

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Курский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

**ГОРДОВ МАКСИМ ЮРЬЕВИЧ**

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук  
по специальности  
14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СТИМУЛЯЦИИ НЕОВАСКУЛОГЕНЕЗА ПРИ  
ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ  
КОНЕЧНОСТЕЙ**

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук,  
профессор Суковатых Б.С.

**Научный консультант:**  
доктор биологических наук  
Артюшкова Е.Б.

Курск - 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Применение методов непрямой реваскуляризации при критической ишемии конечностей.....	13
1.2. История развития моделей экспериментальной ишемии конечностей у лабораторных животных.....	16
1.3. Патологические механизмы нарушения микроциркуляции при критической ишемии конечностей.....	20
1.4. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей.....	25
1.5. Генно-инженерная стимуляция неоваскулогенеза.....	32
1.6. Биологические эффекты миелопептидов.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Материалы и методы клинического исследования.....	44
2.2. Общая характеристика объектов и методов экспериментального исследования.....	50
2.3. Моделирование экспериментальной критической ишемии конечности.....	53
2.4. Методика получения и введения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга.....	55
2.5. Обоснование доз исследуемого препарата.....	57
2.6. Оценка уровня перфузии тканей методом лазерной доплеровской флоуметрии.....	58
2.7. Методы морфологического и морфометрического исследования.....	59
2.8. Статистическая обработка результатов исследования.....	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	61
3.1. Результаты клинического исследования.....	61
3.2. Динамика клинических проявлений экспериментальной критической ишемии конечности.....	66
3.3. Результаты лечения экспериментальной критической ишемии	

конечностей по данным морфометрического исследования.....	68
3.4. Результаты лечения экспериментальной критической ишемии	
конечностей по данным гистологического исследования.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	94
ВЫВОДЫ.....	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	119
ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

## ВВЕДЕНИЕ

Критическая ишемия нижних конечностей (КИНК) встречается у 500–1000 чел. на 1 млн. жителей в год. Прогнозируется возрастание количества больных в связи с массовым распространением курения, ожирения, сахарного диабета, метаболического синдрома [154]. Результаты лечения остаются неудовлетворительными, в России ежегодно выполняется до 50 тыс. ампутаций нижних конечностей [89, 91]. Среди больных, страдающих облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, в последнее время наметилась четкая тенденция к увеличению числа пациентов с поражениями «путей оттока» и с конечной стадией развития атеросклероза – кальцинозом артериального русла [53, 177]. При этом в 15–20% случаев прямая реваскуляризация теряет шансы на успех, ишемия прогрессирует, возникает опасность потери конечности [85, 97].

Около 20-30% пациентов с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) относятся к «неоперабельным», имеют общее тяжелое соматическое состояние, что связано с дистальными или многоэтажными формами поражений сосудов [67, 68]. Выполнение сосудистых реконструкций у этих пациентов весьма ограничено в связи с высоким риском тромбозов зон реконструкции в ближайшем послеоперационном периоде [84]. Процент ранних послеоперационных тромбозов не имеет тенденции к снижению и колеблется в пределах 4-25% [23].

Непрямые методы реваскуляризации конечности также недостаточно эффективны и во многих случаях противопоказаны у пациентов с распространенными некротическими поражениями дистальных отделов конечностей [86]. Стимуляция периостального кровотока (реваскуляризирующая остеотрпанация - РОТ) и десимпатизация конечности (поясничная симпатэктомия – ПСЭК) не позволяют в полной мере компенсировать кровообращение пораженной конечности [1, 146].

Решить эту проблему невозможно без разработки новых, менее инвазивных способов лечения больных с окклюзирующими заболеваниями артерий нижних конечностей [90, 95].

С точки зрения объективной экспериментальной практики, оценка результатов доклинических исследований эффективности различных методов лечения КИНК оказалась крайне затруднительной, прежде всего из-за неадекватности моделей КИНК на лабораторных животных [41]. Недостатки существующих моделей экспериментальной ишемии конечности сводятся к сложности реализации и высокой стоимости модели, сохранению анатомического строения сосудистой системы конечности животного, а именно наличие артерии сафена – аналога глубокой артерии бедра человека [19, 75, 132, 187, 201]. Это в свою очередь ведет к образованию прямых анастомозов по *vasa vasorum* и отсутствию открытия коллатералей, наличию эффекта ишемического прекондиционирования.

Прорывом в поиске новых способов лечения ишемии конечностей стала разработка инновационных технологий терапевтического ангиогенеза – стимуляции роста кровеносных сосудов и коллатералей в зоне ишемии с помощью фармакологических и иных средств [116]. На основании анализа мировой литературы опубликован обзор принципов, фундаментальных концепций и возможностей генно-инженерных технологий стимуляции ангиогенеза, в котором раскрывается инновационное направление нового метода лечения больных с хроническими заболеваниями артерий нижних конечностей [21].

Следует подчеркнуть, что современные методики генно-инженерной стимуляции неоваскулогенеза являются не только эффективными, но и безопасными: не вызывают специфических осложнений, не способствуют возникновению онкологических заболеваний [24]. К сожалению, высокая стоимость отечественного фармакологического препарата «Неоваскулген» препятствует широкому применению генно-инженерных стимуляторов в клинической практике.

Интенсивное изучение клеточных механизмов ангиогенеза и выделение клеток-предшественников сосудистого эндотелия и ангиобластов позволила сначала в экспериментальных, а затем в клинических условиях для лечения ишемии тканей широко применять стволовые клетки, содержащиеся в моноклеарной фракции аутологичного костного мозга (МНФ) [152, 202].

К настоящему времени проведен ряд исследований с применением МНФ костного мозга. Прямые инъекции клеток МНФ в зону ишемии миокарда и в артерию, питающую зону повреждения, приводили к улучшению васкуляризации ишемизированного миокарда и частичному восстановлению метаболизма поврежденного миокарда. Эти данные косвенно могут свидетельствовать об активации репарационных процессов в зоне рубца. Прямых доказательств репарации миокарда при использовании МНФ не получено [153, 189, 190].

В отличие от сердца, в скелетных мышцах имплантированные клетки сохраняются существенно дольше [72]. Существенных различий в сохранности имплантированных клеток в нормальных и ишемизированных мышцах не обнаружено. Последнее обстоятельство может быть аргументом в пользу применения в клинической практике технологии введения стволовых клеток непосредственно в мышцы пораженных нижних конечностей [41].

В зарубежной литературе имеются единичные сообщения о клиническом применении моноклеарной фракции аутологичного костного мозга при лечении критической ишемии нижних конечностей [110, 122, 155, 190]. Стимуляция неоангиогенеза во всех исследованиях производилась путем множественной внутримышечной трансплантации клеток костного мозга в ишемизированные ткани. Основным недостатком при таком способе введения клеток костного мозга является отсутствие стимуляции развития коллатерального кровотока из зоны с достаточным кровоснабжением в дистальные ишемизированные участки. Развитие только неоваскулогенеза в ишемизированных тканях без достаточно развитого коллатерального кровотока

из проксимальных отделов конечности в дистальные не позволяет нивелировать экспериментальную критическую ишемию [183].

Однако выделение стволовых клеток из костного мозга является слишком затратным с экономической точки зрения. Кроме этого имеются фармакологические препараты из клеток костного мозга, которые в основном применяются как иммуностимуляторы при вторичных иммунодефицитных состояниях, а действие их на ишемизированную ткань не изучено. Одним из таких препаратов является миелопид – экстракт из костного мозга телят, который применяется при иммунодефицитных состояниях после хирургических операций, механических, термических и химических травмах [74, 166]. Критическую ишемию конечностей можно рассматривать как ишемическое повреждение тканей вследствие недостаточного поступления артериальной крови. Поэтому можно ожидать позитивного влияния препарата на течение критической ишемии конечностей.

В свете выше изложенного очевидна актуальность и необходимость дальнейших исследований в этой области.

#### **Цель исследования:**

Изучить влияние моноклеарной фракции аутологичного костного мозга, иммуностимулирующего препарата «Миелопид» и их комбинированного применения на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза при экспериментальной критической ишемии конечностей.

#### **Задачи исследования:**

1. Изучить результаты традиционной консервативной терапии без и в сочетании с реваскуляризирующей остеотрепанацией у больных с критической ишемией нижних конечностей.

2. Разработать модель экспериментальной критической ишемии конечности, позволяющей получить схожую патогномоничную картину ишемии конечности, соответствующую III-IV стадии ишемии по классификации Покровского-Фонтейна у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

3. Разработать способ лечения экспериментальной критической ишемии конечности мононуклеарными клетками аутологичного костного мозга

4. Изучить влияние на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга на примере лечения экспериментальной критической ишемии конечности.

5. Изучить влияние на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза препарата «Миелопид» при лечении экспериментальной критической ишемии конечности.

6. Изучить комбинированное применение мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга и препарата «Миелопид» при лечении экспериментальной критической ишемии конечности.

#### **Научная новизна исследования.**

Впервые разработана оригинальная модель экспериментальной критической ишемии конечности, позволяющая получить схожую патогномоничную картину ишемии конечности у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

Впервые разработан и патогенетически обоснован метод лечения экспериментальной критической ишемии конечности мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга, позволяющий стимулировать коллатеральное кровообращение и вызвать развитие неоваскулогенеза в ишемизированных тканях.

Впервые проведено комплексное изучение влияния на процессы микроциркуляции и неоваскулогенез мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга при лечении экспериментальной критической ишемии конечности.

Впервые проведено комплексное изучение ангиопротективных свойств иммуностимулирующего препарата «Миелопид», позволяющее рекомендовать его применение в клинической практике при лечении критической ишемии конечностей.



Впервые изучено влияние на процессы микроциркуляции и неоваскулогенез комбинированного применения моноклеарной фракцией аутологичного костного мозга и препарата «Миелопид» при лечении экспериментальной критической ишемии конечности.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Обоснована экспериментальная модель создания критической ишемии конечности, позволяющей воспроизвести у лабораторного животного схожую клиническую картину ишемии конечности как у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

Обоснована экспериментальная методика забора клеток костного мозга у лабораторных животных для лечения экспериментальной критической ишемии конечности.

Обоснована методика получения и введения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в ишемизированную конечность, позволяющая улучшать коллатеральное кровообращение и активизировать процессы неоваскулогенеза в ишемизированных тканях.

Разработанный экспериментальный способ введения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга может быть рекомендован для клинического применения у пациентов с критической ишемией нижних конечностей.

Доказаны ангиопротективные свойства препарата «Миелопид» при лечении экспериментальной критической ишемии конечности, которые выражаются в позитивном влиянием на микроциркуляцию и регенераторный процесс в ишемизированных тканях.

Доказано благоприятное влияние комбинированного применения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга и препарата «Миелопид» на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза при лечении экспериментальной критической ишемии.

## **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Разработанная модель создания критической ишемии конечности в эксперименте путем иссечения магистрального сосуда, включающего бедренную артерию, подколенную артерию и артерию сафена, позволяет получить схожую патогномичную картину ишемии конечности, соответствующую III–IV стадии ишемии по классификации Покровского-Фонтейна у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

2. Разработанный способ введения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в ишемизированную конечность из двух точек в зону ишемии и в зону с достаточным кровообращением позволяет не только способствовать неоваскулогенезу в ишемизированных тканях, но и активизировать коллатеральное кровообращение за счет резерва функционально незадействованных коллатеральных артерий и усиления притока крови из проксимальных отделов конечности в дистальные.

3. Иммуностимулирующий препарат «Миелопид» в дозировке 50 мкг/кг/сут способствует стимуляции неоваскулогенеза и позитивно влияет на процессы микроциркуляции при экспериментальной критической ишемии конечностей.

4. Комбинированное применение моноклеарной фракции аутологичного костного мозга и иммуностимулирующего препарата «Миелопид» позитивно влияет на течение экспериментальной критической ишемии конечностей за счет двукратного снижения сроков образования новой капиллярной сети.

## **Степень достоверности и апробация результатов диссертации.**

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры общей хирургии, кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, кафедры хирургических болезней факультета последипломного образования ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. Полученные результаты исследования внедрены в работу НИИ экспериментальной медицины ФГБОУ ВО КГМУ МЗ РФ.

Основные положения диссертационной работы были представлены на VI и IX Всероссийских научно-практических конференциях молодых ученых-медиков (Казань, 2012, 2015); VII Международной научной конференции молодых ученых-медиков (Курск, 2013); VIII Международной научной конференции молодых ученых-медиков (Воронеж, 2014); 80-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 80-летию КГМУ (Курск, 2015); X Юбилейной международной научно-практической конференции молодых ученых-медиков (Курск, 2016)

Результаты работы отмечены получением гранта в конференции «Роль инновационных предприятий в развитии региона», финал программы «Участник молодежного научно-практического конкурса, УМНИК-2015».

#### **Публикации результатов исследования.**

По материалам диссертации опубликованы 10 печатных работ, из них 5 в изданиях, рекомендуемых ВАК. По материалам диссертационной работы получены 2 патента на изобретение №2556606 от 10.07.2015г., №2559937 от 20.08.2015г.

#### **Личный вклад автора.**

Автор самостоятельно выполнял поиск и составление обзора литературы, планировал и проводил оперативные вмешательства на животных, выполнял забор биологических тканей. Автором лично проводились инструментальные исследования, регистрировались и обрабатывались, анализировались и обобщались полученные результаты. Автор самостоятельно проводил статистическую обработку и интерпретацию полученных данных, составлял таблицы, графики, иллюстрации.

#### **Соответствие диссертации паспорту специальности.**

Научные положения соответствуют формуле специальности 14.01.26 - «Сердечно-сосудистая хирургия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности – теоретическая, экспериментальная и клиническая разработка хирургических, в том числе и альтернативных, методов лечения патологии сердца и сосудов.

### **Структура и объем диссертации.**

Текст диссертации изложен на 144 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемых сокращений и указателя литературы, содержащего ссылки на отечественных (107) и зарубежных (95) литературных источников. Текст проиллюстрирован 23 таблицами и 33 рисунками, включающими диаграммы, схемы, микрофотографии.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Применение методов не прямой реваскуляризации при критической ишемии конечностей

Атеросклероз артерий инфраингвинальной зоны, по данным Н. Haimović (2010г.), в настоящее время занимает одно из первых мест в структуре сердечно-сосудистых заболеваний [91]. В России ежегодное число госпитализаций больных с КИНК составляет от 775 до 1067 случаев на 1 млн. населения [83].

К настоящему времени, ни у кого не вызывает сомнения, что основным способом улучшения гемодинамики в пораженной конечности у пациента с КИНК, является выполнение реконструктивной операции [12].

Несмотря на значительные успехи сосудистой хирургии, использование реконструктивных операций ограничено наличием сопутствующих заболеваний у 12 - 18,6% больных, их зачастую не выполняют при множественной и дистальной патологии артериального русла, и производят первичную ампутацию у 14,9 - 20% больных [4].

Неудовлетворительные результаты прямых реконструктивных операций при практически полном отсутствии «путей оттока» на голени привели к поиску путей реваскуляризации конечности, направленных на стимуляцию периферического кровообращения и микроциркуляции [32, 92]. Наряду с поясничной симпатэктомией (ПСЭК), находящейся в арсенале ангиохирургов уже 80 лет [80, 92], в настоящее время используются и реваскуляризирующая остеотрепанация (РОТ) [31, 82].

Операция РОТ рассчитана на активизацию костномозгового кровотока, раскрытие и улучшение функции параоссальных и мышечных коллатералей и показана больным с дистальной формой поражения артерий, когда ни одна реконструктивная операция не может быть выполнена. Относительно хорошие

результаты получены авторами у больных II Б и III стадиями заболевания [15, 31, 32].

Операция наиболее эффективна при дистальных и диффузных формах атеросклероза, если невозможно выполнение прямой реконструкции сосудов [15, 32]. Более того методика РОТ постоянно совершенствуется, и сейчас существует даже её лазерный аналог, получивший название лазерной остеотрепанации, дающий положительный эффект в 65,5% наблюдений [82].

В исследовании Староверова И. Н. (2014г.) оценены результаты комбинированного оперативного лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей [94]. Стимуляция путей «артериального оттока», имеющих высокое периферическое сопротивление, позволила автору добиться положительных результатов при выполнении профундопластики не только в ближайшем, но и в отдалённом послеоперационном периоде. По мнению автора, это связано с отсроченным эффектом стимулирующей РОТ, когда эффект нарастает к 1 – 5 году наблюдения [94].

В настоящее время не сформирована единая концепция на целесообразность выполнения поясничной симпатэктомии (ПСЭК). Однако авторы едины во мнении, что десимпатизация конечности оказывает положительное патогенетическое влияние на течение облитерирующего заболевания. Сообщения о ближайших и отдалённых результатах после ПСЭК разнообразны и по данным литературы сохранение конечности отмечено в 25-87% случаев [80, 92].

В ближайший послеоперационный период ПСЭК эффективна у 45% пациентов, а спустя 4 года она позволяет сохранить конечность лишь у 35% пациентов. Положительный эффект при проведении остеотрепанации наблюдается в 28% случаев, при 50% сохраненных конечностей спустя 4 года. Несколько лучшие результаты наблюдаются при сочетании обеих методик, спустя 4 года удается сохранить конечность более чем у 60% пациентов [39]. Сочетание методов непрямой реваскуляризации с реконструктивными

операциями (особенно в случае повторного их выполнения) также дает хороший терапевтический эффект [20, 92].

До настоящего времени не сложилось единого мнения о показаниях к применению ПСЭК. Травматичность, слабость передней брюшной стенки на стороне доступа и увеличение сроков госпитализации пациентов после выполнения ПСЭК открытым способом, останавливают большинство хирургов перед выполнением данного вмешательства [94].

Таким образом, методики не прямой реваскуляризации до настоящего времени не имеют чётких показаний к их клиническому применению. Прежде всего, это относится к обоснованию дифференцированного применения этих методик в зависимости от нозологической формы, стадии заболевания, локализации и распространённости патологического процесса. На практике отсутствие такой дифференциации приводит либо к ограниченности достигаемого лечебного эффекта, либо к развитию послеоперационных осложнений, купирование которых увеличивает продолжительность лечения, а в ряде случаев является фактором, ухудшающим состояние больного [6].

В связи с этим, применение подобных операций остается наиболее обсуждаемым и требует экспериментально обоснованного и рационального подхода к их выполнению, возможно в сочетании с другими видами лечения, а также с применением факторов, стимулирующих ангиогенез в ишемизированных тканях.

## **1.2. История развития моделей экспериментальной ишемии конечностей у лабораторных животных**

Грызуны, будь-то мыши или крысы, играют большую роль в изучении новых видов лекарств и создании медицинских препаратов. Исходя из данных Фонда биомедицинских исследований, около 95% лабораторных подопытных – крысы и мыши [101].

Одной из причин, по которым для исследований отдается предпочтение крысам, является то, что грызуны небольших размеров, их легко обустроить, они быстро адаптируются к новым условиям. Появление потомства происходит в краткие сроки, а их жизненный цикл от 2 до 3 лет, что дает возможность наблюдать за несколькими поколениями грызунов в достаточно короткий период. Немаловажную роль играет небольшая цена на грызунов. Другая причина в выборе грызунов для медицинских тестов состоит в том, что биологические и генетические характеристики очень напоминают людей. Как пишет представитель из Национального института здоровья Дженни Халиски: «Мыши и крысы – млекопитающие, которые очень похожи с человеком и поэтому идеально подходят для поиска нужных и важных ответов в разных исследовательских направлениях» [66].

Однако следует отметить, что, несмотря на схожесть в строении артериального русла, у крыс имеются некоторые отличия в сравнении с таковыми у человека. Наружная подвздошная артерия разделяется на срамно-тазовый ствол и бедренную артерию. Бедренная артерия является непосредственным продолжением наружной подвздошной артерии и проходит по медиальной поверхности бедра, переходя дистально в подколенную артерию. Кроме мелких ветвей, от бедренной артерии отходит довольно крупная артерия сафена (a. saphena), которая является аналогом глубокой бедренной артерии человека. Эта артерия кровоснабжает большую приводящую, полуперепончатую, полусухожильную и стройную мышцы и образует коленное сплетение. Около полусухожильной мышцы от артерии сафена отходят две



дистальные ветви, участвующие в кровоснабжении голени и стопы. Подколенная артерия, являющаяся продолжением бедренной артерии, дистально разделяется на переднюю и заднюю большеберцовые артерии, снабжающие кровью голень и стопу [69].

