapy in the treatment of critical lower limb ischemia in an animal model. *Vasc. Endovascular. Surg.* 2014, 48, 207–216. [CrossRef] [PubMed]
 45. Kuwahara, G.; Nishinakamura, H.; Kojima, D.; Tashiro, T.; Kodama, S. GM-CSF treated F4/80+ BMCs improve murine hind limb ischemia similar to M-CSF differentiated macrophages. *PLoS ONE* 2014, 9, e106987. [CrossRef] [PubMed]
 46. Capoccia, B.J.; Robson, D.L.; Levac, K.D.; Maxwell, D.J.; Hohm, S.A.; Neelamkavil, M.J.; Bell, G.I.; Xenocostas, A.; Link, D.C.; Pivnicka-Worms, D.; et al. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 2009, 113, 5340–5351. [CrossRef]
 47. Rahnemai-Azar, A.; D'Ippolito, G.; Gomez, L.A.; Reiner, T.; Vazquez-Padron, R.I.; Perez-Stable, C.; Roos, B.A.; Pham, S.M.; Schiller, P.C. Human marrow-isolated adult multilineage-inducible (MIAMI) cells protect against peripheral vascular ischemia in a mouse model. *Cytotherapy* 2011, 13, 179–192. [CrossRef]
 48. Li, S.; Zhou, B.; Han, Z.C. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cells. *Thromb. Haemost.* 2006, 95, 301–311. [PubMed]
 49. Padilla, L.; Arguero-Sanchez, R.; Rodriguez-Trejo, J.M.; Carranza-Castro, P.H.; Suarez-Cuenca, J.A.; Polaco-Castillo, J.; DiSilvio-Lopez, M.; Lopez-Gutierrez, J.; Olguin-Juarez, H.; Hernandez-Patricio, A.; et al. Effect of autologous transplant of peripheral blood mononuclear cells in combination with proangiogenic factors during experimental revascularization of lower limb ischemia. *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 2020, 14, 600–608. [CrossRef]
 50. Liu, J.; Qiu, P.; Qin, J.; Wu, X.; Wang, X.; Yang, X.; Li, B.; Zhang, W.; Ye, K.; Peng, Z.; et al. Allogeneic adipose-derived stem cells promote ischemic muscle repair by inducing M2 macrophage polarization via the HIF-1alpha/IL-10 pathway. *Stem. Cells* 2020, 38, 1307–1320. [PubMed]
 51. Rybalko, V.; Hsieh, P.L.; Ricles, L.M.; Chung, E.; Farrar, R.P.; Suggs, L.J. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells and macrophages for ischemic skeletal muscle repair. *Regen. Med.* 2017, 12, 153–167. [CrossRef] [PubMed]
 52. Jin, E.; Chae, D.S.; Son, M.; Kim, S.W. Angiogenic characteristics of human stromal vascular fraction in ischemic hindlimb. *Int. J. Cardiol.* 2017, 234, 38–47. [CrossRef] [PubMed]
 53. Prather, W.R.; Toren, A.; Meiron, M.; Ofir, R.; Tschöpe, C.; Horwitz, E.M. The role of placental-derived adherent stromal cell (PLX-PAD) in the treatment of critical limb ischemia. *Cytotherapy* 2009, 11, 427–434. [CrossRef] [PubMed]
 54. Zahavi-Goldstein, E.; Blumenfeld, M.; Fuchs-Telem, D.; Pinzur, L.; Rubin, S.; Aberman, Z.; Sher, N.; Ofir, R. Placenta-derived PLX-PAD mesenchymal-like stromal