В литературе описано множество способов моделирования острой и хронической ишемии конечности. Так, Воронов Д.А. и соавт. использовали трехуровневую перевязку артериальной магистрали задней конечности крысы нерассасывающимся шовным материалом. При этом первую лигатуру накладывали на наружную подвздошную артерию, вторую – на общую бедренную артерию тотчас ниже паховой связки, третью – на подколенную артерию. Обязательное иссечение и удаление артерии между второй и третьей лигатурами. Кроме этого проводилось дополнительное наложение лигатуры на венозную магистраль задней конечности крысы (перевязка бедренной вены в средней трети) [19].

Недостатком данного метода является сохранение артерии сафена и ее коллатералей, что ведет к их физиологическому открытию в условиях сформировавшейся ишемии тканей, тем самым увеличению общего уровня микроциркуляции и реперфузии.

Петрищев Н.Н. и соавт. в своих исследованиях использовали модель фотохимического тромбоза бедренной артерии. Под наркозом (тиопентал натрия, 50 мг/кг, внутривенно) производили разрез длиной около 2 см на внутренней поверхности левого бедра животного. Участок бедренной вены освобождали от соединительной ткани, пунктировали и медленно вводили фотосенсибилизатор— бенгальский розовый А из расчета 1,7 мг на 100г веса в 1мл 0,9% раствора хлорида натрия [76]. Сразу после введения фотосенсибилизатора производили разрез длиной около 2 см на внутренней поверхности правого бедра животного. Участок бедренной артерии длиной около 4 мм освобождали от соединительной ткани и выделяли из сосудисто-нервного пучка. Под данный участок артерии подводили полоску непрозрачного черного пластика шириной 3 мм, изолируя тем самым вену и окружающие ткани

от облучения. Облучение проводили при помощи диодного лазера «DPSS-лазер» (Diode Pumpd Solid State Laser, Южная Корея) (длина волны — 532 нм, мощность— 60 мВт, площадь облучения — 1 мм<sup>2</sup>) в течение 30 минут. После прекращения облучения пластик убирали и ушивали рану. У всех животных через 15–20 минут после начала облучения а. femoralis на фоне введения бенгальского розового отмечалось снижение и последующее отсутствие кровотока, что свидетельствовало о тромбировании сосуда [76].

Существенным недостатком данной методики является сохранение анатомического строения сосудистой системы конечности лабораторного животного, что ведет к образованию прямых анастомозов по «vasa vasorum», тем самым развитию и компенсации ишемии более легкой степени.

Elmalı N. и соавт. в своем экспериментальном исследовании ишемию скелетной мышцы у крыс воспроизводили 4-х часовым наложением жгута на артерию, кровоснабжающую конечность, затем осуществляли 4-х и 8-и часовую реперфузию и оценивали степень ишемических и реперфузионных повреждений в икроножной и передней большеберцовой мышцах [132].

Авторы не учли наличие эффекта ишемического прекодиционирования, а именно его раннего этапа, длящегося около 2 часа с момента ишемического повреждения тканей. Данный эффект заключается в физиологическом снижении объема некротической зоны и активизации процессов восстановления, что в полной мере не позволяет оценить степень и эффективность возможной коррекционной терапии.

Waterman R.S. (University of Wisconsin-Madison School of Medicine and Public Health) в своей экспериментальной работе создавали ишемию задней конечности лабораторной крысы путем лигирования подвздошной артерии до паховой складки. Сосуды конечности, находящиеся дистальнее, не удалялись. Помимо этого, модель добавлялась нанесением 2-3 кожных ран небольших размеров (до 4-5 мм) [201].

Стоит отметить, что описанный выше подход практически полностью моделируют критическую ишемию нижних конечностей как и у человека.

Возможно его применение при изучении заживления трофических язв и разработки лечебно-диагностических алгоритмов. Однако, авторами также не был учтен эффект ишемического прекондиционирования и сохранность a.saphena, описанные ранее.

С точки зрения объективной экспериментальной практики, оценка результатов доклинических исследований фармакологической и клеточной терапии ишемии конечностей оказалась крайне затруднительной, прежде всего из-за неадекватности моделей ишемии на лабораторных животных [41]. Эксперименты в основном выполнены на моделях острого, полного нарушения кровотока по магистральным сосудам конечности (коагуляция, перевязка, иссечение и пр.). Имеются и другие негативные аспекты: использование грызунов молодой и взрослой популяции, тогда как пациенты с ХОЗАНК относятся к старшей возрастной категории, также они имеют ряд сопутствующей патологии. Из-за недостаточной продолжительности мониторинга остается неясным объем и терапевтический эффект тех или иных методов лечения экспериментальной ишемии [20, 25, 41].

Все перечисленные выше модели экспериментальной ишемии конечности имеют свои преимущества и недостатки. Стоит отметить, что существенным недостатком является то, что они в полном объеме не позволяют воспроизводить картину критической ишемии нижних конечностей, как у человека. Следовательно, актуальным является поиск и разработка новых способов моделирования экспериментальной ишемии конечности.

### **1.3. Патофизиологические механизмы нарушения микроциркуляции при критической ишемии конечностей**

Микрососудистое русло объединяет обменные микрососуды (капилляры), резистивные (артериолы, метартериолы, прекапилляры, прекапиллярные фнктеры) и отводящие емкостные (мелкие вены, посткапиллярные венулы) мышечносодержащие сосуды и шунты диаметром до 200 мкм [44, 87].

Капилляр – главный компонент микроциркуляторного русла, тесно связанный с окружающими тканями и осуществляющий большую часть обменных процессов, так называемый трансапиллярный обмен. Артериальная часть микрососудистого русла обеспечивает приток крови и его регулирование. Посткапиллярные и собирательные венулы – главный резервуар крови в организме, они способны активно сужаться или расширяться, обладают максимальной проницаемостью для плазменных белков. Значительное количество преобладания числа венул и вен над количеством артериол и артерий является адаптивным механизмом, с помощью которого кровь отводится из емкостных микрососудов в крупные вены [29, 45].

В системе микроциркуляции имеются артериовенулярные шунты, по которым артериальная кровь переводится в венозное русло, минуя капиллярное звено. Гемодинамическое значение этих шунтов определяется тем, что их диаметр приблизительно в 10 раз больше диаметра капилляров, а значит скорость тока крови в них также выше. Вместе с магистральным кровотоком артериовенулярные шунты обеспечивают в терминальном отделе сосудистого русла запас кинетической энергии, необходимой для поддержания кровотока [2, 3, 48].

В основе развития ишемии лежит снижение доставки кислорода и нарушение выведения продуктов клеточного метаболизма [65]. При ишемии имеет место сложная цепочка процессов, затрагивающих каждую органеллу и субклеточную систему в результате снижения эффективности образования аденозинтрифосфата (АТФ) [17, 96, 100]. Это приводит к изменению транспорта

ионов через плазматическую мембрану, нарушению синтеза белка и нуклеиновых кислот, прекращению окисления жирных кислот и изменению скорости глюкогенеза. В итоге активизируются аутолитические процессы, которые связаны с разными типами гидролаз, находящихся в различных клеточных структурах [50, 87].

В развитии ишемии можно выделить две фазы – обратимого повреждения и некроза. Фаза обратимого повреждения характеризуется тем, что клетка может восстановиться на фоне улучшения кровообращения. Если же преодолена «точка необратимых повреждений», изменения становятся необратимыми даже при восстановлении кровотока. Главная причина гибели клетки – снижение способности митохондрий к восстановлению [2, 3, 103].

При облитерирующем атеросклерозе сосудов нижних конечностей изменение тока крови по микрососудам носит вторичный характер и отражает последствия снижения интенсивности магистрального кровотока. Схема гемодинамических нарушений при критической ишемии конечностей представлена на рисунке 1 [87].

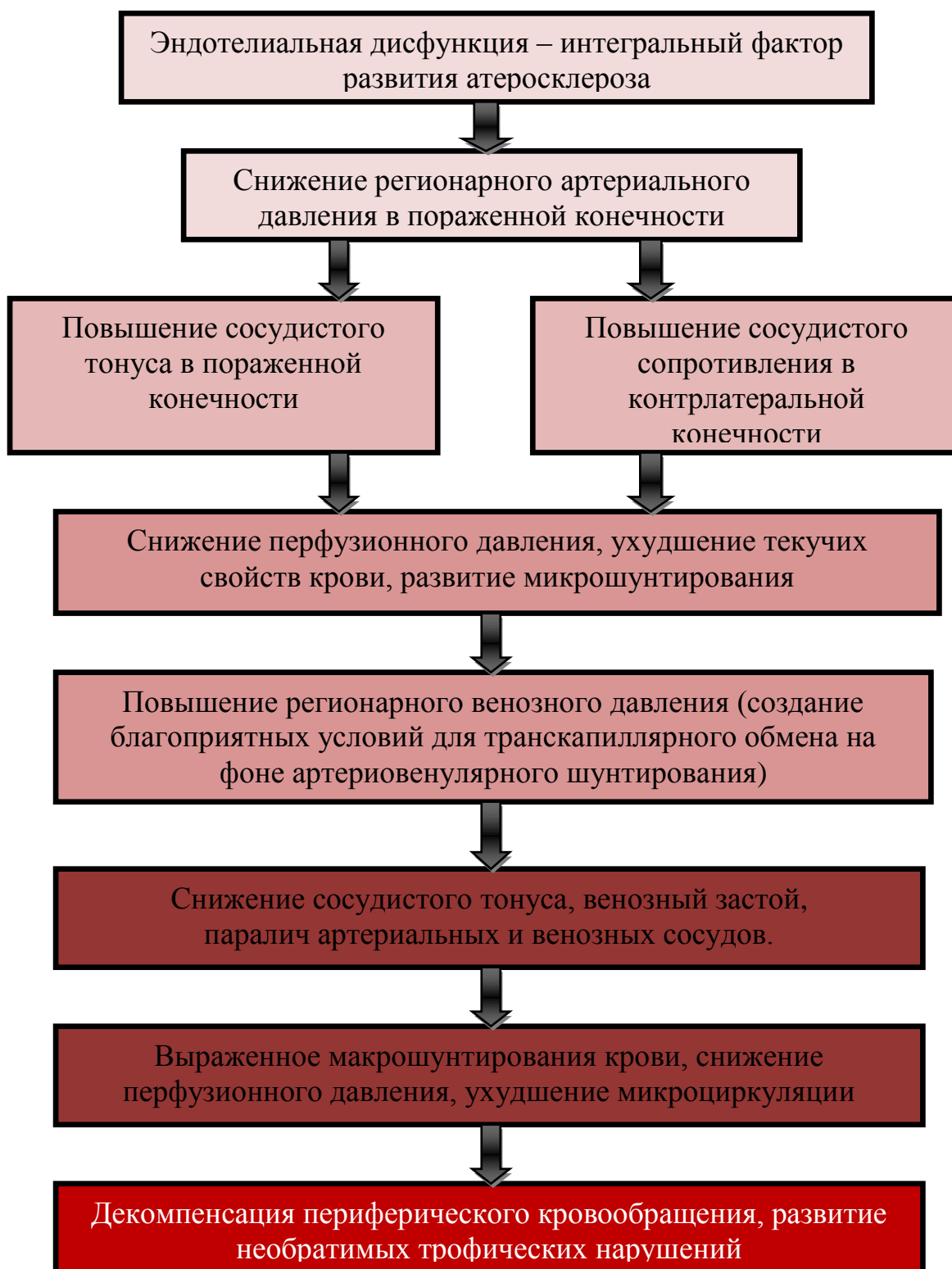


Рисунок 1 – Гемодинамические нарушения макро - и микроциркуляции при критической ишемии нижних конечностей.

В микрососудах скелетных мышц имеются две системы кровотока, позволяющие наиболее эффективно адаптировать процессы микроциркуляции к имеющимся потребностям того или иного участка в притоке крови [44, 87].

Капиллярный, или нутритивный кровоток – время проведение 1 мкл крови на расстояние до 10 мкм по этому пути достигает 6 часов. Это способствует полноценному выполнению обменной функции между тканями и элементами крови [16, 47].

Шунтирующий, или юкстакапиллярный кровоток – тот же объем крови через артериовенулярные анастомозы проходит всего за 2 секунды. Этот путь гемоциркуляции характеризуется низким сопротивлением, быстрым кровотоком и высокой внутрисосудистой проницаемостью эритроцитов. Юкстакапиллярный кровоток является физиологичным, носит приспособительный характер и существует наравне с капиллярным [41, 87].

Нарушение нормальных взаимоотношений между нутритивным и шунтирующим кровотоком на уровне микроциркуляции происходит при развитии артериальной недостаточности, в первую очередь вследствие снижения перфузионного давления. Ток крови в этих условиях осуществляется в большей степени по пути наименьшего сопротивления. При этом капиллярный обмен становится недостаточным – сначала только при больших физических нагрузках, а затем и в покое [29, 50].

Редукция капиллярного кровотока происходит по гемодинамическим причинам и в результате изменений текучих свойств крови (повышенная агрегация эритроцитов и тромбоцитов, повышенная жесткость эритроцитов, повышенная адгезия лейкоцитов – «лейкоцитарные пробки», гиперкоагуляция, угнетение фибринолиза, повышение фибриногена и гематокрита). При критической ишемии конечностей в большей степени начинает преобладать юкстакапиллярный кровоток с высокой скоростью тока крови. Это приводит к дефициту времени, необходимого для осуществления транскапиллярного обмена, вследствие чего развивается венозная гипертензия в ишемизированной конечности [3, 14, 87].

Изменение венозного оттока из пораженной конечности в условиях ХИНК играет важную роль с точки зрения компенсации уже имеющихся гемодинамических нарушений микроциркуляции. Венозная гипертензия создает благоприятные условия для осуществления транскапиллярного обмена при наличии артериовенулярного сброса крови. Прогрессивное ухудшение венозного оттока сначала проявляется повышением венозного тонуса, а затем повышенное венозное давление поддерживается венозной гиперволемией [51].

Так же наряду с феноменом артериовенулярного шунтирования немало важным является наличие ишемического отека голени. Его патофизиологическая роль заключается в отрицательном влиянии на микроциркуляцию из-за сдавления капилляров отечными тканями. С другой стороны создается экстравазальная компрессия, что позволяет поддержать резко нарушенную периферическую гемодинамику, способствуя повышению внутрисосудистого давления в артериальном и венозном русле [2, 51, 87].

Таким образом, нормальное функционирование сосудистой системы нижних конечностей определяется слаженной работой всех ее многочисленных составляющих. Взаимосвязь структурных макро- и микроэлементов сосудистой системы проявляется в том, что возникновение патологического процесса в любом отделе сосудистого русла может привести к дисфункции всей системы в целом. Понимание происходящих в периферических сосудах процессов, а также сути компенсаторных реакций, направленных на приспособление к новым условиям кровообращения, крайне важно для повышения адекватности выбора уже имеющихся, а также для разработки новых методов лечения.



#### 1.4. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей

КИНК в большинстве случаев обусловлена тяжелым и диффузным поражением периферических артерий конечности, часто сочетающимся с выраженным дефицитом кровотока на уровне микроциркуляторного русла [42, 117].

В условиях поражения дистального сегмента конечности и микроангиопатии, а так же при неэффективности ранее проведенной реваскуляризации, медикаментозное лечение остается единственным доступным вариантом лечения до ампутации [160, 169, 175, 178]. У пациентов с КИНК при отсутствии условий для «прямой» реваскуляризации, стандартная консервативная терапия малоэффективна. В ближайшие сроки от начала лечения, положительный результат отмечается лишь у половины пациентов, а 1/3 пациентов являются кандидатами на ампутацию [42, 46].

Однолетняя выживаемость больных перенесших ампутацию на уровне голени составляет около 30%. Смертность остается главной проблемой в этой популяции пациентов, 30-40% из них живут менее 5 лет, а при КИНК сочетающейся с язвами или гангреной процент летальности еще выше [66, 191]. Прогноз после ампутации так же не утешителен: ранняя послеоперационная летальность составляет около 5-10% после ампутации на уровне голени, и 15-20% после ампутации на уровне бедра. Из пациентов перенесших операцию, около 30% умирают в ближайшие 2 года. Повторная ампутация требуется у 1/3 больных. При том, что полная реабилитация может быть достигнута менее чем у половины из них [185].

В настоящее время продолжается поиск альтернативных путей реваскуляризации ишемизированных тканей. Одним из путей стимуляции неоваскулогенеза может быть применение клеточных и генных технологий [20, 21, 22].

В экспериментальных моделях КИНК для неоваскулогенеза были использованы различные типы клеток. Исследования показали, что в ангиогенезе

могут участвовать: моноклеарные клетки (МНК) костного мозга [116, 168], гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) [113], мобилизованные эндотелиальные прогениторные клетки [174], клетки стромы костного мозга [170], стволовые клетки, выделенные из жировой ткани [171].

Наиболее распространенными в плане практического применения, в том числе и при заболеваниях периферических артерий, представляются мезенхимальные и гемопоэтические стволовые клетки [173, 174].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – это мультипотентные клетки стромы различных тканей [127]. МСК обладают рядом особенностей влияния на иммунную систему, которые делают их предпочтительными для практического применения в лечении многих заболеваний [41]. Усиление реваскуляризации конечности после трансфузии МСК, полученных из костного мозга, в системный кровоток или после введения клеток непосредственно в мышцы неоднократно продемонстрировано на мышинной модели острой ишемии [149, 164, 186]. Внутриартериальная инфузия МСК, преинкубированных в 1% O<sub>2</sub>, или внутримышечная имплантация клеток, предобработанных 2% O<sub>2</sub>, усиливали реваскуляризацию ишемизированных задних лап крыс [194].

В последнее время были проведены исследования, которые показали, что образование кровеносных сосудов в постнатальном периоде обусловлено наличием клеток-предшественников эндотелиальных клеток (ЭК) в стенках сосудов [156, 200]. Однако есть все основания полагать, что эти клетки-предшественники могут сохраняться на протяжении всей жизни организма и принимать участие в обновлении сосудов [150, 171].

Неоваскулогенез во взрослом организме рассматривается как результат пролиферации, миграции и ремоделирования уже имеющихся зрелых ЭК [140]. В неоваскуляризации участвуют также предшественники эндотелиоцитов (ПЭ) CD34<sup>+</sup> фракции стволовых клеток периферической крови взрослых, после их мобилизации из костного мозга [172, 200].

Терапевтический эффект неоваскулогенеза представляется важной стратегией спасения тканей при КИНК. Быстрая реваскуляризация в

поврежденных (ишемизированных) и в регенерирующих органах чрезвычайно важна для восстановления функций. Сосудистая травма или ишемия тканей активирует каскад молекулярно-генетических реакций, главным результатом которых является мобилизация из костного мозга и других источников предшественников эндотелиальных клеток, обеспечивающих реваскуляризацию за счет образования новых сосудистых формаций [119, 196]. Проведенные исследования показали, что клетки костного мозга участвуют в неоваскулогенезе при заживлении ран [115, 126, 134, 159, 165, 192] и ишемии нижних конечностей [131, 176], эндотелизации сосудистых протезов [142], при атеросклерозе [145].

Эти исследования свидетельствуют, что во время повреждения сосудов или регенерации органа, происходит высвобождение цитокинов, которые опосредуют миграцию ПЭ и циркулирующих эндотелиальных клеток в зону неоваскулогенеза. Быстрое внедрение этих клеток ускоряет восстановление сосудов, позволяет избежать потенциальных сосудистых осложнений: вторичного тромбоза и гипоксии. В настоящее время, активно разрабатываются технологии получения сосудистых факторов, которые способны ускорять процессы реваскуляризации тканей [130]. Патологические изменения в сосудах и тканях, в большинстве случаев, обусловлены недостаточным количеством в зоне повреждения резервных ЭК, которые в норме способны самостоятельно влиять на васкуляризацию. Таким образом, появилась потребность в дополнительных факторах, способствующих восстановлению кровоснабжению [22, 135].

Резервные возможности мышц, как и других тканей, во многом определяются наличием так называемых молчащих, т.е. запасных, микрососудов и артериальных коллатералей, включающихся в кровоток при усилении нагрузки и репарации повреждений, что приводит в соответствие объем кровоснабжения потребностям тканей конечности. По-видимому, этот физиологический механизм работает и в патологических условиях, в частности при ишемии. Однако литературные данные на этот счет также отсутствуют [9, 41, 136].

Регенерация поврежденных мышечных волокон инициируется воспалением [190]. Однако известно, что стволовые клетки (СК) оказывают

противовоспалительное и локальное иммуносупрессивное действие, устраняя дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов в поврежденной ткани [10, 201]. С учетом этого факта, а также данных о том, что при КИНК имеют место подавление клеточного и дисбаланс гуморального звена иммунитета [57], в каждом конкретном случае применение СК для лечения КИНК должно быть аргументировано результатами исследований соотношения воспалительных и противовоспалительных (репаративных) процессов в пораженной конечности [52, 87]. На сегодняшний день такая методология не разработана ни в эксперименте, ни в клинической практике.

Окончательно не решены и вопросы безопасности применения СК. Так, известно, что увеличение их концентрации в препарате усиливает адгезивность клеток [172], а активация неоангиогенеза может иметь негативные последствия в виде васкуляризации атеросклеротических бляшек и риска тромбообразования [129].

По современным представлениям, клеточная репарация в тканях после их повреждения осуществляется двумя способами: встраиванием стволовых клеток в элементы тканевых структур (замещение клеток) и саногенетическим паракринным действием на микроокружение биологически активных молекул [105]. Возможность замещения погибших клеток введением в организм стволовых клеток извне пока не получила достаточного экспериментального подтверждения [5]. Гипотеза трофической поддержки ишемизированной ткани стволовыми клетками представляется достаточно обоснованной результатами многочисленных экспериментов *in vitro* и *in vivo*, свидетельствующих о способностях стволовых клеток к миграции в очаг поражения, пролиферации и выделению биологически активных молекул [8, 106].

Изучение механизмов проангиогенного действия стволовых клеток было расширено после открытия в моноклеарной фракции костного мозга относительно небольшой популяции эндотелиальных клеток-предшественников [135].

Полагают, что при структурной перестройке сосудистой сети в поврежденной ткани, в основе которой лежит развитие коллатеральных артериол и ветвление капилляров, возможно формирование микрососудов *de novo* с участием эндотелиальных клеток-предшественников, мигрирующих из костного мозга в периферический кровоток и далее зоны ишемии. Показано, что в ответ на ишемию увеличивается число циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников [134, 135].

В настоящее время одним из основных способов стимуляции неоангиогенеза является клеточная терапия стволовыми клетками костного мозга в силу их плюрипотентности [201]. Однако, введение в организм животного или человека мезенхимальных низкокодифференцированных стволовых клеток опасно в силу возможного развития онкологических заболеваний [22].

Клеточная терапия имеет ряд преимуществ перед генно- и пептидной терапией. Во-первых, своей физиологичностью, так как клетка обладает уникальным сбалансированным уровнем генной экспрессии и оптимальным для очага ишемии уровнем секреции факторов роста [10, 18]. Во-вторых, отсутствием при аутологичной трансплантации риска иммунных реакций, которые возможны при введении генных конструкций и рекомбинантных факторов роста [9, 18].

Кроме этого, способы выделения чистого пула стволовых клеток костного мозга слишком затратные. Известно, что стволовые клетки содержатся в МНФ [136, 137].

Введение мононуклеарных клеток в ишемизированные сегменты улучшает перфузию без индукции дополнительных рубцовых зон [43]. Многочисленные работы подтверждают возможность клеток костного мозга участвовать в восстановлении микроциркуляторного русла ишемизированного миокарда [122, 148, 157, 189, 193]. Интенсивный неоваскулогенез после имплантации костномозговых клеток обусловлен не только непосредственным участием МНФ, но и экспрессией этими клетками таких факторов ангиогенеза, как фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтина и других [149].

Свидетельства костномозгового происхождения кардиомиоцитов и клеток сосудов позволяют рассматривать костный мозг как источник материала для клеточной терапии. В красном костном мозге количество СК взрослого организма существенно выше, чем в периферической крови, но все же невелико [27]. Для увеличения содержания СК в аспирате костного мозга применяют методики концентрирования клеточных элементов — получение МНФ [114].

К настоящему времени проведен ряд исследований с применением МНФ костного мозга. Прямые инъекции клеток МНФ в зону ишемии миокарда и в артерию, питающую зону повреждения, приводили к улучшению васкуляризации ишемизированного миокарда и частичному восстановлению метаболизма поврежденного миокарда. Эти данные косвенно могут свидетельствовать об активации репарационных процессов в зоне рубца. Прямых доказательств репарации миокарда при использовании МНФ не получено [153].

Кинетика стволовых клеток, имплантированных в организм, напрямую связана с их терапевтической эффективностью [110]. Распределение клеток, меченных радиоактивным изотопом и введенных внутривенно, подробно исследовано в ряде экспериментальных работ [5, 41, 137, 181].

D. Ноу и соавт. (2005) показали, что через 1 час после имплантации меченных радиоактивным индием моноклеарных клеток костного мозга в миокард лабораторным животным с воспроизведенным инфарктом у них в сердце обнаруживали 11% введенных клеток, а при инфузии в коронарную артерию — только 2-3% [181].

В отличие от сердца, в скелетных мышцах имплантированные клетки сохраняются существенно дольше. Так, по данным М.В. Калашникова и А.В. Белявского (2009), сохранность мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани после введения их в икроножные мышцы мышей и крыс, составляла 50-70% через 1 сутки и 5-10% через 1 неделю [5]. Существенных различий в сохранности имплантированных клеток в нормальных и ишемизированных мышцах не обнаружено. Последнее обстоятельство может

быть аргументом в пользу применения в клинической практике технологии введения стволовых клеток непосредственно в мышцы пораженных нижних конечностей [41].

Выделение моноклеарной фракции клеток экономически более выгодно. Обладая мультипотентными свойствами, эти клетки могут способствовать замещению дефектов тканей и неоангиогенезу. Лимфоидные клетки этой фракции в силу своих морфогенетических особенностей способны принимать участие в процессах восстановительной регенерации поврежденных органов и тканей [136]. МНФ является более высоко дифференцированной, чем мезенхимальные стволовые клетки и, следовательно, менее склонной к развитию онкологического процесса. Это обуславливает востребованность дальнейшего изучения МНФ в клинической медицине.

## 1.5. Генно-инженерная стимуляции неоваскулогенеза

В арсенале сосудистых хирургов имеется несколько способов хирургической коррекции облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей, однако, около 20-30% пациентов с ХОЗАНК относятся к «неоперабельным», имеют общее тяжелое соматическое состояние, что связано с дистальными или многоэтажными формами поражений сосудов [7, 40, 67]. Выполнение сосудистых реконструкций у этих пациентов весьма ограничено в связи с высоким риском тромбозов зон реконструкции в ближайшем послеоперационном периоде. Процент ранних послеоперационных тромбозов не имеет тенденции к снижению и колеблется в пределах 4-25% [49, 99].

Реконструкции, выполненные на бедренно-подколенном сегменте, в 8-10 раз чаще сопровождаются ретромбозами, чем операции на аорто-подвздошном сегменте [47, 83]. Наиболее частой причиной ранних тромбозов мест реконструкции является неадекватная оценка дистального сосудистого русла [49, 97]. Часто единственно возможным лечебным мероприятием для подобных пациентов при критической ишемии становится ампутация [107].

Еще в 1948 году гипотетически предполагалось наличие химического «фактора Х», ответственного за развитие сосудов при диабетической пролиферативной ретинопатии [139, 163]. Считается, что концепция «терапевтического ангиогенеза» начала формироваться тотчас после выявления особенностей ангиогенеза в опухолях [141]. Обнаружив в них фактор ответственный за образование сосудов – «фактор роста сосудов опухоли» - tumor angiogenesis factor (TAF), J. Folkman (1971, 1972), первоначально предложил его блокировать для предотвращения развития сосудов в опухолях и их дальнейшей прогрессии. В 1983 г. в опухолях был описан еще один фактор, который, по-видимому, соответствовал TAF, и обеспечивал повышение проницаемости сосудистой стенки, в связи с чем и был назван «фактором проницаемости сосудов» - vascular permeability factor (VPF) [194].



Фактор VPF не связывали с физиологическим васкуло-, артерио- и ангиогенезом, предполагая, что он играет роль лишь в патологических процессах, однако, вскоре после описания «сосудистого эндотелиального фактора роста» - vascular endothelial growth factor (VEGF) было обнаружено, что VPF и VEGF кодируются одним геном и образуются в результате альтернативного сплайсинга [188, 199]. Сам VEGF впервые был охарактеризован в 1989 г. как гепарин-связывающий ангиогенный фактор роста, оказывающий высокоспецифическое митогенное воздействие на эндотелиальные клетки [197]. Важно отметить, что практически сразу было продемонстрировано, что фактор VEGF активирует пролиферацию и дифференцировку эндотелиоцитов синергично с фактором bFGF, однако сам по себе bFGF не вызывает подобных эффектов [180]. В дальнейшем это было использовано на практике разработчиками методик «терапевтического ангиогенеза», которые сочетали в одной конструкции гены нескольких проангиогенных факторов [70, 106].

Методология генной терапии состоит во внесении в клетку определенных генов, что обеспечивает синтез недостающих или экспрессирующихся белковых продуктов [143]. Существуют две основные группы методов доставки генов (нуклеиновых кислот) в клетки: вирусные и невирусные, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками [41]. Наиболее приемлемыми для клинического использования являются невирусные, в частности – плазмидные способы введения фрагментов нуклеиновых кислот. Существенным фактором, ограничивающим развитие этого направления, является низкая эффективность [62]. Однако на сегодняшний день разработаны технические подходы для доставки плазмидой дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в клетку: электропорация [189], микропорация [171] и др., позволяющие достичь 80–90% клеток. Обсуждаются возможности липосомального введения терапевтического генетического материала, а также генно-клеточной терапии – способа, трансплантации предварительно генно-модифицированных *in vitro* клеток [62].

Успехи доклинических испытаний, весьма однозначно показавших безопасность и эффективность применения фактора VEGF в генной терапии, позволили довольно быстро перейти к клиническим исследованиям [73].

Сотрудниками Института стволовых клеток человека (Москва) был разработан препарат «Неоваскулген», представляющий собой высокоочищенную сверхскрученную форму плазмиды pCMV-VEGF165 под контролем управляющего участка ДНК [108]. В ходе доклинического исследования (Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург, 2008) показано, что «Неоваскулоген» стимулирует пролиферацию клеток эндотелия человека, чем обеспечивает рост кровеносных сосудов (в эксперименте на мышах). Препарат относится к группе с низкой токсичностью, не обладает местно-раздражающим действием на кожу и аллергизирующими свойствами. Не установлено побочного влияния препарата на функциональную активность, морфологическую структуру внутренних органов экспериментальных животных. Не выявлено также эмбриотоксических, мутагенных и канцерогенных свойств [18, 72, 104]. Производится в виде стерильного лиофилизата (1,2 мг во флаконе). Препарат вводится согласно инструкции по применению — внутримышечно, 2 раза, по 1,2 мг с интервалом в 2 недели [37].

Как известно, существует традиционная настороженность по отношению к генным конструкциям, обладающим ангиогенными свойствами [81]. Это обусловлено тем, что одним из звеньев патогенеза ряда заболеваний (таких как, например, диабетическая ретинопатия) является индуцированная гипоксией активация VEGF-VEGFR-сигнальной системы [198].

Таким образом, подразумевается, что индукция ангиогенеза в ишемизированных тканях нижних конечностей может опосредованно стимулировать рост сосудов микроциркуляторного русла в тканях, отдаленных от места введения [198]. Однако ни в одном из ранее проведенных исследований не было показано, что применение ангиогенной терапии сопровождается увеличением частоты развития онкологических заболеваний, осложнений сахарного диабета или прогрессирования атеросклероза [161].

Результаты метаанализа, включившего более 1000 пациентов, показали одинаковую частоту развития заболеваний, в патогенезе которых существенную роль играет VEGF при применении геннотерапевтической конструкции и плацебо [151].

Результаты отсроченного наблюдения показали, что применение рl-VEGF165 в дозе 2,4 мг привело к достоверному, устойчивому улучшению функционального состояния больных. При этом терапевтический эффект от применения ангиогенной терапии в клинической группе нарастал в течение всего 3-летнего периода наблюдения с наиболее выраженным приростом в течение 1-го года. Напротив, применение стандартной терапии в группе контроля сопровождалось постепенным ухудшением функционального состояния больных, что выразилось снижением дистанции безболевой ходьбы к концу 3-го года на 27%. Таким образом, применение генной терапии в составе комплексного лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК) II—III стадии (по Покровскому—Фонтейну) позволило добиться достоверного клинического улучшения по сравнению со стандартной терапией и предотвратить прогрессирование ишемии [18, 73, 93].

Отсутствие достоверного изменения лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) в клинической группе на протяжении всего срока наблюдения, по-видимому, объясняется механизмом действия ангиогенного препарата. Применение рl-VEGF165, индуцируя рост и развитие сосудов микроциркуляторного русла, не приводит к восстановлению давления в магистральных артериях ввиду отсутствия воздействия непосредственно на причину его снижения — окклюзию. Несмотря на отсутствие улучшения показателей макрогемодинамики пораженной конечности, восстановление перфузии тканей привело к достоверному терапевтическому эффекту [72, 73]. Однако необходимо отметить, что в ряде других исследований, в частности с применением плазмиды с «геном фактора роста гепатоцитов» – hepatocyte growth factorHGF, были получены противоположные результаты — проведение ангиогенной терапии приводило к

улучшению функционального статуса, что коррелировало с достоверным улучшением ЛПИ [183].

На основании анализа мировой литературы опубликован обзор принципов, фундаментальных концепций и возможностей генно-инженерных технологий стимуляции ангиогенеза, в котором раскрывается инновационное направление нового метода лечения больных с хроническими заболеваниями артерий нижних конечностей [21]. Использование генных технологий как в комплексном консервативном лечении, так и в сочетании с оперативным лечением позволяет улучшить не только результаты прямых реконструктивных, но и непрямых реваскуляризирующих операций у больных с хронической ишемией нижних конечностей [93, 104, 105]. Следует подчеркнуть, что современные методики генно-инженерной стимуляции неоваскулогенеза являются не только эффективными, но и безопасными: не вызывают специфических осложнений, не способствуют возникновению онкологических заболеваний [24]. К сожалению, высокая стоимость отечественного фармакологического препарата «Неоваскулген» препятствует широкому применению генно-инженерных стимуляторов в клинической практике.

## 1.6. Биологические эффекты миелопептидов

Лечение КИНК представляет собой тяжелую задачу, решение которой позволяет не только сохранить пациенту конечность и улучшить качество его жизни, но и существенно продлить её срок [44, 111].

По Российскому консенсусу диагностики и лечения пациентов с КИНК (2002), основным принципом лечения на современном этапе является комплексный и индивидуальный подход, включающий: интенсивную консервативную терапию на предоперационном этапе; оперативное лечение (прямая или непрямая реваскуляризация, нестандартные и паллиативные вмешательства, ампутация); адекватное ведение послеоперационного периода; реабилитация больных, перенесших операции или ампутацию; диспансерное наблюдение, сроки которого совпадают с остаточной продолжительностью жизни больного [67, 68, 79, 124, 125].

Консервативная терапия является неотъемлемой частью комплексного лечения больных с КИНК, а предоперационная подготовка преследует цель создания благоприятных условий для выполнения дальнейших оперативных вмешательств и снижения послеоперационных осложнений [38, 98, 128]. В.А. Лазаренко с соавт. (2003) считают, что при невозможности оперативного вмешательства роль консервативной терапии становится основной [55].

Преобладающий в медикаментозном лечении до недавнего времени подход, направленный в основном на спазмолитическую терапию, сейчас имеет все меньшее применение, а при развитии КИНК вообще не показан [40, 45, 54].

Принцип медикаментозного лечения заключается в создании определенной концентрации препаратов в организме [13, 112, 133]. Предпочтение отдается препаратам, улучшающим реологические свойства крови, микроциркуляцию, нормализующим активность свертывающей системы крови, увеличивающим фибринолиз, способствующим уменьшению агрегации тромбоцитов [1, 120, 123, 138].

Инновационным направлением в ангиологии и сосудистой хирургии является стимуляция неоваскулогенеза в ишемизированных тканях [21]. Для этого используется как генные, так и клеточные технологии стимуляции ангиогенеза стволовыми клетками костного мозга [5].

Интенсивное изучение клеточных механизмов ангиогенеза и выделение клеток-предшественников сосудистого эндотелия и ангиобластов позволила сначала в экспериментальных, а затем в клинических условиях для лечения ишемии тканей широко применять стволовые клетки, содержащиеся в различных фракциях костного мозга [147].

Однако выделение стволовых клеток из костного мозга является слишком затратным с экономической точки зрения. В то же время имеются фармакологические препараты из клеток костного мозга, которые в основном применяются как иммуностимуляторы при вторичных иммунодефицитных состояниях, а действие их на ишемизированные ткани не изучено. Одним из таких препаратов является «Миелопид» – экстракт из костного мозга телят, который применяется при иммунодефицитных состояниях после хирургических операций, механических, термических и химических травмах [166].

Разработка препарата «Миелопид» началась в начале 70-х годов двадцатого столетия, после того как было обнаружено, что костный мозг продуцирует группу биорегуляторных пептидных медиаторов, названных миелопептидами [166]. Эти биологически активные медиаторы обладают способностью стимулировать различные звенья иммунного ответа, особенно гуморальный иммунитет [63]. В состав «Миелопида» входят шесть низкомолекулярных миелопептидов (МП) с молекулярной массой 500-3000 D. Каждый МП обладает определенным биологическим действием, совокупность которых и обуславливает его клинический эффект [78].

Таблица 1 – Структура и биологическая активность миелопептидов.

Название	Аминокислотная последовательность	Эффекты
МП-1	Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr	восстановление антителогенеза
МП-2	Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp	противоопухолевый иммунитет
МП-3	Leu-Val-Cys-Tyr-Pro-Gln	действие на моноцитарное звено
МП-4	Phe-Arg-Pro-Arg-Ile-Met-Thr-Pro	фактор клеточной дифференцировки, регулятор гемопоэза
МП-5	Val-Val-Tyr-Pro-Asp	фактор клеточной дифференцировки
МП-6	Val-Asp-Pro-Pro	фактор клеточной дифференцировки

Изучение функциональной активности костномозговой фракции, содержащей МП, в различных экспериментальных моделях выявило широкий спектр биологических активностей, которые условно можно разделить на три основных типа: иммунорегуляторную, дифференцировочную и нейротропную [11].

Однако, несмотря на структурное сходство, эти пептиды обладают различным спектром биологических эффектов (таблица 1) [77].

Миелопептид-1 (МП-1) восстанавливает нормальный баланс активности Т-хелперов и Т-супрессоров. Этот эффект пептида связан, по всей вероятности, со способностью МП-1 нормализовывать дисбаланс CD-4/CD-8 клеток, путем связывания его со специфическими рецепторами на поверхности Т-хелперов [10].

Миелопептид-2 (МП-2) подавляет пролиферацию злокачественных клеток и существенно снижает способность опухолевых клеток продуцировать токсические субстанции, подавляющие функциональную активность Т-лимфоцитов [88].

Миелопептид-3 (МП-3) стимулирует активность фагоцитарного звена иммунитета и, следовательно, повышает антиинфекционный иммунитет. МП-3

стимулирует макрофагальный фагоцитоз *in vitro* и *in vivo*, увеличивает экспрессию антигенов Ia на поверхности макрофагов, усиливает антигенпредставляющую функцию макрофагов и их цитотоксическую активность. Иммуотропные эффекты МП-3 лежат в основе его протективного и противобактериального действия при инфекционном заражении животных [59].

Миелопептид-4 (МП-4) оказывает влияние на дифференцировку гемопоэтических клеток, способствуя их более быстрому созреванию. МП-4 индуцирует появление зрелых моноцитов/макрофагов, усиливает фагоцитарную активность клеток лейкозной линии. МП-4 является эндогенным фактором клеточной дифференцировки, перспективным для использования в противолейкозной терапии [35].

Миелопептид-5 (МП-5) — обладает противовирусной активностью. МП-5 восстанавливает функциональную активность Т-лимфоцитов, подавленную вирусами, с помощью его специфического связывания со своей клеткой-мишенью CD4+-лимфоцитом [60].

Миелопептид-6 (МП-6) обладает эффектом клеточной дифференцировки. Клетками-мишенями для МП-6 являются бласты – предшественники клеток крови [28]. МП-6 запускает дифференцировку и созревание клеток лейкозных линий, что проявляется в экспрессии на поверхности дифференцировочных антигенов, снижении синтеза ДНК клетками при одновременном усилении синтеза белка, изменении морфологии и появлении зрелых клеточных форм, и снижении числа бластов [28, 64].