- cells are efficacious in rescuing blood flow in hind limb ischemia mouse model by a dose and site-dependent mechanism of action. *Cytotherapy* 2017, 19, 1438–1446. [CrossRef] [PubMed]
55. Soria-Juan, B.; Escacena, N.; Capilla-Gonzalez, V.; Aguilera, Y.; Llanos, L.; Tejedo, J.R.; Bedoya, F.J.; Juan, V.; De la Cuesta, A.; Ruiz-Salmeron, R.; et al. Cost-Effective, Safe, and Personalized Cell Therapy for Critical Limb Ischemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Immunol.* 2019, 10, 1151. [CrossRef]
 56. Kim, Y.; Kim, H.; Cho, H.; Bae, Y.; Suh, K.; Jung, J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol. Biochem.* 2007, 20, 867–876. [CrossRef]
 57. Wang, Z.; Zheng, L.; Lian, C.; Qi, Y.; Li, W.; Wang, S. Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Relieve Hind Limb Ischemia by Promoting Angiogenesis in Mice. *Stem. Cells Dev.* 2019, 28, 1384–1397. [CrossRef] [PubMed]
 58. Mathew, S.A.; Naik, C.; Cahill, P.A.; Bhonde, R.R. Placental mesenchymal stromal cells as an alternative tool for therapeutic angiogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* 2020, 77, 253–265. [CrossRef] [PubMed]
 59. Cobellis, G.; Maione, C.; Botti, C.; Coppola, A.; Silvestroni, A.; Lillo, S.; Schiavone, V.; Molinari, A.M.; Sica, V. Beneficial effects of VEGF secreted from stromal cells in supporting endothelial cell functions: Therapeutic implications for critical limb ischemia. *Cell Transplant.* 2010, 19, 1425–1437. [CrossRef]
 60. Song, Y.; Zhang, T.J.; Li, Y.; Gao, Y. Mesenchymal Stem Cells Decrease M1/M2 Ratio and Alleviate Inflammation to Improve Limb Ischemia in Mice. *Med. Sci. Monit.* 2020, 26, e923287. [CrossRef]
 61. Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A.; Silver, M.; van der Zee, R.; Li, T.; Witzenbichler, B.; Schattteman, G.; Isner, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275, 964–967. [CrossRef]
 62. Patel J.; Donovan, P.; Khosrotehrani, K. Concise Review: Functional Definition of Endothelial Progenitor Cells: A Molecular Perspective. *Stem Cells Transl. Med.* 2016, 5, 1302–1306. [CrossRef]
 63. Edwards, N.; Langford-Smith, A.W.W.; Wilkinson, F.L.; Alexander, M.Y. Endothelial Progenitor Cells: New Targets for Therapeutics for Inflammatory Conditions with High Cardiovascular Risk. *Front. Med.* 2018, 5, 200. [CrossRef] [PubMed]
 64. Chopra, H.H.M.K.; Kwong, D.L.; Zhang, C.F.; Pow, E.H.N. Insights into Endothelial Progenitor Cells: Origin, Classification, Potentials, and prospects. *Stem. Cell Int.* 2018, 2018, 24. [CrossRef]
 65. Medina, R.J.; Barber, C.L.; Sabatier, F.; Dignat-George, F.; Melero-Martin, J.M.; Khosrotehrani, K.; Ohneda, O.; Randi, A.M.; Chan, J.K.Y.; Yamaguchi, T.; et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem. Cells Transl. Med.* 2017, 6, 1316–1320. [CrossRef]
 66. Le Ricousse-Roussanne, S.; Barateau, V.; Contreres, J.O.; Boval, B.; Kraus-Berthier, L.; Tobelem, G. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from