Поскольку МП действуют физиологично, эффективны в крайне низких дозировках и не обладают видовой специфичностью, в экспериментальную и клиническую практику введен иммуностимулятор «Миелопид» [74]. Иммунокорректирующие свойства этого препарата продемонстрированы в различных системах, связанных с нарушением функций иммунной системы [30].

Включение «Миелопида» в комплексную терапию хронических неспецифических заболеваний легких существенно улучшает клиническое состояние больных и значительно увеличивает продолжительность ремиссии (до



одного года и более у 78%). Применение «Миелопида» в комплексной терапии гнойно-воспалительных процессов позволяет добиться быстрой и полной санации очага инфекции и увеличивает эффективность действия антибиотиков. Так, у больных, перенесших различные операции на сердце, пневмония и нагноение раны с медиастинитом возникли в 15,5 и 18,9% случаев в контрольной группе, в опытной группе эти осложнения наблюдались у 6,7 и 10,8% соответственно. Следует отметить, что осложнения, развившиеся у больных, получавших «Миелопид», протекали на фоне менее выраженной интоксикации и лихорадки, умеренного лейкоцитоза и сопровождались незначительным гнойным отделяемым из раны. Клиническое улучшение у больных, получавших «Миелопид», наступало на 12-14-й день, у больных контрольной группы — на 17-21-й день после операции. «Миелопид» оказался также эффективным в комплексном лечении переломов нижней челюсти [61].

Иммунологическое исследование показало, что уже на первые-вторые сутки после операции у больных развивается выраженный иммунодефицит, при котором страдают практически все звенья иммунной системы. Проведение сразу после операции иммунотерапии с помощью миелопида приводило к значительному ускорению восстановления всех показателей иммунитета. Количество Т- и В-лимфоцитов и Т-хелперов у таких больных достигало нормальных значений уже на седьмые-восьмые сутки. Также происходило восстановление функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, определяемое по способности синтезировать интерлейкин-2 (ИЛ-2) и иммуноглобулины соответственно [33].

В исследовании Гавриловой Т.В. [34] на модели проникающего ранения глаза включение в терапию травмированных животных «Миелопида» нивелирует угнетение антителогенеза, вызванное введением препаратов стандартной терапии (глюкокортикоидов, нестероидных противовоспалительных средств, антибиотиков). Также уменьшает воспалительную инфильтрацию в месте травмы, снижает число нейтрофилов и эозинофилов в окологрунцовой зоне, увеличивает число плазматических клеток, что

способствует более быстрому формированию зрелых волокнистых структур и эпителизации роговицы [34].

Безусловно, в дальнейших исследованиях будут открыты новые свойства МП. Но уже сейчас можно утверждать, что они обладают уникальной физиологической ролью. Полифункциональность пептидов костномозгового происхождения не исключает их участия в неоваскулогенезе. Критическую ишемию конечностей можно рассматривать как ишемическое повреждение тканей конечностей вследствие недостаточного поступления артериальной крови. Воздействие на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза «Миелопида» изучены крайне ограниченно, поэтому можно ожидать позитивного влияния препарата на течение критической ишемии конечностей.

### **Резюме**

Проведя анализ отечественной и мировой литературы по вопросам методов не прямой ревазуляризации и стимуляции неоваскулогенеза при критической ишемии конечностей, необходимо выделить несколько существенных моментов.

Во-первых, проведенный многими авторами анализ результатов лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей показал неэффективность консервативной терапии и не прямой ревазуляризации (ПСЭК, РОТ) при невозможности выполнения реконструктивной операции.

Во-вторых, до настоящего времени не создано такой модели экспериментальной критической ишемии, которая позволяет полностью воспроизводить патогномичную картину критической ишемии как у пациентов с ХОЗАНК.

В-третьих, весьма ограниченно изучено влияние на процессы неоваскулогенеза и микроциркуляции субпопуляции мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга при лечении экспериментальной критической ишемии конечностей.

В-четвертых, остаются недостаточно изученными ангиопротективные свойства препарата «Миелопид», являющегося экстрактом из костного мозга телят, применяющегося при вторичных иммунодефицитных состояниях после травм и хирургических операций, а критическую ишемию конечностей можно рассматривать как ишемическое повреждение тканей вследствие недостаточного поступления артериальной крови.

В-пятых, необходимо продолжить разработку клеточных технологий лечения критической ишемии нижних конечностей у больных с ХОЗАНК, так как отечественные генно-инженерные стимуляторы неоангиогенеза имеют слишком высокую стоимость, что делает их недоступным для отечественного потребителя.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и методы клинического исследования

За период с 2014 по 2015 годы в условиях отделения сосудистой хирургии ОБУЗ КГКБ СМП г. Курска проведено комплексное обследование и лечение 40 пациентов с острыми артериальными тромбозами периферических артерий, тромбозами бедренно-подколенных шунтов, а также с критической ишемией III-IV стадии на почве облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей. Все пациенты являлись неоперабельными в виду дистального поражения артериального русла и невозможности выполнения реконструктивной операции. Из них 20 (50%) составили первую группу, которым проведено традиционное консервативное лечение, и 20 (50%) – вторую, которым на фоне консервативного лечения проведена операция ROT. Все пациенты были мужского пола.

Критерии включения пациентов:

- 1) больные с острыми артериальными тромбозами артерий голени и дистальных бедренно-подколенных шунтов на фоне их окклюзионно-стенотических поражений;
- 2) больные с критической ишемией нижних конечностей на почве ХОЗАНК с окклюзией артерий стопы и голени;
- 3) больные с диффузным поражением инфраингвинальных артерий (бедренной, подколенной, большеберцовых);
- 4) больные с поражением бедренно-подколенного сегмента в сочетании с острым периодом инфаркта миокарда и нарушением мозгового кровообращения.

Критерии исключения: распространенная влажная гангрена с явлениями эндотоксикоза.

Пациенты обеих групп по основным исходным параметрам значимо не отличались, что позволило в дальнейшем сравнивать результаты их лечения. Распределение пациентов по возрасту, длительности заболевания,

сопутствующей соматической патологии, характеру поражения артерий нижних конечностей и типу кровотока в них представлены в таблицах 2, 3 и 4.

Таблица 2 – Распределение больных по возрасту.

<b>Возраст</b>	<b>Консервативная терапия (n=20)</b>	<b>РОТ (n=20)</b>
45-59	4 (20%)	3 (15%)
60-75	12 (60%)	12 (60%)
76 и старше	4 (20%)	5 (25%)

Из таблицы 2 видно, что большинство больных (около 80-85%) в обеих группах относилось к группе пожилого и старческого возраста (60 лет и более).

Учитывая данные анамнеза заболевания, первую обращаемость в лечебное учреждение по данному заболеванию, средняя продолжительность заболевания представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Распределение больных по длительности заболевания.

<b>Длительность заболевания</b>	<b>Консервативная терапия (n=20)</b>		<b>РОТ (n=20)</b>	
	<b>Абс.</b>	<b>%</b>	<b>Абс.</b>	<b>%</b>
2-4 года	3	15	1	5
5-7 лет	11	55	4	20
8-10 лет	3	15	10	50
10 и более лет	3	15	5	25

Из таблицы 3 следует, что средняя длительность заболевания в первой группе составляет  $5,3 \pm 1,4$  года, во второй  $7,1 \pm 2,1$ .

У 100% пациентов во всех группах выявлена различная сопутствующая соматическая патология. При этом у одного и того же больного встречалось сочетание нескольких заболеваний (Таблица 4).

Таблица 4 – Распределение больных по сопутствующей соматической патологии.

Сопутствующая патология	Консервативная терапия (n=20)		РОТ (n=20)	
	Абс.	%	Абс.	%
Артериальная гипертензия	18	90	18	90
Ишемическая болезнь сердца	20	100	20	100
ХНЗЛ	5	25	7	35
Сахарный диабет	4	20	6	30
Церебральный атеросклероз	9	45	11	55

Как видно из таблицы 4, артериальной гипертензией страдали 36 пациентов (90%), ишемической болезнью сердца – 40 (100%), хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) – 12 (30%), сахарным диабетом – 10 (25%), церебральным атеросклерозом – 20 (50%).

Комплексное клиническое обследование в обеих группах проводилось стандартным образом. При детальном расспросе жалоб пациентов и сборе анамнеза выясняли длительность существования перемежающейся хромоты, дистанцию безболевого ходьбы, наличие явлений критической ишемии в анамнезе, локализацию и интенсивность настоящего болевого синдрома в покое, а также наличие жалоб по сопутствующей патологии. Объективное клиническое обследование пациентов выполняли путем пальпаторного определения пульсации магистральных артерий в типичных точках и аускультации брюшной аорты, подвздошных и бедренных артерий.

Всем группам пациентов выполнен рутинный клинический минимум лабораторных исследований, который включает: общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови с развернутой липидограммой, глюкоза крови и при необходимости суточный профиль гликемии, ЭКГ, флюорография или рентгенография органов грудной клетки.

Из инструментальных методов диагностики использовались: фотоплетизмография, реовазография, ультразвуковая доплерография с

определением ЛПИ и ультразвуковое ангиосканирование артерий нижних конечностей. Все инструментальные обследования в исследуемых группах выполнялись до и спустя 1 месяц после проведенного лечения.

Плетизмографическое и доплеровское исследование осуществляли на многофункциональной системе «ULTRA – PVD» (США) по стандартной методике.

При фотоплетизмографии для количественной оценки состояния микроциркуляторного кровообращения определяли величину фотоплетизмографического индекса (ФИ) при анализе полученной фотоплетизмограммы.

Показатель ЛПИ вычислялся как отношение систолического давления, измеренного на одной из берцовых артериях, к системному систолическому давлению на плечевой артерии той же конечности.

Реовазографию проводили на реоплетизмографе РПГ-4-02, подключенному к четырехканальному электрокардиографу. Степень нарушения кровообращения оценивали путем определения величины реовазографического индекса (РИ).

Ультразвуковое ангиосканирование артерий нижних конечностей проводили на аппарате «Toshiba-Xario» (Япония), работающем в реальном масштабе времени. Использовали секторные двунаправленные датчики непрерывной звуковой волны с рабочей частотой от 5 МГц до 10 МГц.

В первой группе больных, отказавшихся от предложенной первичной ампутации ввиду невозможности выполнения реконструктивной операции и наличия распространенных некротических процессов на голени и стопе, проводилась консервативная терапия. Она включала подкожное введение антикоагулянтов (гепарин 5000 МЕ 4 раза в сутки в течение 5 дней), внутривенные инфузии ангиопротекторов (пентоксифиллин 5 мл на 200 мл физиологического раствора хлорида натрия 1 раз в сутки в течение 10 дней), пероральный прием антиагрегантов (кардиомагнил 75 мг 1 раз в сутки в течение всей госпитализации), ненаркотические (анальгин, кеторол, дексалгин) и

наркотические (промедол) анальгетики, физиотерапевтические процедуры (лазеротерапия на нижние конечности).

Во второй группе, при отсутствии распространенных некротических процессов на стопе и голени, на фоне консервативной терапии решением консилиума проводилась операция РОТ под спинномозговой анестезией по стандартной методике.

Оценка результатов лечения производили на основании подсчетов баллов путей оттока по классификации R. Rutherford et. al. от 1997 года (Таблицы 5, 6), применение которой в настоящее время одобрено российскими согласительными документами для определения возможности выполнения реконструктивной сосудистой операции [154, 182].

Таблица 5 – Расчет баллов в зависимости от локализации артерий оттока.

Локализация дистального анастомоза	Количество баллов		
	3	2	1
Общая подвздошная		Наружная подвздошная	Внутренняя подвздошная
Наружная подвздошная	Общая бедренная	Поверхностная бедренная	Глубокая бедренная
Общая бедренная		Поверхностная бедренная	Глубокая бедренная
Подколенная выше щели коленного сустава	Дистальные отделы подколенной		Передняя берцовая
			Задняя берцовая
Подколенная ниже щели коленного сустава			Малоберцовая
Передняя берцовая		Дистальные отделы берцовой артерии	Дуга стопы
Задняя берцовая		Дистальные отделы берцовой артерии	Дуга стопы
Малоберцовая		Пути оттока стопы	Коллатерали в переднюю и заднюю берцовые артерии
Стопная			



Таблица 6 – Расчет баллов в зависимости от локализации артерий оттока.

Степень окклюзии	Количество баллов				
	3	2,5	2	1	0
Крупные артерии оттока	Окклюзия на всем протяжении	Окклюзия на протяжении менее чем $\frac{1}{2}$ длины; видимые коллатерали	Стеноз от 50 до 99%	Стеноз от 20 до 49%	Стеноз меньше 20%
Пути оттока стопы	Нет проходимость артерий Стопы	Артерии, являющиеся продолжением окклюзированной и создающей основной блок, частично или полностью проходимы	Артерии, являющиеся продолжением окклюзированной и создающей основной блок, полностью проходимы, но дуга стопы разомкнута	Один или несколько критических стенозов артерий стопы, не являющихся продолжением окклюзированной артерии, создающей основной блок	Полностью проходимость стопная дуга (стеноз <20%)

Результаты проведенного лечения также оценивались через 6 месяцев на основании степени изменения клинического статуса по шкале Rutherford et. al. [182], рекомендованную в качестве стандарта Российским обществом ангиологов и сосудистых хирургов [83]. Данная шкала представлена в виде оценок в баллах по 7 шкалам (Таблица 7).

Таблица 7 – Шкала оценки результатов проведенного лечения.

<b>Баллы</b>	<b>Эффективность</b>	<b>Клиническая характеристика</b>
+3	Значительное улучшение	Нет симптомов ишемии, все трофические язвы зажили, ЛПИ нормализовался (>0,9)
+2	Умеренное улучшение	Отмечаются симптомы ишемии, но боли в конечности появляются при большей нагрузке, чем до операции, улучшение как минимум на одну степень ишемии, ЛПИ не нормализовался, но увеличился больше чем на 0,1
+1	Минимальное улучшение	ЛПИ увеличился более чем на 0,1, но клинического улучшения нет или наоборот, клиническое улучшение без прироста ЛПИ более чем на 0,1
0	Без изменений	Нет изменений в степени ишемии, нет увеличения ЛПИ
-1	Минимальное ухудшение	Нет изменений в степени ишемии, но ЛПИ уменьшился больше чем на 0,1 или наоборот, отмечено ухудшение статуса без уменьшения ЛПИ
-2	Умеренное ухудшение	Усугубление ишемии, минимум на одну степень или неожиданная малая ампутация
-3	Значительное ухудшение	Ухудшение статуса более чем на одну степень ишемии или большая ампутация

## **2.2. Общая характеристика объектов и методов экспериментального исследования**

Экспериментальные исследования выполнены на базе Научно-исследовательского института экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Для проведения экспериментальных исследований было получено одобрение Регионального этического комитета ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России – протокол №2 от 17.02.2014г.

Моделирование критической ишемии конечности проводили на белых лабораторных крысах, так как данные животные имеют схожее с человеком строение артериального и венозного русла конечностей, устойчивы к инфекциям мягких тканей, удобны в обращении и в заборе биологических материалов.

Экспериментальные исследования проведены в 5 группах на 130 белых крысах линии "Wistar". Использовали половозрелых самцов массой  $350 \pm 20$  г, прошедших карантинный режим, без внешних признаков заболеваний, находящихся в виварии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России. Питание животных было стандартным. В день операции крыс не кормили и не поили, проводили их осмотр и взвешивание. Оперативные вмешательства и другие манипуляции с крысами проводили в условиях общего обезболивания. Эвтаназию осуществляли путем передозировки наркотизирующих средств в соответствии с «Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Советом Европы (г. Страсбург, Франция, 1986) и Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях».

В первую, интактную, группу вошло 10 животных, у которых оценены показатели микроциркуляции и морфологии мягких тканей, принятых за предполагаемую норму. В контрольной группе проводилось моделирование критической ишемии без последующего лечения. В опытных группах выполнялось моделирование критической ишемии с последующим лечением в 1-й группе (МНФ) по разработанной методике, во 2-й – иммуностимулирующим препаратом «Миелопид», в 3-й – комбинированным применением МНФ и препарата «Миелопид». Измерение уровня перфузии осуществляли методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) на 10-е, 21-е и 28-е сутки эксперимента. Затем у лабораторных животных забирали участок ишемизированной мышечной ткани для гистологического исследования (Рисунок 2).

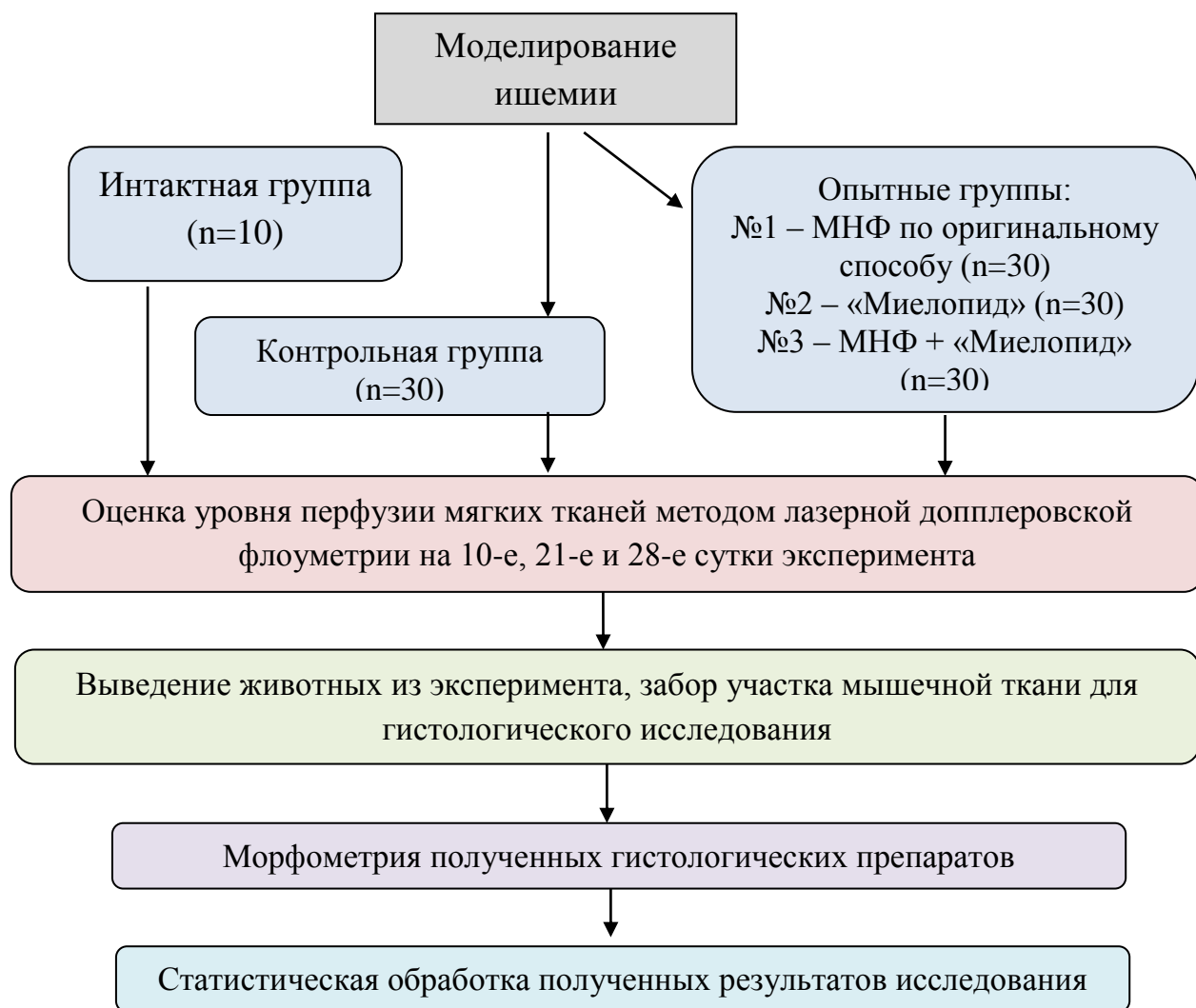


Рисунок 2 – Дизайн экспериментального исследования.

В ходе проведенного экспериментального исследования применяли клинические (общее состояние животных, местно: выраженность признаков критической ишемии конечности), электрофизиологические (измерение уровня перфузии мягких тканей методом лазерной доплеровской метрии – ЛДФ), морфологические (оценка микропрепаратов, окрашенных гематоксилин-эозином) и статистические (обработка полученных результатов) методы исследования.

### **2.3. Моделирование экспериментальной критической ишемии конечности**

На основании анализа данных отечественной и зарубежной литературы были определены недостатки существующих моделей экспериментальной ишемии конечности: сложность реализации и высокая стоимость модели, сохранение анатомического строения сосудистой системы конечности животного (артерия сафена – аналог глубокой артерии бедра человека), что ведет к образованию прямых анастомозов и отсутствию открытия коллатералей, наличие эффекта ишемического прекондиционирования [19, 76, 132, 187, 201].

При проведении данного научного исследования разработана экспериментальная модель критической ишемии, которая практически полностью отвечает необходимым требованиям, позволяет воспроизводить картину критической ишемии нижних конечностей, как у человека (патент на изобретение №2559937, дата публикации 20.08.2015г) (Рисунок 3).

Под действием средств для наркоза («Хлоралгидрат» в дозе 300 мг/кг, внутривенно, в виде раствора) животных фиксировали на спине. Затем в асептических условиях, на выбритом от шерсти участке, в области внутренне-медиальной поверхности бедра, производили линейный разрез кожи, подкожно-жировой клетчатки и фасции от паховой складки до коленного сустава. Далее обнажали сосудисто-нервный пучок, бедренную артерию мобилизовали (отсекали от нее ветви первого порядка) на протяжении всего разреза и брали на резиновые держалки (Рисунок 3 А). Перевязывали и пересекли а. saphena (аналог глубокой артерии бедра у человека). В дистальном направлении, в области бифуркации подколенной артерии, ее лигировали и отсекали (Рисунок 3 Б). Участок магистрального сосуда, включающий бедренную, подколенную артерию, артерию сафена и начальные отделы артерий голени удаляли (Рисунок 3 В). На кожу шелковой нитью размером 1.0 накладывали один непрерывный шов (Рисунок 3 Г).

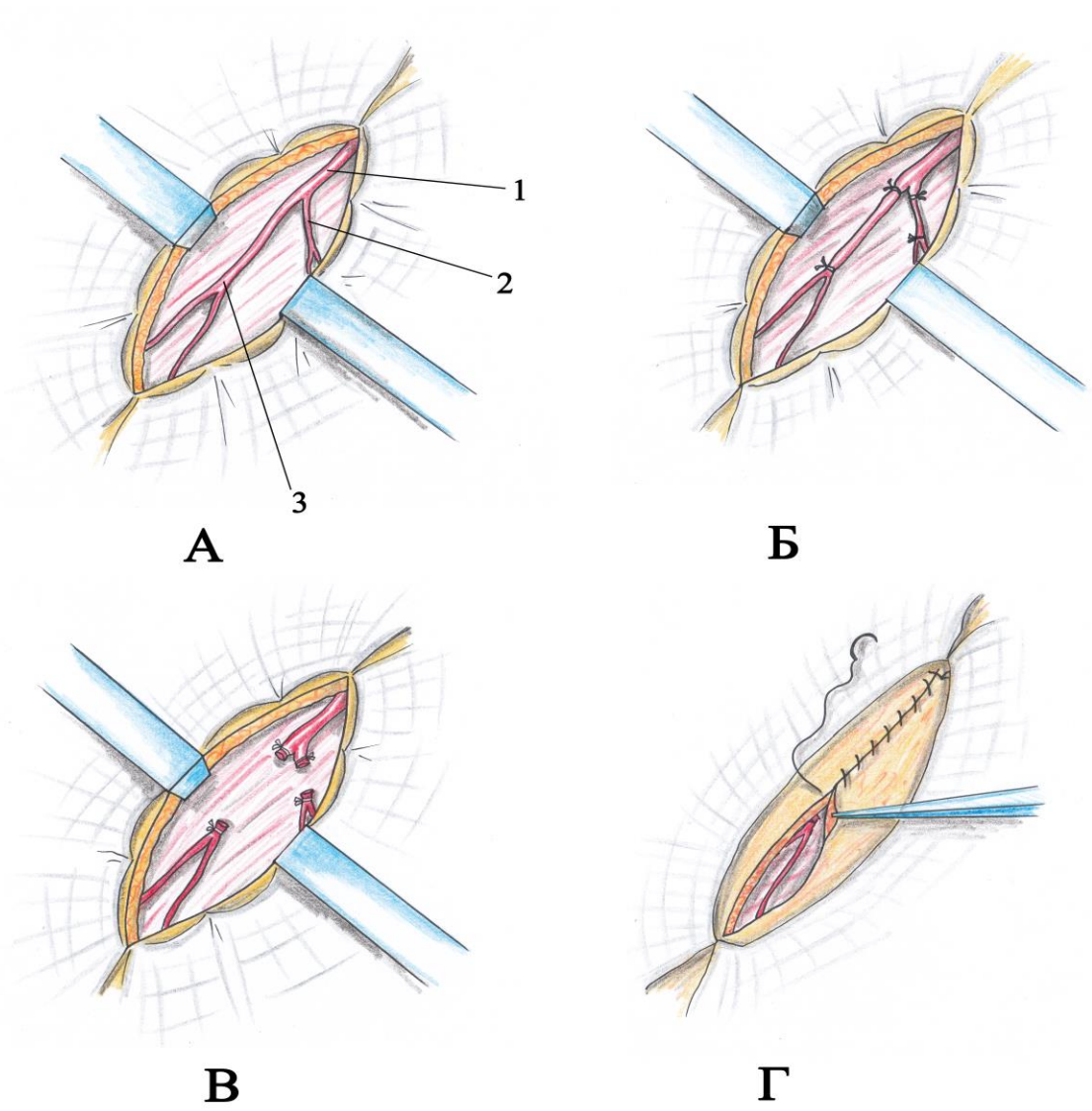


Рисунок 3 – Этапы моделирования критической ишемии конечностей: А – Выделение сосудистого пучка: 1 – бедренная артерия, 2 – артерия сафена (аналог глубокой артерии бедра человека), 3 – бифуркация подколенной артерии; Б – Лигирование артерий в проксимальном и дистальном направлениях; В – Удаление участка магистральных артерий; Г – Ушивание послеоперационной раны.

## **2.4. Методика получения и введения мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга**

В литературе описаны способы введения стволовых клеток в ишемизированные мышцы бедра и голени пораженной конечности инфильтрационно из шести различных точек [190], в системный кровоток [149] или же внутриаартериально [147, 151].

В данном экспериментальном исследовании введение МНФ осуществляли из двух точек по оригинальному способу: 1) непосредственно под паховую связку в зону анатомического расположения коллатералей подвздошной артерии и ее ветвей; 2) интрамукулярно в икроножную мышцу переднелатеральной поверхности средней трети голени, – патент №2556606, дата публикации 10.07.2015г (Рисунок 4).

МНФ готовили непосредственно перед введением по следующей методике: у крысы, перенесшей операцию моделирования ишемии задней конечности, на противоположной конечности пальпировали бедренно-большеберцовый сустав, образованный латеральными и медиальными мышечками бедренной и большеберцовой костей. Сустав фиксировали одной рукой в положении флексии, а другой брали иглу диаметром 20G, соединенной со шприцем, содержащим 2500 ЕД гепарина, разбавленного с 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:1 в объеме 1мл. После санации 70% этиловым спиртом, перкутанно через хрящевые суставные мениски под надколенником осуществляли пункцию костномозговой полости. Костный мозг аспирировали в шприц путем поступательных движений иглы в полости вперед и назад в объеме от 1 до 1,5 мл (Рисунок 4 А).

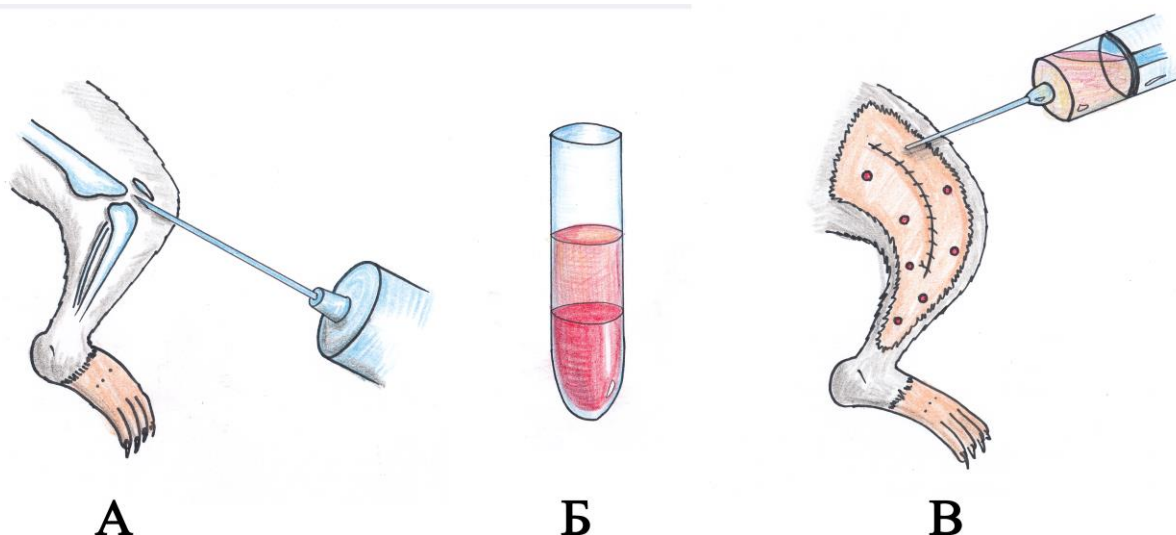


Рисунок 4 – Методика получения и введения мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга: А – забор костного мозга; Б – оседание мононуклеарной фракции после центрифугирования гепаринизированного костного мозга; В – введение полученной мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга.

МНФ выделяли по методу Воум [118], принцип которого основан на различии в плавучей плотности форменных элементов. Смесь полисахарида фиколла и рентгеноконтрастного вещества верографин создает градиент с такой плотностью, которая позволяет при центрифугировании разделить клетки костного мозга на МНФ, в которую входят лимфоциты, субпопуляция моноцитов и бластные гемопоэтические клетки, и фракцию, содержащую гранулоциты и эритроциты. МНФ обладает меньшей, чем градиент, плотностью и располагаются над градиентом. Плотность гранулоцитов и эритроцитов больше, чем плотность градиента, они проходят через градиент, опускаясь на дно пробирки.

Методика выделения МНФ из гепаринизированного костного мозга заключалась в следующем: костный мозг разводили физиологическим раствором (рН 7,2) в соотношении 1:5; центрифугировали в градиенте плотности фиколла-верографин при 400g в течение 30 мин. Полученную мононуклеарную фракцию трижды отмывали в физиологическом растворе, забуференном с помощью фосфатно-солевого буфера (ЗФФР) и ресуспендировали в среде RPMI-1640 в



концентрации 10<sup>6</sup> клеток в мл. Жизнеспособность клеток, определяемая по методу окрашивания с трипановым синим, превышала 96% (Рисунок 4 Б).

Лечение экспериментальной ишемии МНФ начато на седьмые сутки после операции (Рисунок 4 В). Согласно результатам предшествующих исследований морфологические механизмы компенсации ишемии конечности – неоваскулогенез – включаются в среднем на 7 сутки после операции моделирования. За этот срок мобилизуются все предшествующие компенсаторные резервы организма животного. Дальнейшие изменения в состоянии кровообращения в конечности могут происходить только при влиянии извне [136, 180, 190].

## **2.5. Обоснование дозы исследуемого препарата**

В ходе проведенного экспериментального исследования препарат «Миелопид» вводили в соответствующих дозах через 3 часа после операции, затем ежедневно в течение пяти суток. Принятая схема соответствует ранее проведенным экспериментальным исследованиям, выполненным на крысах, на схожей модели экспериментальной ишемии конечности [10, 74].

В работе использовали иммуностимулирующий препарат «Миелопид» (производство Гематологический Научный Центр (ГНЦ) Антибиотиков и ГНЦ Институт иммунологии, Россия, Код АТХ: L03A). Ангиопротективные эффекты миелопида на модели экспериментальной критической ишемии конечности изучали в дозе 50 мкг/кг/сут, исходя из средней терапевтической дозы 0,05 мг/кг у человека [36, 102]. «Миелопид» разводили в 0,9% растворе натрия хлорида и вводили внутримышечно в дозе 0,1 мл на 100 г массы тела животного.

## 2.6. Оценка уровня перфузии методом лазерной доплеровской флоуметрии

Метод ЛДФ основывается на оптическом неинвазивном зондировании тканей лазерным излучением и анализе рассеянного и отраженного от движущихся в тканях эритроцитов излучения. Отраженное от статических (неподвижных) компонентов ткани лазерное излучение не изменяет своей частоты, а отраженное от подвижных частиц (эритроцитов) – имеет доплеровское смещение частоты относительно зондирующего сигнала [56].

В данном исследовании ЛДФ осуществляли лазер-доплеровским флоуметром «Віорас-systems MP-100» и специализированным датчиком «TSD-144». Запись и обработка полученных данных производили при помощи компьютерной программы «AcqKnowledge–38». Исследование перфузии мышц у лабораторных животных выполняли на 10-е, 21-е и 28-е сутки под действием наркотизирующих средств («Хлорал-гидрат» в дозе 300 мг/кг, внутривенно, в виде раствора). На бедре и голени ишемизированной задней конечности иссекали участок кожи и подкожно-жировой клетчатки. Затем тупым путем отделяли фасцию от мышцы на протяжении всего разреза. Датчик прибора приставляли вплотную к соответствующим мышцам. Далее производили флоуметрию с записью полученной кривой в пяти точках мышцы по 30 секунд на каждой, а полученное среднее значение из пяти записанных принимали за уровень перфузии у данного животного. Из полученных 10 значений у разных животных выводили среднее, которое принимали за уровень перфузии в данной группе животных на данном сроке исследования.

После измерения уровня перфузии мышечной ткани исследуемую мышцу забирали на биопсию для морфологического и морфометрического исследования.

## 2.7. Методы морфологического и морфометрического исследования

Подготовку гистологических препаратов проводили в условиях патологоанатомического отделения ОБУЗ «КГКБ СМП» г. Курска. Анализ полученных гистологических материалов осуществляли на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России.

Изъятые после аутопсии для исследования участки мышечной ткани размерами 10 × 10 мм фиксировали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина. После фиксации материал промывали и обезжиривали. Из каждой мышцы вырезали по 2 кусочка и после дегидратации в спиртах восходящей крепости заливали в парафин по стандартной методике. Заготовленные парафиновые срезы, толщиной 7-10 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином.

Микроскопирование и микрофотографирование гистологических препаратов осуществляли с помощью лабораторного микроскопа Levenhuk D320L и цифровой окуляр-камеры Levenhuk C310 на увеличениях x100, x200 и x400 крат с документированием снимков в программе Levenhuk Tour View (версия программы входит в комплект поставки окуляр-камеры). На микрофотографиях проводили измерение среднего диаметра артериол, капилляров, венул и мышечных волокон, зоны некроза и плотности капиллярной сети. Далее подсчитывали их количество в 10 полях зрения во всех сериях эксперимента на 10-е, 21-е и 28-е сутки.

Подсчет индекса артериовенулярного шунтирования производили следующим образом по формуле [78]:

$$\text{ИАВШ} = \frac{\varnothing_{\text{вен}} - \varnothing_{\text{арт}}}{\varnothing_{\text{вен}}} \times 100\%$$

где, ИАВШ – индекс артерио-венулярного шунтирования (%),  $\varnothing_{\text{вен}}$  – средний диаметр венул (мкм),  $\varnothing_{\text{арт}}$  – средний диаметр артериол (мкм).

## 2.8. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку данных проводили в соответствии со стандартами ИСО 3534-3-99 и ГОСТ Р 50779.10-2000 (ИСО 3534-1-93) (Государственный стандарт Ростехрегулирования от 01 сентября 2007 года № ГОСТ Р ИСО 11462-1-2007).

Статистическую обработку клинического исследования проводили с помощью программы STATISTICA, версия 7.0. Для тестирования различий использовали U – критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Полученные экспериментальные данные анализировали с помощью методов описательной статистики путем определения таких показателей как среднее арифметическое, стандартное отклонение и стандартная ошибка. В качестве основного способа определения уровня статистической значимости отличий между средними величинами использовали методику определения границ доверительного интервала (t) при допустимом уровне  $p \leq 0,05$  для экспериментальных медико-биологических исследований [26, 58, 71].

Для выявления значимой корреляционной связи между показателями уровня перфузии тканей и морфометрическими измерениями на разных сроках исследования использовали коэффициент ранговой корреляции Пирсона [71].

Все вычисления выполнялись с помощью аналитического пакета приложения Microsoft Excel Office 2010, лицензией на право использования которой обладает федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Результаты клинического исследования

Частота и характер поражения артерий нижних конечностей в исследуемых клинических группах представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Частота окклюзионно-стенотических поражений артерий нижних конечностей в исследуемых группах.

Характер поражения артерий	Консервативная терапия (n=20)		РОТ (n=20)	
	Абс.	%	Абс.	%
Окклюзия ОБА	–	–	–	–
Окклюзия ПБА	9	45	10	50
Окклюзия ПкА и ЗББА	16	80	17	85
Стеноз ПБА	11	55	10	50
Стеноз ГБА	7	35	5	25
Стеноз ПкА и ЗББА	4	20	3	15

У всех больных зарегистрировано поражение периферического артериального русла, причем окклюзию подколенной артерии (ПкА) и задней большеберцовой артерии (ЗББА) наблюдали у 33 (82,5%) больных, а стеноз – у 7 (17,5%) больных. У 19 (47,5%) больных выявлена окклюзия поверхностной бедренной артерии (ПБА), а у 21 (52,5%) – ее стеноз. Поражение общей бедренной артерии (ОБА) не выявлено ни у одного пациента.

По данным ультразвуковых характеристик кровотока в исследуемых клинических группах получены следующие результаты (Таблица 9). Магистральный кровоток зарегистрирован у 40 (100%) больных по ОБА, у 19 (47,5%) – по ПБА и у 28 (70%) – по ГБА. По ПкА и ЗББА магистральный кровоток не наблюдался. Коллатеральный кровоток по ПБА зафиксирован в 21 (52,5%) случаях, по глубокой артерии бедра (ГБА) – в 12 (30%) случаях, по ПкА

и ЗББА – в 7 (17,5%) случаях. Отсутствие кровотока по ПКА и ЗББА имело место у 33 (82,5%) клинических наблюдений.

Таблица 9 – Распределение больных по характеру кровотока в артериях нижних конечностей

Артерии	Консервативная терапия (n=20)			РОТ (n=20)		
	Характер кровотока					
	магистральный	коллатеральный	отсутствует	Магистральный	коллатеральный	Отсутствует
ОБА	20 (100%)	–	–	20 (100%)	–	–
ПБА	9 (45%)	11 (55%)	–	10 (50%)	10 (50%)	–
ГБА	13 (65%)	7 (35%)	–	15 (75%)	5 (25%)	–
ПКА	–	4 (20%)	16 (80%)	–	3 (15%)	17 (85%)
ЗББА	–	4 (20%)	16 (80%)	–	3 (15%)	17 (85%)

Результаты изучения макрогемодинамики и микроциркуляции в исследуемых группах до и после проведенного лечения представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Динамика показателей артериального кровотока и микроциркуляции до и после проведенного лечения.

Показатель исследования		Консервативная терапия (n=20)		РОТ (n=20)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
ФИ (%)		34,2±2,2	28,6±1,7*	35,6±1,7	32,2±3,1*
РИ	голень	0,31±0,02	0,21±0,03*	0,29±0,02	0,24±0,03*
	стопа	0,24±0,02	0,15±0,03*	0,23±0,02	0,17±0,03*
ЛПИ		0,3±0,01	0,15±0,02*	0,3±0,01	0,2±0,02*

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  в сравнении с показателями до лечения.

Из таблицы видно, что показатели инструментальных исследований в исследуемых группах статистически достоверно отличались до и после проведенного лечения, а именно отмечалась отрицательная динамика в уменьшении ФИ, РИ и ЛПИ. Так по данным ФИ уровень микроциркуляции уменьшился в первой группе на  $5,6 \pm 0,5\%$ , во второй – на  $3,2 \pm 1,4\%$ . Объемный

кровоток по данным РИ также был ниже после лечения в первой группе на голени на  $0,10 \pm 0,01$ , а на стопе – на  $0,09 \pm 0,01$ , а во второй на голени – на  $0,05 \pm 0,01$  и на стопе – на  $0,06 \pm 0,01$ . Магистральный кровоток по данным ЛПИ был снижен после лечения на  $0,15 \pm 0,01$  в первой группе и на  $0,10 \pm 0,01$  во второй.