- human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovasc. Res.* 2004, 62, 176–184. [CrossRef]
67. Fowkes, F.G.; Aboyans, V.; Fowkes, F.J.; McDermott, M.M.; Sampson, U.K.; Criqui, M.H. Peripheral artery disease: Epidemiology and global perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* 2017, 14, 156–170. [CrossRef] [PubMed]
 68. Ratajczak, M.Z.; Zuba-Surma, E.K.; Machalinski, B.; Ratajczak, J.; Kucia, M. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells: Purification from adult organs, characterization, and biological significance. *Stem. Cell Rev.* 2008, 4, 89–99. [CrossRef] [PubMed]
 69. Walter, D.H.; Krankenberg, H.; Balzer, J.O.; Kalka, C.; Baumgartner, I.; Schluter, M.; Tonn, T.; Seeger, F.; Dimmeler, S.; Lindhoff-Last, E.; et al. Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: A randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA). *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2011, 4, 26–37. [CrossRef]
 70. Matoba, S.; Tatsumi, T.; Murohara, T.; Imaizumi, T.; Katsuda, Y.; Ito, M.; Saito, Y.; Uemura, S.; Suzuki, H.; Fukumoto, S.; et al. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am. Heart J.* 2008, 156, 1010–1018. [CrossRef] [PubMed]
 71. Amann, B.; Luedemann, C.; Ratei, R.; Schmidt-Lucke, J.A. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant.* 2009, 18, 371–380. [CrossRef]
 72. Guo, J.; Guo, L.; Cui, S.; Tong, Z.; Dardik, A.; Gu, Y. Autologous bone marrow-derived mononuclear cell therapy in Chinese patients with critical limb ischemia due to thromboangiitis obliterans: 10-year results. *Stem. Cell Res. Ther.* 2018, 9, 43. [CrossRef]
 73. Ruiz-Salmeron, R.; de la Cuesta-Diaz, A.; Constantino-Bermejo, M.; Perez-Camacho, I.; Marcos-Sanchez, F.; Hmadcha, A.; Soria, B. Angiographic demonstration of neoangiogenesis after intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischemia. *Cell Transplant.* 2011, 20, 1629–1639. [CrossRef] [PubMed]
 74. Huang, P.; Li, S.; Han, M.; Xiao, Z.; Yang, R.; Han, Z.C. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes. Care* 2005, 28, 2155–2160. [CrossRef] [PubMed]
 75. Mohammadzadeh, L.; Samedanifard, S.H.; Keshavarzi, A.; Alimoghaddam, K.; Larijani, B.; Ghavamzadeh, A.; Ahmadi, A.S.; Shojaeifard, A.; Ostadali, M.R.; Sharifi, A.M.; et al. Therapeutic outcomes of transplanting autologous granulocyte colony-stimulating factor-mobilised peripheral mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischaemia. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2013, 121, 48–53. [CrossRef] [PubMed]

76. Ozturk, A.; Kucukardali, Y.; Tangi, F.; Eriksi, A.; Uzun, G.; Bashekim, C.; Sen, H.; Terekeci, H.; Narin, Y.; Ozyurt, M.; et al. Therapeutical potential of autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation in patients with type 2 diabetic critical limb ischemia. *J. Diabetes Complicat.* 2012, 26, 29–33. [CrossRef] [PubMed]
77. Dubsky, M.; Jirkovska, A.; Bem, R.; Fejfarova, V.; Pagacova, L.; Sixta, B.; Varga, M.; Langkramer, S.; Sykova, E.; Jude, E.B. Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2013, 29, 369–376. [CrossRef] [PubMed]
78. Tateishi-Yuyama, E.; Matsubara, H.; Murohara, T.; Ikeda, U.; Shintani, S.; Masaki, H.; Amano, K.; Kishimoto, Y.; Yoshimoto, K.; Akashi, H.; 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, 427–435. [CrossRef]
79. Arai, M.; Misao, Y.; Nagai, H.; Kawasaki, M.; Nagashima, K.; Suzuki, K.; Tsuchiya, K.; Otsuka, S.; Uno, Y.; Takemura, G.; et al. Granulocyte colony-stimulating factor: A noninvasive regeneration therapy for treating atherosclerotic peripheral artery disease. *Circ. J.* 2006, 70, 1093–1098. [CrossRef] [PubMed]
80. Huang, P.P.; Yang, X.F.; Li, S.Z.; Wen, J.C.; Zhang, Y.; Han, Z.C. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb. Haemost.* 2007, 98, 1335–1342. [CrossRef] [PubMed]
81. Li, M.; Zhou, H.; Jin, X.; Wang, M.; Zhang, S.; Xu, L. Autologous bone marrow mononuclear cells transplant in patients with critical leg ischemia: Preliminary clinical results. *Exp. Clin. Transplant* 2013, 11, 435–439. [CrossRef]
82. Teraa, M.; Sprengers, R.W.; Schutgens, R.E.; Slaper-Cortenbach, I.C.; van der Graaf, Y.; Algra, A.; van der Tweel, I.; Doevendans, P.A.; Mali, W.P.; Moll, F.L.; et al. Effect of repetitive intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia: The randomized, double-blind, placebo-controlled Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial Supplementation (JUVENTAS) trial. *Circulation* 2015, 131, 851–860.
83. Pignon, B.; Sevestre, M.A.; Kanagaratnam, L.; Pernod, G.; Stephan, D.; Emmerich, J.; Clement, C.; Sarlon, G.; Boulon, C.; Tournois, C.; et al. Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Implantation and Its Impact on the Outcome of Patients With Critical Limb Ischemia- Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Circ. J.* 2017, 81, 1713–1720. [CrossRef] [PubMed]
84. Lu, D.; Chen, B.; Liang, Z.; Deng, W.; Jiang, Y.; Li, S.; Xu, J.; Wu, Q.; Zhang, Z.; Xie, B.; et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res. Clin.*