В зависимости от суммы баллов путей оттока по классификации R. Rutherford et. al., дистальное русло в 100% случаев расценивалось как «неудовлетворительное» – сумма баллов больше 8.

Результаты оценки изменения клинического статуса по отношению к периоду до лечения представлены в Таблице 11.

Таблица 11 – Динамика изменения клинического статуса больных после лечения в исследуемых группах.

<b>Баллы</b>	<b>Эффективность</b>	<b>Консервативная терапия (n=20)</b>	<b>РОТ (n=20)</b>
+3	Значительное улучшение	–	–
+2	Умеренное Улучшение	–	–
+1	Минимальное улучшение	–	2 (10%)
0	Без изменений	–	–
-1	Минимальное ухудшение	–	–
-2	Умеренное Ухудшение	–	–
-3	Значительное ухудшение	20 (100%)	18 (90%)

В первой группе достигнуть какой-либо степени улучшения и результата «без изменений» после проведенного лечения не удалось, что свидетельствует о прогрессировании ишемии нижних конечностей согласно субъективной оценке пациентов собственного состояния. Во второй группе у 2(10%) пациентов достигнут результат «минимальное улучшение». У этих больных выявлено

поражение бедренно-подколенного сегмента артериального русла, а берцовые артерии были проходимы. В обеих группах в большинстве случаев выявлен результат «значительное ухудшение», причем в первой он был равен 100%, а во второй – 95%.

При анализе сохранности пораженной конечности после проведенного лечения установлено, что в первой группе на фоне консервативной терапии через 2,5 месяца 20 (100%) пациентам была выполнена ампутация. Во второй группе ампутация нижней конечности выполнена у 18 (90%) пациентов, а у двух пациентов удалось сохранить конечность, причем у одного из них диагностирована острая стадия инфаркта миокарда, а другого – ишемического инсульта (Рисунок 5).

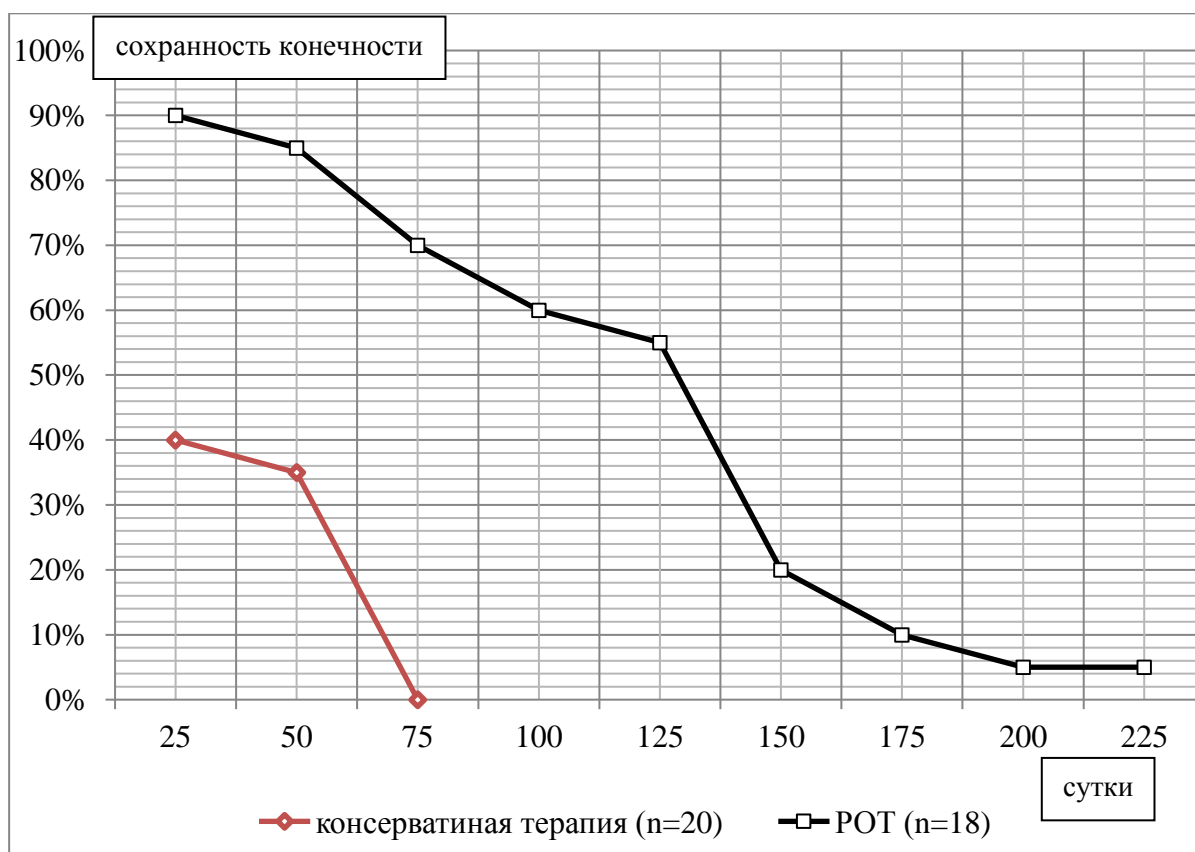


Рисунок 5 – Сохранность конечности в исследуемых клинических группах



## Резюме

Таким образом, проведенный нами анализ результатов лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей показал неэффективность консервативной терапии и непрямой реваскуляризации (РОТ) при невозможности выполнения реконструктивной операции. С течением времени у данной группы «неоперабельных» больных снижались показатели макрогемодинамики и микроциркуляции в пораженной конечности, нарастали симптомы ишемии и, вследствие чего, им выполняли первичные ампутации.

В связи с выше изложенным, актуальным является поиск новых решений для лечения критической ишемии конечностей, позволяющих уменьшить риск потери конечности и улучшить качество жизни пациентов. Стимуляция периостального кровотока (РОТ), суть которой основывается на рефлекторном воздействии на надкостницу и уменьшению спазма артерий, раскрытию уже существующих коллатералей и соответственном снижении периферического сопротивления не позволяет в полной мере компенсировать кровообращение пораженной конечности. В последнее время возрос интерес к возможности стимуляции неоваскулогенеза при ишемии тканей путем применения различных клеточных субстанций. Этот факт побудил нас на основе экспериментального исследования разработать новый способ лечения критической ишемии конечностей путем введения моноклеарных клеток аутологичного костного мозга.

### 3.2. Динамика симптоматических проявлений экспериментальной критической ишемии конечности

После моделирования критической ишемии у животных контрольной и опытных групп исследования отмечались явные признаки ишемии оперированной конечности. Дистальные участки конечности имели бледную окраску, с цианотичным оттенком, оперированная конечность практически не участвовала в передвижении, наблюдались явления ишемического отека.

Несмотря на достаточную агрессивность разработанной модели на 7 сутки эксперимента у животных наблюдалась относительная компенсация недостаточности кровообращения: уменьшался ишемический отек, оперированная конечность включалась в акт передвижения. Параллельно с течением времени появлялись признаки формирующейся критической ишемии конечности, частота которых представлена в Таблице 12.

Таблица 12 - Частота симптомов экспериментальной критической ишемии конечности на 7 сутки после операции (n=120).

<b>Симптомы экспериментальной критической ишемии конечности</b>	<b>Абсолютное кол-во</b>	<b>В процентах, (%)</b>
Боль (по косвенным признакам)	117	98
Ограниченное участие конечности в передвижении	108	90
«Перемежающаяся хромота»	105	88
Гиперемия кожи конечности	78	65
Сухая гангрена голени, самоампутация	8	6,6
Сухая гангрена пальцев, части стопы	6	5
Артериальные трофические язвы	4	3,3
Ишемический отек	4	3,3

При визуальном обследовании у 90-98% животных зарегистрировано наличие болевого синдрома и ограничение конечности в передвижении. Боль оценивалась по защитной реакции, вокализации (издание писка при

пальпации пораженной конечности) и беспокойной реакции в виде частой смены положения тела животного.

Симптом «перемежающей хромоты» встречался в 105 случаях наблюдения (88%): при передвижении на короткое расстояние животное останавливалось и подворачивало оперированную конечность.

Гиперемия кожи голени и стопы наблюдалась в 65% – лабораторные животные встряхивали и потирали пораженный участок конечности.

В некоторых случаях наблюдалась сухая гангрена пальцев стопы, характерная для синдрома хронической артериальной недостаточности. В отдельных случаях наблюдалась самоампутация конечности, что говорит о развитии сухой гангрены с четкой демаркацией и последующим отторжением некротизированных участков.

Таким образом, у крыс на фоне острой экспериментальной патологии сформировались те же самые патогномичные признаки критической ишемии конечности (как острой регрессирующей), которые наблюдаются у пациентов с ХОЗАНК.

Следовательно, с клинической точки зрения данная экспериментальная модель критической ишемии конечности отвечает всем предъявляемым требованиям для изучения на ее примере соответствующих методов лечения. Основные преимущества разработанной экспериментальной модели критической ишемии заключаются в простоте ее реализации и относительно низкой стоимости. Удаление артерии сафена – аналога глубокой артерии бедра человека – не ведет к образованию прямых анастомозов и эффекту ишемического прекондиционирования, что позволяет наиболее объективно оценить изучаемые методы лечения.

### 3.3. Результаты лечения экспериментальной критической ишемии конечности по данным морфометрического исследования

В ходе исследования микроциркуляции в группах экспериментальных животных изучены такие показатели, как: уровень перфузии тканей, площадь некроза мышечных волокон, средний диаметр артериол, капилляров и венул, плотность капиллярной сети, индекс артериовенулярного шунтирования и средний диаметр мышечных волокон.

Для определения нормальных показателей у интактных животных оценен уровень перфузии мышечных тканей конечности методом ЛДФ. Полученные средние значения в этой группе животных были приняты за «норму» и составили  $588,74 \pm 19,28$  п.е. (перфузионных единиц). Ошибка этого среднего значения (38,56) не превышает 10% от абсолютного значения, что свидетельствует о достаточном количестве выбранных единиц наблюдения.

При сравнительной оценке уровня перфузии в группах экспериментальных животных выявлен следующий характер изменения перфузии мягких тканей (Таблица 13). В контрольной группе исследования уровень перфузии тканей на 10-е сутки был ниже в сравнении с интактной группой на 60,2%, на 21-е – на 40,6%, на 28-е – на 29,7%. По сравнению с контрольной группой в 1-й опытной группе (МНФ) уровень перфузии тканей был выше на 10-е сутки на 79,4%, на 21-е – на 100%, на 28-е – на 110%. Во 2-й опытной группе («Миелопид») уровень перфузии тканей был выше на 10-е сутки на 32,4%, на 21-е – на 34,5%, на 28-е – на 83,9% в сравнении с контрольной группой. В 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») показатель перфузии тканей по сравнению с контрольной группой был выше на 10-е сутки на 97,4%, на 21-е – на 109%, на 28-е – на 132,3%. Эти результаты были подтверждены наличием *статистически значимых отличий*,<sup>1</sup> полученных средних значений уровня перфузии мягких тканей.

---

<sup>1</sup> Здесь и в последующих таблицах и диаграммах наличие статистически значимых отличий между значениями средней арифметической рассчитаны методом доверительного интервала (t).

Таблица 13 - Динамика изменения уровня перфузии тканей в группах экспериментальных животных.

Группы животных		Уровень перфузии мягких тканей, п.е.		
		10 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Интактная (n=10)</b>	M ± m	588,74±19,28	588,74±19,28	588,74±19,28
	t	0,35	0,35	0,35
<b>Контрольная (n=30)</b>	M ± m	234,30±7,22*	349,53±15,71*	413,91±16,4*
	t	1,92	1,86	2,71
<b>1-я опытная (МНФ) (n=30)</b>	M ± m	420,28±21,44#	695,74±46,6#	873,98±43,72#
	t	6,88	2,06	3,39
<b>2-я опытная («Миелопид» (n=30)</b>	M ± m	310,21±16,05#	470,09±23,03#	760,98±70,12#
	t	1,99	1,86	4,62
<b>3-я опытная (МНФ + «Миелопид» (n=30)</b>	M ± m	462,30±18,35#	730,52±24,52#	961,37±38,53#
	t	1,39	6,79	8,28

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами. М – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, t – доверительный интервал.

При изучении артериального притока в микроциркуляторное русло мышц на фоне критической экспериментальной ишемии по данным среднего диаметра артериол получены следующие результаты (Таблица 14). Диаметр артериол в контрольной группе в сравнении с интактной был ниже на 10-е сутки на 24,4%, на 21-е – на 21,9%, на 28-е – на 22,9%. В 1-й опытной группе (МНФ) исследуемый показатель был выше по сравнению с контрольной на 10-е сутки на 20,3%, на 21-е – на 24,8%, на 28-е – на 61,1%. Во 2-й опытной группе («Миелопид») диаметр артериол был выше на 10-е сутки на 12,2%, на 21-е – на 24,8%, на 28-е – на 61,1% в сравнении с контролем. В 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») на 10-е сутки исследуемый параметр был выше на 20,9%, на 21-е – на 44,2%, на 28-е – на 76,6% по сравнению с контрольной группой.

Таблица 14 - Динамика изменения среднего диаметра артериол в группах экспериментальных животных.

Группы животных		Диаметр артериол, мкм		
		10 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Интактная (n=10)</b>	M ± m	15,1±4,5	15,1±4,5	15,1±4,5
	T	0,68	0,68	0,68
<b>Контрольная (n=30)</b>	M ± m	11,41±0,15*	11,8±0,25*	11,63±0,15*
	t	0,40	0,38	1,06
<b>1-я опытная (МНФ) (n=30)</b>	M ± m	13,73±0,76#	14,73±0,27#	18,74±0,25#
	t	1,62	0,69	0,48
<b>2-я опытная («Миелопид») (n=30)</b>	M ± m	12,8±0,25#	14,8±0,15#	15,2±0,38#
	t	0,55	0,30	0,78
<b>3-я опытная (МНФ + «Миелопид») (n=30)</b>	M ± m	13,8±0,73#	17,01±0,43#	20,54±0,73#
	t	0,55	0,87	1,35

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами. М – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, t – доверительный интервал.

Таблица 15 - Динамика изменения среднего диаметра венул в группах экспериментальных животных.

Группы животных		Диаметр венул, мкм		
		10 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Интактная (n=10)</b>	M ± m	21,2±5,8	21,2±5,8	21,2±5,8
	t	0,53	0,53	0,53
<b>Контрольная (n=30)</b>	M ± m	26,78±0,35*	19,56±0,32*	18,99±0,25*
	t	0,64	0,70	0,51
<b>1-я опытная (МНФ) (n=30)</b>	M ± m	20,18±0,26#	23,76±0,37#	23,21±0,28#
	t	0,54	0,75	0,53
<b>2-я опытная («Миелопид») (n=30)</b>	M ± m	24,72±0,13#	19,81±0,63	20,70±0,45#
	t	0,25	1,21	0,87
<b>3-я опытная (МНФ + «Миелопид») (n=30)</b>	M ± m	19,4±0,39#	20,9±0,41	21,11±0,40#
	t	0,72	0,98	1,06

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами. М – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, t – доверительный интервал.

При изучении венозного оттока из микроциркуляторного русла при экспериментальной критической ишемии конечности путем определения диаметра венул получены следующие результаты (Таблица 15). В контрольной группе диаметр венул на 10-е сутки был выше на 26,3%, на 21-е и 28-е сутки ниже – на 7,7% и 10,4% соответственно, – в сравнении с интактной группой животных. В 1-й опытной группе (МНФ) исследуемый показатель в сравнении с контролем был ниже на 10-е сутки на 24,6%. а на 21-е и 28-е сутки выше – на 21,5% и 22,2%. Во 2-й опытной группе («Миелопид») диаметр венул на 10-е сутки был ниже на 7,7%, на 28-е сутки выше на 9% при сравнении с контрольной группой экспериментальных животных. В 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») исследуемый диаметр венул снижался на 10-е сутки на 27,5%, на 28-е сутки возрастал на 11,2%.

Таблица 16 – Динамика изменения индекса артериовенулярного шунтирования в группах экспериментальных животных.

Группы животных		Индекс артериовенулярного шунтирования, %		
		10 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Интактная (n=10)</b>	M ± m	28,8±1,2	28,8±1,2	28,8±1,2
	t	0,67	0,67	0,67
<b>Контрольная (n=30)</b>	M ± m	57,4±1,60*	39,7±1,38*	38,7±3,25*
	t	2,97	3,28	6,67
<b>1-я опытная (МНФ) (n=30)</b>	M ± m	31,74±3,69#	24,88±1,37#	19,3±1,56#
	t	8,78	3,79	2,95
<b>2-я опытная («Миелопид») (n=30)</b>	M ± m	48,22±0,97#	24,56±2,87#	26,57±1,52#
	t	2,15	5,32	2,92
<b>3-я опытная (МНФ + «Миелопид») (n=30)</b>	M ± m	28,40±4,17#	18,15±2,04#	1,80±4,88#
	t	9,21	6,01	9,77

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами. М – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, t – доверительный интервал

Исследование патофизиологического феномена артериовенулярного шунтирования (АВШ) проводилось путем расчета артериовенулярного индекса,

который равен отношению разности между диаметром венул и артериол к диаметру венул, выраженному в процентах (Таблица 16). В контрольной группе животных ИАВШ был выше на всех сроках эксперимента в сравнении с интактной группой: на 10-е сутки на 28,6%, на 21-е – на 10,9%, на 28-е – на 9,9%. В 1-й опытной группе (МНФ) исследуемый индекс был ниже на 10-е сутки на 25,6%, на 21-е – на 14,8%, на 28-е – на 19,4% в сравнении с контрольной группой. Во 2-й опытной группе («Миелопид») показатель АВШ был ниже при сравнении с контролем на 10-е сутки на 9,2%, на 21-е – на 15,1%, на 28-е – на 12,1%. В 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») также отмечалось снижение ИАВШ на всех сроках эксперимента: на 10-е сутки на 29%, на 21-е – на 21,5%, на 28-е – на 36,9%.

При анализе корреляционной зависимости (Рисунок 6) между уровнем АВШ и перфузией тканей на различных сроках эксперимента во всех исследуемых группах выявлено наличие отрицательной корреляционной связи различной силы. Самые высокие показатели перфузии тканей наблюдаются в группах животных, которые имеют низкие значения ИАВШ. Так, самая сильная отрицательная корреляционная связь наблюдается на 10-е сутки в 1-й опытной группе ( $r = -0,92$ ). Самые низкие значения коэффициента корреляции выявлены в контрольной группе на 21-е и 28-е сутки –  $r = -0,04$  и  $r = -0,05$  соответственно, что говорит практически об отсутствии корреляционной связи. Во 2-й и 3-й опытных группах определялась средняя отрицательная корреляционная связь на всех сроках эксперимента (коэффициент варьирует от  $-0,15$  до  $-0,20$ ). Однако, в 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») к 28-м суткам корреляционная связь усилилась ( $r = -0,37$ ).