- Pract. 2011, 92, 26–36. [CrossRef]
85. Dash, N.R.; Dash, S.N.; Routray, P.; Mohapatra, S.; Mohapatra, P.C. Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res.* 2009, 12, 359–366. [CrossRef] [PubMed]
 86. Gupta, P.K.; Chullikana, A.; Parakh, R.; Desai, S.; Das, A.; Gottipamula, S.; Krishnamurthy, S.; Anthony, N.; Pherwani, A.; Majumdar, A.S. 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. [CrossRef]
 87. Szabo, G.V.; Kovesd, Z.; Cserepes, J.; Daroczy, J.; Belkin, M.; Acsady, G. Peripheral blood-derived autologous stem cell therapy for the treatment of patients with late-stage peripheral artery disease—results of the short- and long-term follow-up. *Cytotherapy* 2013, 15, 1245–1252. [CrossRef]
 88. Raval, A.N.; Schmuck, E.G.; Tefera, G.; Leitzke, C.; Ark, C.V.; Hei, D.; Centanni, J.M.; de Silva, R.; Koch, J.; Chappell, R.G.; et al. Bilateral administration of autologous CD133+ cells in ambulatory patients with refractory critical limb ischemia: Lessons learned from a pilot randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Cytotherapy* 2014, 16, 1720–1732. [CrossRef] [PubMed]
 89. Lara-Hernandez, R.; Lozano-Vilardell, P.; Blanes, P.; Torreguitart-Mirada, N.; Galmes, A.; Besalduch, J. Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia. *Ann. Vasc. Surg.* 2010, 24, 287–294. [CrossRef] [PubMed]
 90. Kinoshita, M.; Fujita, Y.; Katayama, M.; Baba, R.; Shibakawa, M.; Yoshikawa, K.; Katakami, N.; Furukawa, Y.; Tsukie, T.; Nagano, T.; et al. Long-term clinical outcome after intramuscular transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34 positive cells in patients with critical limb ischemia. *Atherosclerosis* 2012, 224, 440–445. [CrossRef]
 91. Dong, Z.; Chen, B.; Fu, W.; Wang, Y.; Guo, D.; Wei, Z.; Xu, X.; Mendelsohn, F.O. Transplantation of purified CD34+ cells in the treatment of critical limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* 2013, 58, 404–411 e3. [CrossRef]
 92. Fujita, Y.; Kinoshita, M.; Furukawa, Y.; Nagano, T.; Hashimoto, H.; Hirami, Y.; Kurimoto, Y.; Arakawa, K.; Yamazaki, K.; Okada, Y.; et al. Phase II clinical trial of CD34+ cell therapy to explore endpoint selection and timing in patients with critical limb ischemia. *Circ. J.* 2014, 78, 490–501. [CrossRef] [PubMed]
 93. Powell, R.J.; Marston, W.A.; Berceci, S.A.; Guzman, R.; Henry, T.D.; Longcore, A.T.; Stern, T.P.; Watling, S.; Bartel, R.L. Cellular therapy with Ixmyelocel-T to treat critical limb ischemia: The randomized, double-blind, placebo-controlled RESTORE-CLI trial. *Mol. Ther.* 2012, 20, 1280–1286. [CrossRef]
 94. Losordo, D.W.; Kibbe, M.R.; Mendelsohn, F.; Marston, W.; Driver, V.R.; Sharafuddin, M.; Teodorescu, V.; Wiechmann, B.N.; Thompson, C.; Kraiss, L.; et al. A randomized, controlled pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical

- limb ischemia. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2012, 5, 821–830. [CrossRef]
95. Liotta, F.; Annunziato, F.; Castellani, S.; Boddi, M.; Alterini, B.; Castellini, G.; Maz-zanti, B.; Cosmi, L.; Acquafresca, M.; Bartalesi, F.; et al. Therapeutic Efficacy of Autologous Non-Mobilized Enriched Circulating Endothelial Progenitors in Patients With Critical Limb Ischemia- The SCelta Trial. *Circ. J.* 2018, 82, 1688–1698. [CrossRef]
 96. Fang, G.; Jiang, X.; Fang, Y.; Pan, T.; Liu, H.; Ren, B.; Wei, Z.; Gu, S.; Chen, B.; Ji-ang, J.; et al. Autologous peripheral blood-derived stem cells transplantation for treatment of no-option angiiitis-induced critical limb ischemia: 10-year man-agement experience. *Stem. Cell Res. Ther.* 2020, 11, 458. [CrossRef] [PubMed]
 97. Sharma, S.; Pandey, N.N.; Sinha, M.; Kumar, S.; Jagia, P.; Gulati, G.S.; Gond, K.; Mohanty, S.; Bhargava, B. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Tri-al to Evaluate Safety and Therapeutic Efficacy of Angiogenesis Induced by In-traarterial Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells in Patients with Severe Peripheral Arterial Disease. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 2021, 32, 157–163. [CrossRef] [PubMed]
 98. De Angelis, B.; Gentile, P.; Orlandi, F.; Bocchini, I.; Di Pasquali, C.; Agovino, A.; Gizzi, C.; Patrizi, F.; Scioli, M.G.; Orlandi, A.; et al. Limb rescue: A new autolo-gous-peripheral blood mononuclear cells technology in critical limb ischemia and chronic ulcers. *Tissue. Eng. Part C Methods* 2015, 21, 423–435. [CrossRef] [PubMed]
 99. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–228.
 100. Miyazaki T, Kitagawa Y, Toriyama K, Kobori M, Torii S. Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential of mesenchymal differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue. *Differentiation* 2005;73:69–78.
 101. Murohara T. Autologous adipose tissue as a new source of progenitor cells for therapeutic angiogenesis. *J Cardiol* 2009;53:155–163.
 102. Murohara T, Kondo K. Therapeutic angiogenesis with adipose tissue-derived regenerative cells. In: Higashi Y, Murohara T, editors. *Therapeutic Angiogenesis*. Singapore: Springer; 2016. pp. 67–79.
 103. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic fac-tors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;109:1292–1298.
 104. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tis-sue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2542–2547.
 105. Kondo K, Shintani S, Shibata R, et al. Implantation of adipose-derived regener-ative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:61–66.
 106. Miranville A, Heesch C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Im-provement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived

- stem cells. *Circulation* 2004;110:349–355.
107. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109:656–663.
 108. Moon MH, Kim SY, Kim YJ, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2006;17:279–290.
 109. Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T, Nagai R. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci* 2007;80:559–565.
 110. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, et al. IFATS collection: human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells* 2009;27:230–237.
 111. Takahashi M. Adipose tissue: an alternative source for therapeutic angiogenesis. *Circ J* 2012;76:1597–1598.
 112. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24:150–154.
 113. Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cytotherapy* 2007;9:738–745.
 114. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008;102:77–85.
 115. Zannettino AC, Paton S, Arthur A, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 2008;214:413–421.
 116. Amos PJ, Shang H, Bailey AM, Taylor A, Katz AJ, Peirce SM. IFATS collection: the role of human adipose-derived stromal cells in inflammatory microvascular remodeling and evidence of a perivascular phenotype. *Stem Cells* 2008;26:2682–2690.
 117. Benoit, E.; O'Donnell, T.F.; Patel, A.N. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: A systematic review. *Cell Transplant*. 2013, 22, 545–562. [CrossRef]
 118. Zou, H.; Otani, A.; Oishi, A.; Yodoi, Y.; Kameda, T.; Kojima, H.; Yoshimura, N. Bone marrow-derived cells are differentially involved in pathological and physiological retinal angiogenesis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010, 391, 1268–1273. [CrossRef]
 119. Li Calzi, S.; Neu, M.B.; Shaw, L.C.; Kielczewski, J.L.; Moldovan, N.I.; Grant, M.B. EPCs and pathological angiogenesis: When good cells go bad. *Microvasc. Res*. 2010, 79, 207–216. [CrossRef]
 120. Lyden, D.; Hattori, K.; Dias, S.; Costa, C.; Blaikie, P.; Butros, L.; Chadburn, A.; Heissig, B.; Marks, W.; Witte, L.; et al. Impaired recruitment of bone-marrow-de-