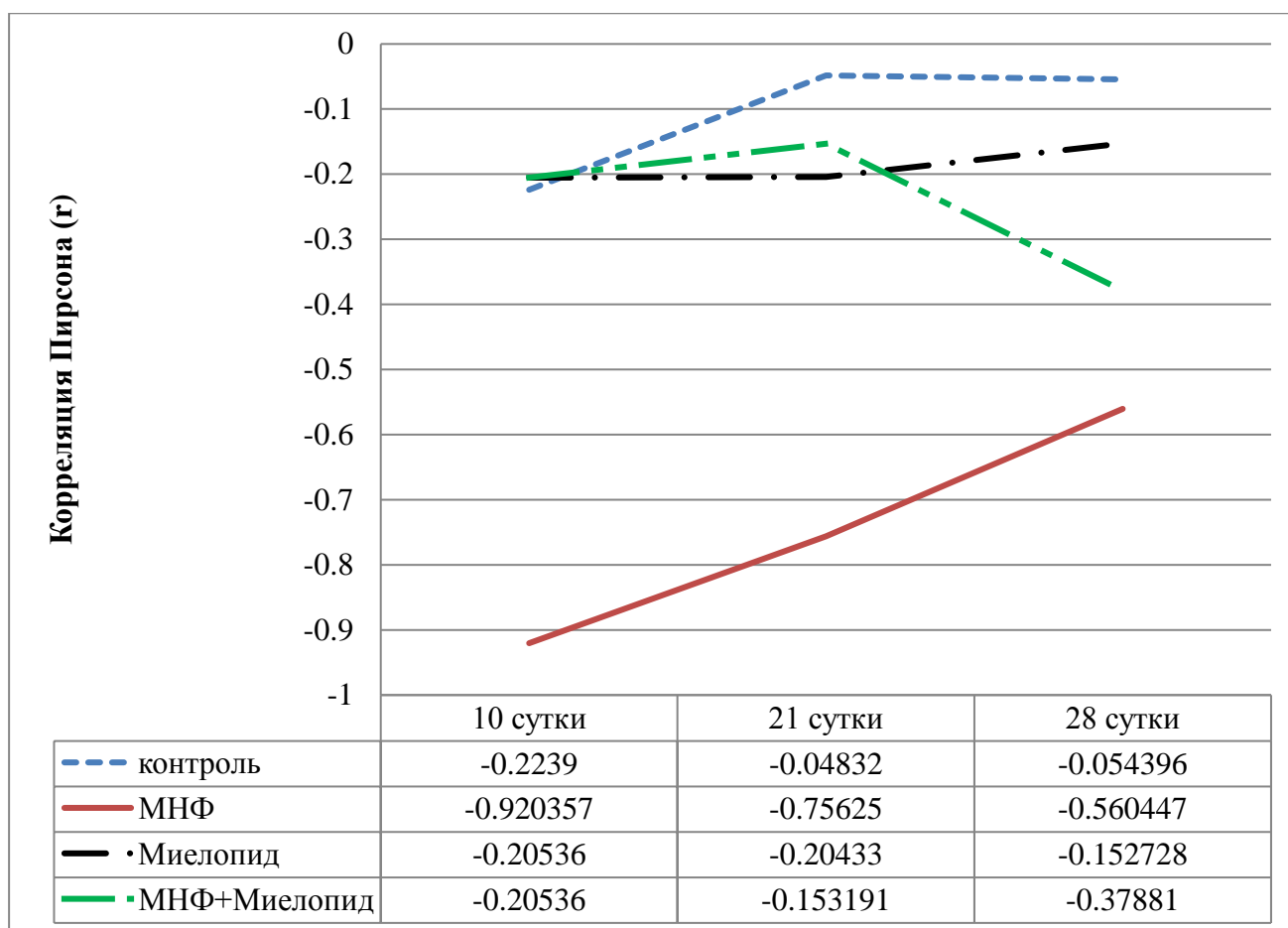


Рисунок 6 – Значения коэффициента корреляции при анализе корреляционной зависимости между уровнем артериовенулярного шунтирования и перфузией мягких тканей.

Исследование среднего диаметра капилляров в микроциркуляторном русле при экспериментальной критической ишемии конечности показало следующее (Таблица 17). В контрольной группе в сравнении с интактной диаметр капилляров был статистически значимо ниже на всех сроках эксперимента: на 10-е сутки на 47,6%, на 21-е – на 35,6%, на 28-е – на 36,2%. В 1-й опытной группе (МНФ) исследуемый показатель был статистически значимо выше на 10 сутки – на 47,8%, на 21 сутки – на 26,1%, на 28 суток – 45,7% в сравнении с контрольной группой. Во 2-й опытной группе («Миелопид») диаметр капилляров так же был выше: на 10-е сутки на 27,2%, на 21-е – на 20,6%, на 28-е – на 52,3%, – в сравнении с контрольной группой. Диаметр капилляров в 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») на 10-е сутки был статистически значимо

выше на 63,9%, на 21-е – на 40,5%, на 28-е – на 64,9% при сравнении с контрольной группой.

Таблица 17 - Динамика изменения среднего диаметра капилляров в группах экспериментальных животных.

Группы животных		Диаметр капилляров, мкм		
		10 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Интактная (n=10)</b>	M ± m	7,1±1,7	7,1±1,7	7,1±1,7
	t	0,52	0,52	0,52
<b>Контрольная (n=30)</b>	M ± m	3,72±0,19*	4,57±0,24*	4,53±0,24*
	t	0,51	0,45	0,49
<b>1-я опытная (МНФ) (n=30)</b>	M ± m	5,46±0,55#	5,76±0,28#	6,6±0,18#
	t	1,18	0,61	0,38
<b>2-я опытная («Миелопид» (n=30)</b>	M ± m	4,73±0,02#	5,51±0,33#	6,9±0,13#
	t	0,04	0,62	0,25
<b>3-я опытная (МНФ + «Миелопид» (n=30)</b>	M ± m	6,1±0,39#	6,42±0,26#	7,47±0,17#
	t	0,85	0,51	0,32

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами. М – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, t – доверительный интервал.

Динамика изменения плотности капиллярной сети в группах экспериментальных животных изучена путем определения количества капилляров в стандартном поле зрения окуляра микрометра (Таблица 18). В контрольной группе исследуемый параметр был статистически значимо ниже на всех сроках наблюдения в сравнении с интактной: на 10-е сутки на 36,7%, на 21-е – на 24,4%, на 28-е – на 14,4%. Плотность капилляров в ишемизированной конечности в 1-ой опытной группе (МНФ) была выше по сравнению с контрольной на 10-е сутки на 12,7%, на 21-е – на 25,4% и на 28-е – на 22,4%. Во 2-й опытной группе («Миелопид») выявлено увеличение плотности капиллярной сети на 10-е сутки на 39%, на 21-е – на 38,9%, на 28-е – на 61,3% в сравнении с контрольной группой. В 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») плотность капилляров также была выше на всех сроках эксперимента в сравнении с

контрольной группой: на 10-е сутки на 20,5%, на 21-е – на 38,9%, на 28-е – на 32,7%.

Таблица 18 - Динамика изменения плотности капиллярной сети в группах экспериментальных животных.

Группы животных		Плотность капиллярной сети		
		10 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Интактная (n=10)</b>	M ± m	33±1,5	33±1,5	33±1,5
	t	0,86	0,86	0,86
<b>Контрольная (n=30)</b>	M ± m	20,87±0,50*	24,95±0,44*	28,25±0,30*
	t	1,01	0,93	0,56
<b>1-я опытная (МНФ) (n=30)</b>	M ± m	23,53±0,48#	31,29±0,33#	34,57±0,27#
	t	1,04	0,76	0,59
<b>2-я опытная («Миелопид» (n=30)</b>	M ± m	29,01±0,36#	34,68±0,77#	45,57±0,77#
	t	0,76	1,43	1,51
<b>3-я опытная (МНФ + «Миелопид» (n=30)</b>	M ± m	25,15±0,47#	34,67±0,46#	37,5±0,60#
	t	0,89	0,99	1,25

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами. М – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, t – доверительный интервал.

При анализе корреляционной зависимости (Рисунок 7) между плотностью капиллярной сети и перфузией тканей на различных сроках эксперимента во всех исследуемых группах выявлено следующее. Самые высокие показатели перфузии тканей наблюдаются в группах животных, которые имеют высокие значения плотности капиллярной сети. Самая сильная положительная корреляционная связь наблюдается на 10-е сутки в 1-й опытной группе ( $r = 0,84$ ). В контрольной группе на всех сроках выявлена слабая корреляционная связь ( $r =$  от  $-0,15$  до  $0,24$ ), причем на 21-е и 28-е сутки связь носила отрицательный характер. Во 2-й и 3-й опытных группах определялась средняя положительная корреляционная связь на 28-е сутки во 2-й группе ( $r = 0,64$ ) и на 21-е сутки в 3-й ( $r = 0,55$ ).

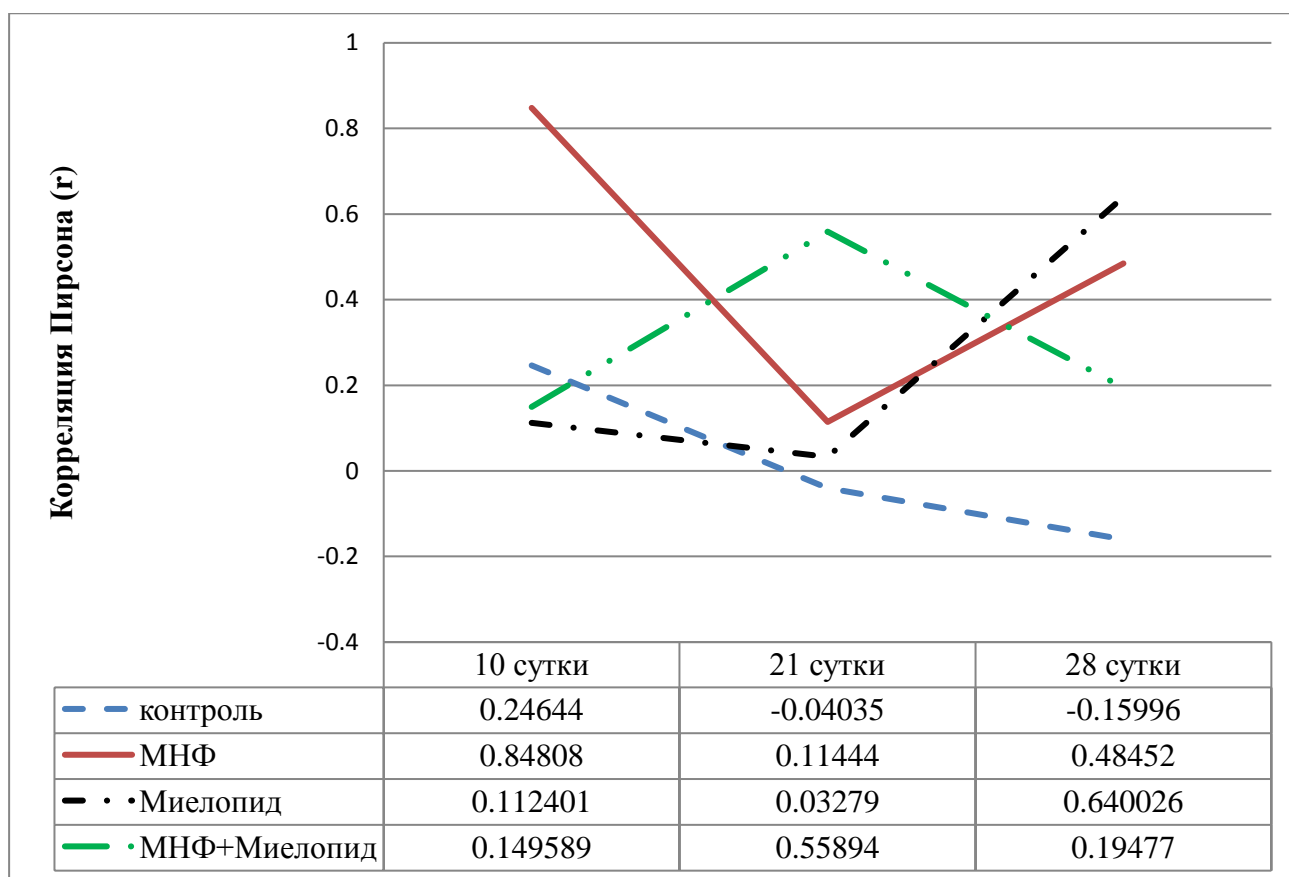


Рисунок 7 – Значения коэффициента корреляции при анализе корреляционной зависимости между плотностью капиллярной сети и перфузией мягких тканей.

При изучении удельной площади некроза в мышечных волокнах на различных сроках эксперимента в контрольной и опытных группах получены следующие результаты (Таблица 19). В 1-й опытной группе (МНФ) площадь некротизированных тканей в сравнении с контрольной группой на 10-е сутки была ниже на 23,9%, на 21-е – на 14,4%, на 28-е – на 10,6%. Во 2-й опытной группе («Миелопид») исследуемый параметр также был ниже в сравнении с контролем на 10-е сутки на 21,5%, на 21-е – на 12,4%, на 28-е – на 9,1%. При комбинированном применении МНФ и препарата «Миелопид» (3-я опытная группа) площадь некроза уменьшилась на 10-е сутки на 24,1%, на 21-е – на 13,5%, на 28-е – на 10,6%.

Таблица 19 - Динамика изменения удельной площади некроза в группах экспериментальных животных.

Группы животных		Удельная площадь некроза, %		
		10 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Контрольная (n=30)</b>	M ± m	37,46±0,14	19,94±0,35	13,1±0,39
	t	0,28	0,66	0,81
<b>1-я опытная (МНФ) (n=30)</b>	M ± m	13,55±1,07*	5,52±0,34*	2,51±0,09*
	t	2,20	0,68	0,24
<b>2-я опытная («Миелопид») (n=30)</b>	M ± m	16±0,71*	7,5±0,39*	4±0,28*
	t	1,31	0,75	0,51
<b>3-я опытная (МНФ + «Миелопид») (n=30)</b>	M ± m	13,4±1,05*	6,39±0,16*	2,51±0,09*
	t	1,96	0,31	0,24

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами. М – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, t – доверительный интервал.

При анализе корреляционной зависимости (Рисунок 8) между площадью некроза и перфузией тканей на различных сроках эксперимента во всех исследуемых группах выявлено следующее. Самые высокие показатели перфузии тканей наблюдаются в группах животных, которые имеют низкие значения площади некроза. Самая сильная отрицательная корреляционная связь наблюдается на 10-е сутки в 1-й опытной группе ( $r = -0,92$ ). В контрольной группе на 10-е и 28-е сутки выявлена слабая отрицательная корреляционная связь ( $r = -0,15$  и  $r = -0,28$ ), а на 21-е – средняя положительная ( $r = 0,55$ ). Во 2-й опытной группе на всех сроках наблюдалась средняя отрицательная корреляционная связь ( $r =$  от  $-0,35$  до  $-0,49$ ). В 3-й опытной группе корреляционная связь носила слабый отрицательный характер на всех сроках исследования ( $r =$  от  $-0,14$  до  $-0,22$ ).

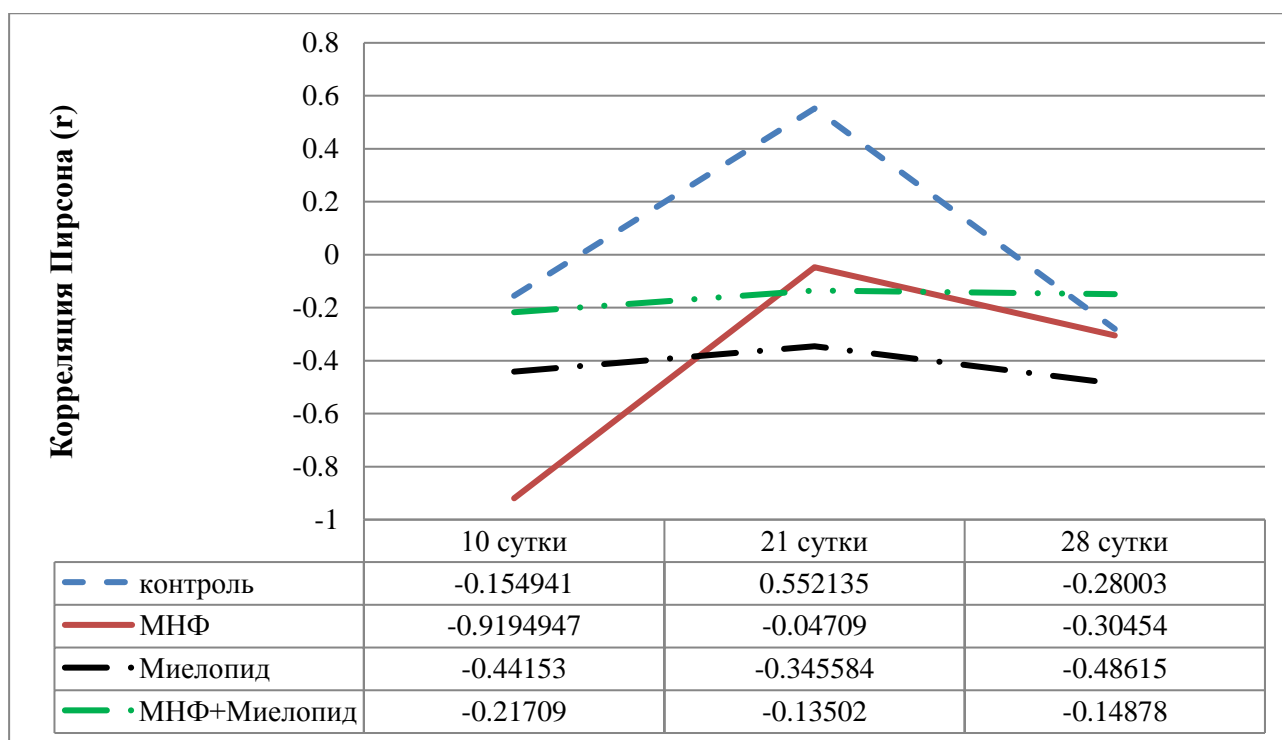


Рисунок 8 – Значения коэффициента корреляции при анализе корреляционной зависимости между площадью некроза и перфузией мягких тканей.

Оценка влияния методов лечения экспериментальной критической ишемии конечности, выбранных в данном исследовании, на процессы регенерации в ишемизированных мышцах осуществлялась путем определения среднего диаметра мышечных волокон (Таблица 20).

В контрольной группе животных на 10-е сутки эксперимента наблюдалось увеличение диаметра мышечных волокон в сравнении с интактной группой на 58,2%, на 28-е – уменьшение – на 18,2%. В 1-й опытной группе (MNF) исследуемый показатель при сравнении с контрольной на 10-е сутки уменьшался на 20,8%, а на 28-е – увеличивался – на 44,5%. Во 2-й опытной группе («Миелопид») диаметр мышечных волокон так же на 10-е сутки был ниже на 25% ,а на 28-е – повышался на 25,5%. В 3-й опытной группе (MNF + «Миелопид») наблюдалась аналогичная тенденция: диаметр мышечных волокон на 10-е сутки был ниже на 14,3% ,а на 28-е – выше на 25,5%. На 21-е сутки экспериментального исследования статистически значимых различий во всех группах животных выявлено не было.

Таблица 20 - Динамика изменения среднего диаметра мышечных волокон в группах экспериментальных животных.

Группы животных		Диаметр мышечных волокон, мкм		
		10 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Интактная (n=10)</b>	M ± m	10,2±1,3	10,2±1,3	10,2±1,3
	t	0,23	0,23	0,23
<b>Контрольная (n=30)</b>	M ± m	16,14±0,27*	10,34±0,29	8,34±0,21*
	t	0,56	0,61	0,39
<b>1-я опытная (МНФ) (n=30)</b>	M ± m	12,78±0,47#	9,86±0,34	12,05±0,23#
	t	0,88	0,68	0,46
<b>2-я опытная («Миелопид» (n=30)</b>	M ± m	12,1±0,16#	10,12±0,11	10,1±0,11#
	t	0,31	0,33	0,21
<b>3-я опытная (МНФ + «Миелопид» (n=30)</b>	M ± m	13,84±0,48#	10,49±0,19	10,47±0,37#
	t	0,88	0,37	0,69

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами. М – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение, t – доверительный интервал.

На основании анализа мировой и отечественной литературы [2, 3, 48, 78] в качестве интегральных показателей, характеризующих процессы микроциркуляции, выбраны уровень перфузии мягких тканей, индекс артериовенулярного шунтирования, площадь некроза мышечных волокон и плотность капиллярной сети. При анализе корреляционной связи между интегральными показателями на различных сроках эксперимента во всех опытных группах установлено следующее (Таблицы 21, 22, 23):

- между площадью некроза мышечных волокон и уровнем перфузии выявлена отрицательная корреляционная связь;
- между уровнем АВШ и перфузией – отрицательная корреляционная связь;
- между площадью некроза и уровнем АВШ – положительная корреляционная связь;
- между площадью некроза и плотностью капиллярной сети – отрицательная корреляционная связь;

– между АВШ и плотностью капилляров – отрицательная корреляционная связь;

– между плотностью капилляров и перфузией ткани – положительная корреляционная связь;

Сила корреляционной связи варьировала от полного ее отсутствия ( $r = 0$ ) до сильной ( $r = 0,7$  (-0,7) – 1 (-1)). Функциональной связи ( $r = 1$  (-1)) между интегральными показателями микроциркуляции не установлено.