- rived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 2001, 7, 1194–1201. [CrossRef] [PubMed]
121. Gao, D.; Nolan, D.; McDonnell, K.; Vahdat, L.; Benezra, R.; Altorki, N.; Mittal, V. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 2009, 1796, 33–40. [CrossRef] [PubMed]
 122. Wickersheim, A.; Kerber, M.; de Miguel, L.S.; Plate, K.H.; Machein, M.R. Endothelial progenitor cells do not contribute to tumor endothelium in primary and metastatic tumors. *Int. J. Cancer* 2009, 125, 1771–1777. [CrossRef] [PubMed]
 123. Frantisek Jaluvka, Peter Ihnat, Juraj Madaric, Adela Vrtkova, Jaroslav Janosek and Vaclav Prochazka Current Status of Cell-Based Therapy in Patients with Critical Limb Ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8999.
 124. Toyoaki Murohara. Therapeutic Angiogenesis with Somatic Stem Cell Transplantation *Korean Circ J.* 2020 Jan;50 (1):12–21. English. Published online Oct 08, 2019. <https://doi.org/10.4070/kcj.2019.0288>
 125. Beltran-Camacho, L.; Jimenez-Palomares, M.; Rojas-Torres, M.; Sanchez-Gomar, I.; Rosal-Vela, A.; Eslava-Alcon, S.; Perez-Segura, M.C.; Serrano, A.; Antequera-Gonzalez, B.; Alonso-Pinero, J.A.; et al. Identification of the initial molecular changes in response to circulating angiogenic cells-mediated therapy in critical limb ischemia. *Stem. Cell. Res. Ther.* 2020, 11, 106. [CrossRef]
 126. Lucía Beltrán-Camacho, Marta Rojas-Torres, Ma Carmen Durán-Ruiz. Current Status of Angiogenic Cell Therapy and Related Strategies Applied in Critical Limb Ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2335. <https://doi.org/10.3390/ijms22052335>
 127. Літвінова Н.Ю., Черняк В.А., Мішалов В.Г. Дизайн дослідження застосування генної, клітинної терапії для лікування хворих із нереконструктабельною ХКІНК. XIII Міжнародна науково-практична конференція “Сучасні виклики і актуальні проблеми науки, освіти та виробництва: міжгалузеві диспути” м. Київ, 26 лютого 2021 року. С. 137–147.
 128. Літвінова Н.Ю., Черняк В.А., Кефелі-Яновська О.І., Дубенко Д.Є. Методика лікування хворих із нереконструктабельною хронічною критичною ішемією нижніх кінцівок із застосуванням аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин. “Серце і судини” №1(65), 2019, С.5–12.
 129. Літвінова Н.Ю., Черняк В.А., Кефелі-Яновська О.І., Дубенко Д.Є. Трансплантація аутологічних стовбурових тканин, виділених із жирової тканини в комплексному лікуванні хронічної ішемії нижніх кінцівок Тези Матеріали XXIV зїзду хірургів України 26–28 вересня, м. Київ. 2018. С. 360.

Додатки

7.1. Шкала градації доказовості та сили рекомендацій

Рівні доказовості первинних даних	
1++	Високоякісний метааналіз, систематичний огляд рандомізованих клінічних досліджень або рандомізоване клінічне дослідження з дуже низьким ризиком систематичної помилки
1+	Добре проведений метааналіз, систематичний огляд рандомізованих клінічних досліджень або рандомізоване клінічне дослідження з низьким ризиком систематичної помилки
1-	Метааналіз, систематичний огляд рандомізованих клінічних досліджень або рандомізоване клінічне дослідження з високим ризиком систематичної помилки
2++	Високоякісний систематичний огляд досліджень, що мають структуру "випадок – контроль", і когортних досліджень. Високоякісні дослідження, що мають структуру "випадок – контроль", або когортні дослідження з низьким ризиком похибки, систематичних помилок або спотворень і високою ймовірністю того, що зв'язки є причинними
2+	Добре проведені дослідження, що мають структуру "випадок – контроль", або когортні з низьким ризиком похибки, систематичних помилок чи спотворень і допустимою ймовірністю того, що зв'язки є причинними

2-	Дослідження, що мають структуру "випадок – контроль", або когортні з високим ризиком похибки, систематичних помилок чи спотворень і значною ймовірністю того, що зв'язки не причинні
3	Неаналітичні дослідження, наприклад, повідомлення про випадок, ряд випадків
4	Думка експертів
Градація сили рекомендацій	
A	Щонайменше один метааналіз, систематичний огляд або рандомізоване клінічне дослідження, оцінений як 1++ і застосовний до цільової популяції; або систематичний огляд рандомізованих клінічних досліджень або сукупність відомостей в основному з досліджень 1+, прямо застосованих до цільової популяції і які мають узгоджувані результати
B	Сукупність доказів включає 2++ дослідження, прямо застосовані до цільової популяції, мають узгоджувані результати або результати досліджень з 1++ або 1+, що екстраполюються на цільову популяцію
C	Сукупність доказів включає 2+ дослідження, застосовані до цільової популяції, мають узгоджувані результати; або екстрапольовані докази з 2++ дослідженнями
D	Докази 3 або 4 рівнів доказовості; або екстрапольовані дані з 2+ досліджень
Експертна думка щодо правильної практики	
▼	Рекомендована краща практика з клінічного досвіду розробників клінічної настанови
Примітка	У разі відсутності доказів щодо окремих важливих клінічних питань з приводу очевидних аспектів медичної допомоги, що не оскаржуються, але потребують висвітлення в клінічній настанові, такі положення позначають значком ▼ як "Рекомендована краща практика з клінічного досвіду розробників клінічної настанови". Подібні положення не є альтернативою клінічних настанов, що ґрунтуються на доказах, і можуть наводитися тільки у разі крайньої потреби

7.2. Реферативна інформація щодо джерел походження та механізмів дії МСК

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) — це мультипотентні мезодермальні клітини. Характеризуються фібробластоподібною формою і здатністю адгезуватись на пластику. МСК, як правило, розташовуються у периваскулярній ніші, що дозволяє їм проявляти рухливість і легко мігрувати по системі кровообігу до пошкоджених тканин для їх підтримки та відновлення. Вони також мігрують по лімфатичній системі, що відіграє роль у відновленні під час запалення.

Джерела і походження МСК. МСК знаходяться майже в усіх органах і вважаються стратегічним запасом для заміни або відновлення пошкоджених тканин. Найчастіше мезенхімальні стовбурові клітини виділяють з кісткового мозку і жирової тканини. Груднина і гребінь клубової кістки — ключові джерела аспірації кісткового мозку для збору стовбурових клітин. Жирова тканина — це інше багате на МСК джерело клітин. Як правило, їх виділяють з підшкірної жирової тканини і з вісцерального жиру під час оперативних втручань, пов'язаних з лапаротомією або з ліпосакцією.

Міграція і хоумінг МСК. Хоумінг — це здатність мезенхімальних стовбурових клітин мігрувати у ніші до своєї вихідної тканини і лишатись там. МСК мігрують у зону пошкодження і диференціюються там у клітини пошкодженої тканини, вивільняють цитокіни і фактори росту, які пришвидшують відновлення і регенерацію тканини. У фізіологічних умовах міграція МСК — це організований процес, який контролюється сигналами з навколишніх ніш.

Трофічні властивості МСК. МСК розмножуються і диференціюються, постачаючи елементи строми, необхідні для підтримки й відновлення тканин та органів. У кістковому мозку МСК потрібні для росту, проліферації і диференціації гемопоетичних стовбу-

рових клітин (*HSCs*). Ці трофічні функції МСК опосередковуються клітинно-клітинною взаємодією, а також секрецією факторів росту та інших медіаторів. Трофічні властивості клітини визначаються її здатністю чинити непряму дію на клітини у безпосередній близькості шляхом секреції біоактивних молекул. Серед речовин, які секретують МСК, — такі цитокіни, як IL-6 і IL-37, фактори росту, включаючи фактор росту тромбоцитів, еритропоетин, макрофагальний колонієстимулюючий фактор, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор. Повідомлялось, що трофічні фактори підтримують краще приживлення і ефективність HSCs, які трансплантуються одночасно з МСК. Кондиціоноване середовище, в якому культивують МСК, прискорює загоєння і регенерацію тканин. Було виявлено, що фактори, вивільнені з мезенхімальних стовбурових клітин, сприяють нейрогенезу та ангиогенезу. Трофічний ефект МСК може досягатись також через вивільнення екстрацелюлярних везикул (екзосом), які діють як міжклітинні шатли та несуть у собі різноманітний секретомний вміст.

МСК та імуносупресія. Мезенхімальні стовбурові клітини мають важливі імуномодулюючі функції, за рахунок вивільнення паракринних факторів, таких як простагландин *E2* (*PGE2*), інтерлейкін 6 (*IL-6*), хемокіновий (*C-C motif*) ліганд 2 (*CCL-2*), *G-CSF*, кістковий морфогенетичний білок 4 (*BMP4*), *TGF- β* та екстрацелюлярні везикули. МСК експресують антигени *HLA*-класу I, але не експресують антигени *HLA*-класу II і не мають костимулюючих молекул *CD40*, *CD80* та *CD86*. Більш того, секретом МСК містить незліченну кількість протизапальних факторів, таких як *IL-10* та *TGF- β* . Також повідомлялося про вплив МСК на вроджену та адаптивну імунну систему. Наприклад, спільне культивування МСК з Т-лімфоцитами індукувало апоптоз Т-лімфоцитів. Така дія вважається одним з механізмів, за допомогою якого МСК проявляють свій імуносупресивний потенціал. Імуносупресивна дія МСК може бути досягнута також за допомогою багатьох інших механізмів, включаючи залучення імуносупресивних клітин, наприклад, *IL-10*-продукуючих дендритних клітин, В-клітин,

а також *CD4+* *CD25+* *FOXP3+* Т-регуляторних клітин. Крім того, МСК можуть пригнічувати виділення макрофагами *IL-6* та *TNF- α* у зв'язку із секрецією *PGE2* та індоламін-2,3-діоксигенази (*IDO*). Багаторівнева імуносупресивна дія МСК робить їх помічними для подолання імунного відторгнення органів після трансплантації.

Вплив МСК на запалення. Добре відомо, що МСК можуть взаємодіяти з імунними клітинами вродженої та адаптивної імунної системи. Ця взаємодія спричинена виділенням великої кількості біологічно активних речовин, таких як цитокіни, хемокіни і фактори росту. Згідно з дослідженнями, використання МСК при хронічному запаленні приводить до значного зниження таких прозапальних цитокінів, як *IL-6*, *TNF α* , і *CRP*. Мезенхімальні стовбурові клітини здатні регулювати запальний процес, у тому числі за рахунок приєднання до ділянки запалення.

Вплив МСК на ангіогенез. Використання МСК є перспективним щодо ангіогеної терапії для лікування пацієнтів з ішемічними та нейродегенеративними захворюваннями, загоєння ран, для лікування фіброзу тканин і органів.

Наукові дані свідчать, що анатомічне розташування МСК у периваскулярному просторі кровоносних судин розсіяне по всьому тілу. Така гістологічна локалізація свідчить про те, що МСК сприяють утворенню нових кровоносних судин *in vivo*. Наприклад, МСК можуть вивільняти фактори ангіогенезу і протеази, які полегшують формування судин та *in vitro* здатні підвищувати/підтримувати ангіогенез.

НОТАТКИ

Lined writing area consisting of 22 horizontal lines.

Наукове видання

Черняк Віктор Анатолійович
Літвінова Наталія Юріївна
Буцька Лідія Володимирівна та ін.

**ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З ВАЖКИМИ ФОРМАМИ
ІШЕМІЇ НИЖНІХ КІНЦІВОК АТЕРОСКЛЕРОТИЧНОГО
ГЕНЕЗУ АУТОЛОГІЧНИМИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ
СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ**

Методичні рекомендації

Упорядники видання:
Побережний В. І., Димніч В. І.

Підписано до друку 30.04.24. Формат 60×84/16.
Папір крейдований. Гарнітура Segoe UI.
Друк цифровий. Ум. друк. арк. 5,13. Зам. №. 3055.

Видавець ТОВ «ТВОРИ».
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців,
виготовлювачів і розповсюджувачів
видавничої продукції серія ДК No 6188 від 18.05.2018 р.
21027, м. Вінниця, вул. Келецька, 51а, прим. 143.
e-mail: info@tvoru.com.ua

Віддруковано з готових цифрових носіїв на замовлення
ТОВ "Академія медичного розвитку" (ФОП Дишлюк О. В.)