Таблица 21 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи интегральных показателей микроциркуляции на различных сроках эксперимента в 1-й опытной группе животных (МНФ)

Показатели	Перфузия тканей (10 сут)	Перфузия тканей (21 сут)	Перфузия тканей (28 сут)	Плотность капилляров (10 сут)	Плотность капилляров (21 сут)	Плотность капилляров (28 сут)	Индекс АВШ (10 сут)	Индекс АВШ (21 сут)	Индекс АВШ (28 сут)	Некроз мышц (10 сут)	Некроз мышц (21 сут)	Некроз мышц (28 сут)
Перфузия тканей (10 сут)	1	0,52	0,32	0,84	0,84	0,86	-0,92	-0,88	-0,51	-0,91	-0,36	-0,73
Перфузия тканей (21 сут)	0,52	1	0,60	0,34	0,11	0,04	-0,13	-0,76	0,09	-0,11	-0,55	-0,13
Перфузия тканей (28 сут)	0,32	0,60	1	0,19	0,16	0,48	0,21	-0,46	-0,56	-0,37	-0,18	-0,30
Плотность капилляров (10 сут)	0,84	0,34	0,19	1	0,74	0,66	-0,79	-0,76	-0,43	-0,79	-0,20	-0,64
Плотность капилляров (21 сут)	0,84	0,11	0,16	0,74	1	0,69	-0,84	-0,64	-0,48	-0,64	-0,27	-0,84
Плотность капилляров (28 сут)	0,86	0,04	0,48	0,66	0,69	1	-0,77	-0,88	-0,55	-0,83	-0,43	-0,71
Индекс АВШ (10 сут)	-0,92	-0,13	0,21	-0,79	-0,84	-0,77	1	0,83	0,56	0,71	0,31	0,85
Индекс АВШ (21 сут)	-0,88	-0,76	-0,46	-0,76	-0,64	-0,88	0,83	1	0,32	0,81	0,43	0,78
Индекс АВШ (28 сут)	-0,51	0,09	-0,56	-0,43	-0,48	-0,55	0,56	0,32	1	0,43	0,01	0,42
Некроз мышц (10 сут)	-0,91	-0,11	-0,37	-0,79	-0,64	-0,83	0,71	0,81	0,43	1	0,26	-0,46
Некроз мышц (21 сут)	-0,36	-0,55	-0,18	-0,20	-0,27	-0,43	0,31	0,43	0,01	0,26	1	-0,31
Некроз мышц (28 сут)	-0,73	-0,13	-0,30	-0,64	-0,84	-0,71	0,85	0,78	0,42	-0,46	-0,31	1

Таблица 22 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи интегральных показателей микроциркуляции на различных сроках эксперимента во 2-й опытной группе животных («Миелопид»)

Показатели	Перфузия тканей (10 сут)	Перфузия тканей (21 сут)	Перфузия тканей (28 сут)	Плотность капилляров (10 сут)	Плотность капилляров (21 сут)	Плотность капилляров (28 сут)	Индекс АВШ (10 сут)	Индекс АВШ (21 сут)	Индекс АВШ (28 сут)	Некроз мышц (10 сут)	Некроз мышц (21 сут)	Некроз мышц (28 сут)
Перфузия тканей (10 сут)	1	-0,03	0,40	0,11	0,15	0,22	-0,22	-0,21	-0,33	-0,44	-0,44	-0,57
Перфузия тканей (21 сут)	-0,03	1	0,34	0,38	0,03	0,29	-0,05	-0,21	-0,21	-0,33	-0,35	-0,82
Перфузия тканей (28 сут)	0,40	0,34	1	0,33	0,84	0,64	-0,33	-0,32	-0,15	-0,03	-0,19	-0,49
Плотность капилляров (10 сут)	0,11	0,38	0,33	1	0,04	0,12	-0,91	-0,36	-0,66	-0,02	-0,14	-0,46
Плотность капилляров (21 сут)	0,15	0,03	0,84	0,04	1	0,51	-0,16	-0,79	0,08	-0,05	-0,13	-0,18
Плотность капилляров (28 сут)	0,22	0,29	0,64	0,12	0,51	1	-0,01	-0,38	-0,06	-0,41	-0,33	-0,57
Индекс АВШ (10 сут)	-0,22	-0,05	-0,33	-0,91	-0,16	-0,01	1	0,25	0,53	0,07	0,04	0,39
Индекс АВШ (21 сут)	-0,21	-0,21	-0,32	-0,36	-0,79	-0,38	0,25	1	0,15	0,03	0,16	0,13
Индекс АВШ (28 сут)	-0,33	-0,21	-0,15	-0,66	0,08	-0,06	0,53	0,15	1	0,58	0,49	0,33
Некроз мышц (10 сут)	-0,44	-0,33	-0,03	-0,02	-0,05	-0,41	0,07	0,03	0,58	1	0,22	0,06
Некроз мышц (21 сут)	-0,44	-0,35	-0,19	-0,14	-0,13	-0,33	0,04	0,16	0,49	0,22	1	0,55
Некроз мышц (28 сут)	-0,57	-0,82	-0,49	-0,46	-0,18	-0,57	0,39	0,13	0,33	0,06	0,55	1

Таблица 23 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи интегральных показателей микроциркуляции на различных сроках эксперимента в 3-й опытной группе животных (МНФ + «Миелопид»)

Показатели	Перфузия тканей (10 сут)	Перфузия тканей (21 сут)	Перфузия тканей (28 сут)	Плотность капилляров (10 сут)	Плотность капилляров (21 сут)	Плотность капилляров (28 сут)	Индекс АВШ (10 сут)	Индекс АВШ (21 сут)	Индекс АВШ (28 сут)	Некроз мышц (10 сут)	Некроз мышц (21 сут)	Некроз мышц (28 сут)
Перфузия тканей (10 сут)	1	0,70	0,39	0,15	0,67	0,09	-0,21	-0,55	0,02	-0,22	-0,39	-0,31
Перфузия тканей (21 сут)	0,70	1	0,29	0,18	0,56	0,05	-0,71	-0,15	-0,17	-0,02	-0,14	-0,32
Перфузия тканей (28 сут)	0,39	0,29	1	0,25	0,33	0,19	-0,30	-0,02	-0,38	-0,25	-0,04	-0,15
Плотность капилляров (10 сут)	0,15	0,18	0,25	1	0,48	0,36	-0,88	-0,06	-0,30	-0,44	-0,73	-0,30
Плотность капилляров (21 сут)	0,67	0,56	0,33	0,48	1	0,63	-0,58	-0,30	-0,27	-0,17	-0,78	-0,52
Плотность капилляров (28 сут)	0,09	0,05	0,19	0,36	0,63	1	-0,46	-0,27	-0,78	-0,02	-0,52	-0,39
Индекс АВШ (10 сут)	-0,21	-0,71	-0,30	-0,88	-0,58	-0,46	1	0,29	0,25	0,36	0,66	0,78
Индекс АВШ (21 сут)	-0,55	-0,15	-0,02	-0,06	-0,30	-0,27	0,29	1	0,26	0,37	0,26	0,58
Индекс АВШ (28 сут)	0,02	-0,17	-0,38	-0,30	-0,27	-0,78	0,25	0,26	1	0,26	0,59	0,33
Некроз мышц (10 сут)	-0,22	-0,02	-0,25	-0,44	-0,17	-0,02	0,36	0,37	0,26	1	0,15	-0,01
Некроз мышц (21 сут)	-0,39	-0,14	-0,04	-0,73	-0,78	-0,52	0,66	0,26	0,59	0,15	1	0,55
Некроз мышц (28 сут)	-0,31	-0,32	-0,15	-0,30	-0,52	-0,39	0,78	0,58	0,33	-0,01	0,55	1

## Резюме

Таким образом, в ходе проведенного исследования подтверждено положительное влияние МНФ, препарата «Миелопид», а также их комбинированного применения, на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза при лечении экспериментальной критической ишемии конечностей. Под действием МНФ по разработанному способу увеличивались уровень перфузии тканей (на 96,5%) и плотность капиллярной сети (на 20,2%), снижались ИАВШ (на 19,9%) и площадь некроза мышечных волокон (на 16,3%) в сравнении с контрольной группой. При лечении препаратом «Миелопид» возрастали перфузия тканей (на 50,3%) и плотность капилляров (на 46,4%), а зона некроза и АВШ уменьшались (на 14,3% и 12,1% соответственно) при сравнении с контролем. Комбинированное применение МНФ и препарата «Миелопид» также вызывало увеличение уровня перфузии (на 112,9%) и плотности капиллярной сети (на 30,7%), снижение площади некроза мышечных волокон (на 16,1%) и ИАВШ (на 29,1%) в сравнении с контрольной группой исследования.

### 3.4. Результаты лечения экспериментальной критической ишемии конечности по данным гистологического исследования

При микроскопическом изучении гистологических препаратов ишемизированных мышц у животных в контрольной группе на 10-е сутки были выявлены крупные участки некроза (Рисунок 9 А). На периферии и в глубине некротизированной зоны наблюдали картину тяжелого воспаления в виде выраженной инфильтрации сегментоядерными нейтрофилами и макрофагами. Выявлен интерстициальный отек и полнокровие капилляров (Рисунок 9 Б).

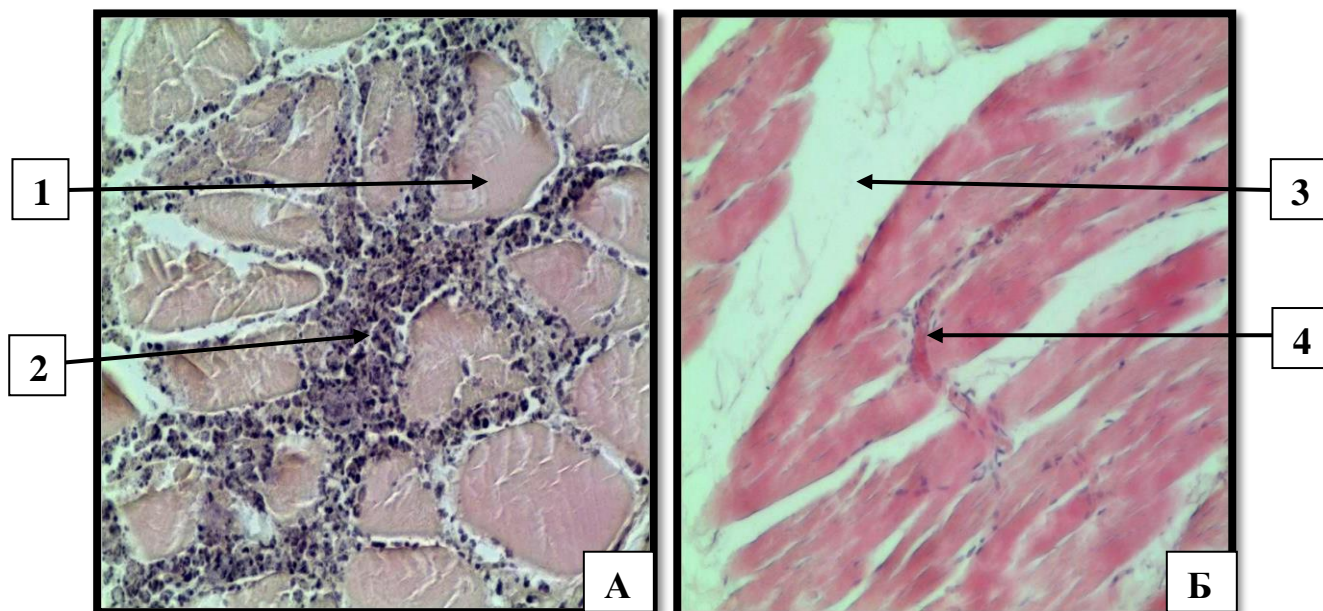


Рисунок 9 – Микрофотография участка мышечных волокон на 10-е сутки эксперимента в контрольной группе животных. А – поперечный срез (1 – некроз мышечных волокон, 2 – воспалительная инфильтрация нейтрофилами и макрофагами). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 200$ . Б – продольный срез (3 – отек интерстиция, 4 – полнокровие капилляров). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 100$ .

В 1-й опытной группе, на фоне лечения МНФ, на 10-е сутки эксперимента определялись участки воспалительной инфильтрации. Инфильтрат был представлен нейтрофилами и значительным количеством макрофагов и гистиоцитов. Выявлены обширные разрастания грануляционной ткани, состоящей из сосудов капиллярного типа, фибробластов и регенерирующих миоцитов. Имелись единичные новообразованные сосуды капиллярного типа (Рисунок 10).

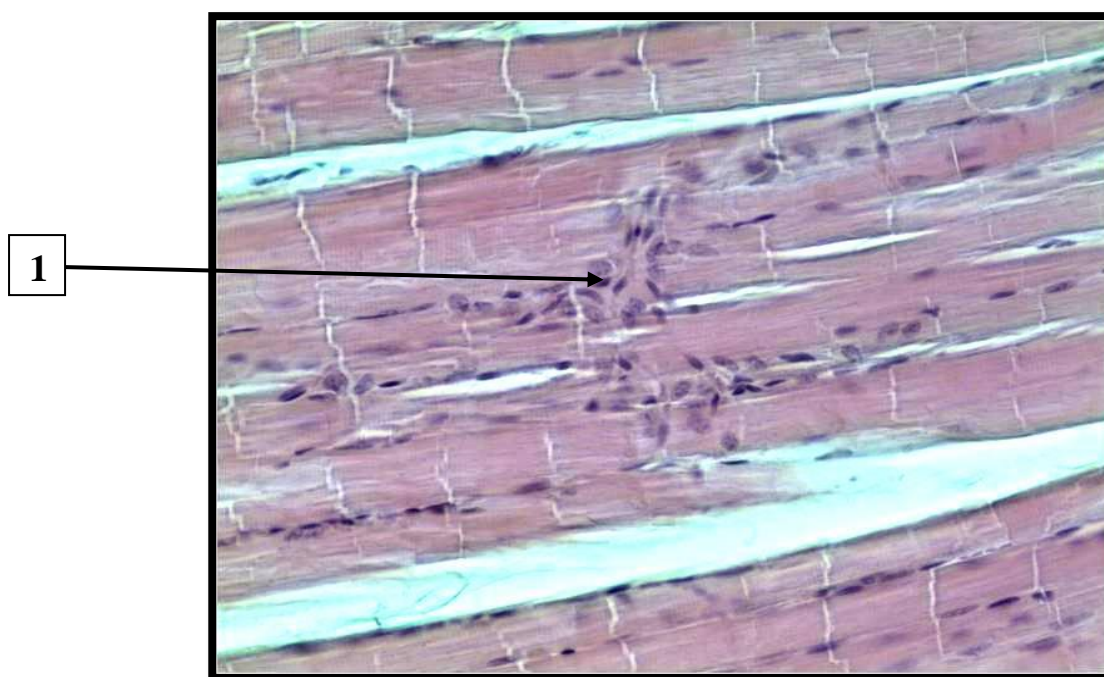


Рисунок 10 – Микрофотография участка мышечных волокон на 10-е сутки эксперимента в 1-й опытной группе (МНФ) (1 – единичный формирующийся капилляр). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 400$ .

Во 2-й опытной группе после введения препарата «Миелопид» на 10-е сутки небольшие очаги некроза были инфильтрированы нейтрофилами, макрофагами и гистиоцитами. Определялось неравномерное кровенаполнение микроциркуляторного русла, умеренный отек интерстиция. Появлялись очаги новообразованной грануляционной ткани, представленной сосудами капиллярного типа, фибробластами и немногочисленными регенерирующими миоцитами (Рисунок 11).

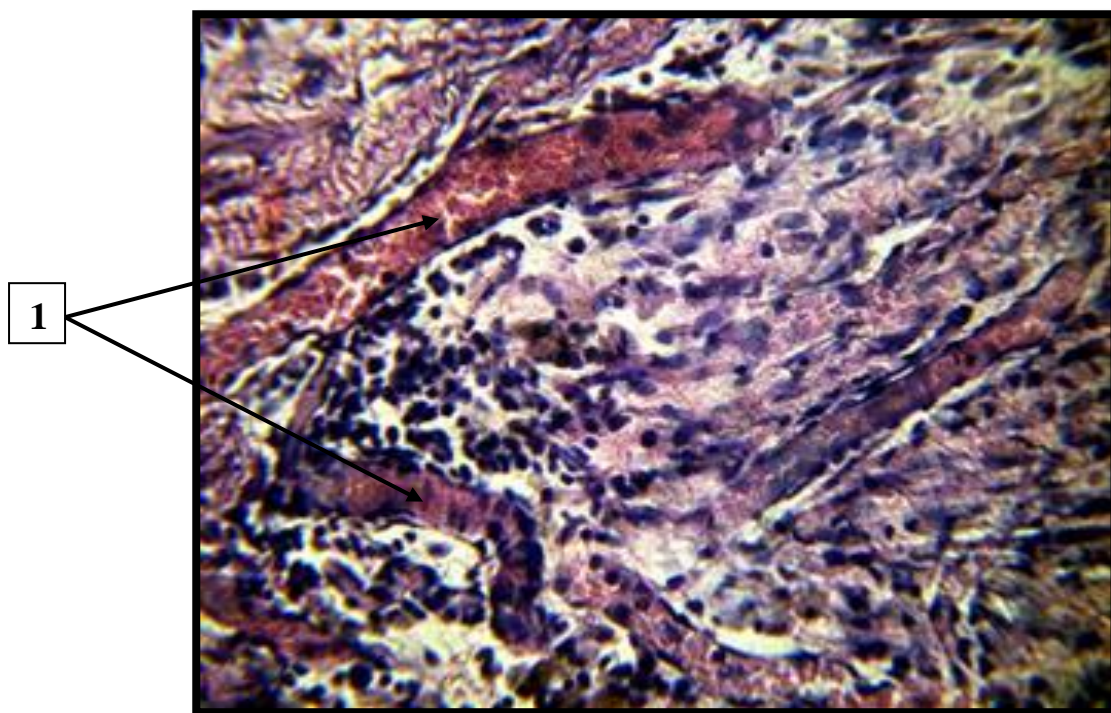


Рисунок 11 – Микрофотография участка мышечных волокон на 10-е сутки эксперимента во 2-й опытной группе («Миелопид») (1 – большое количество полнокровных сосудов микроциркуляторного русла). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 400$ .

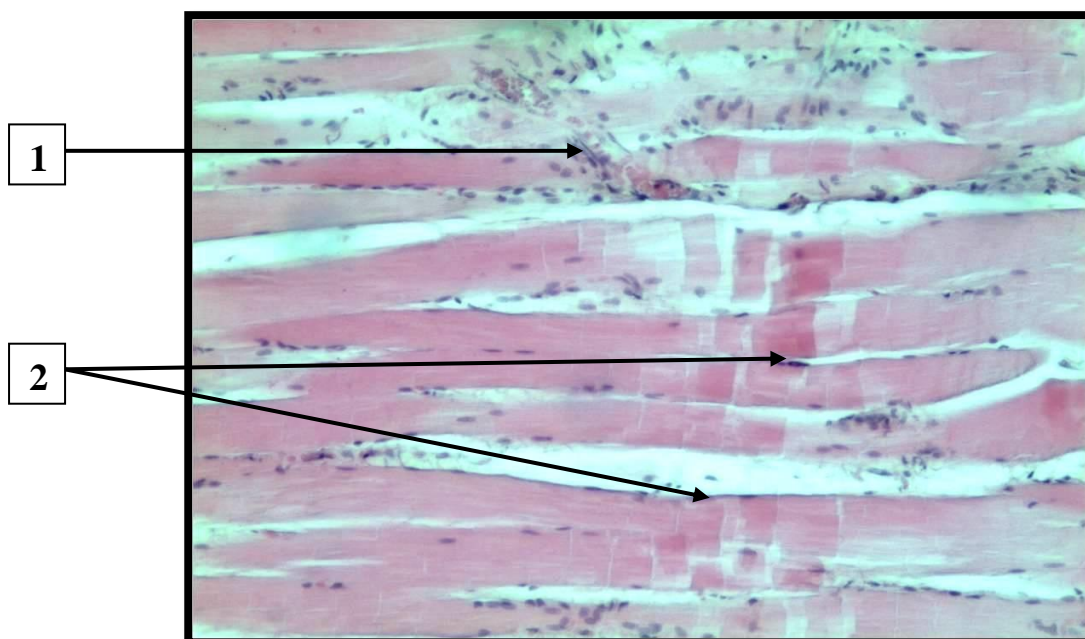


Рисунок 12 – Микрофотография участка мышечных волокон на 10-е сутки эксперимента в 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») (1 – новообразованный капилляр, 2 – немногочисленные миобласты). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 200$ .

В 3-й опытной группе, на фоне комбинированного лечения МНФ и препаратом «Миелопид», на 10-е сутки эксперимента наблюдали участки некроза мышечных волокон, с воспалительной инфильтрацией. Имелись новообразованные капилляры, немногочисленные регенерирующие миобласты (Рисунок 12).

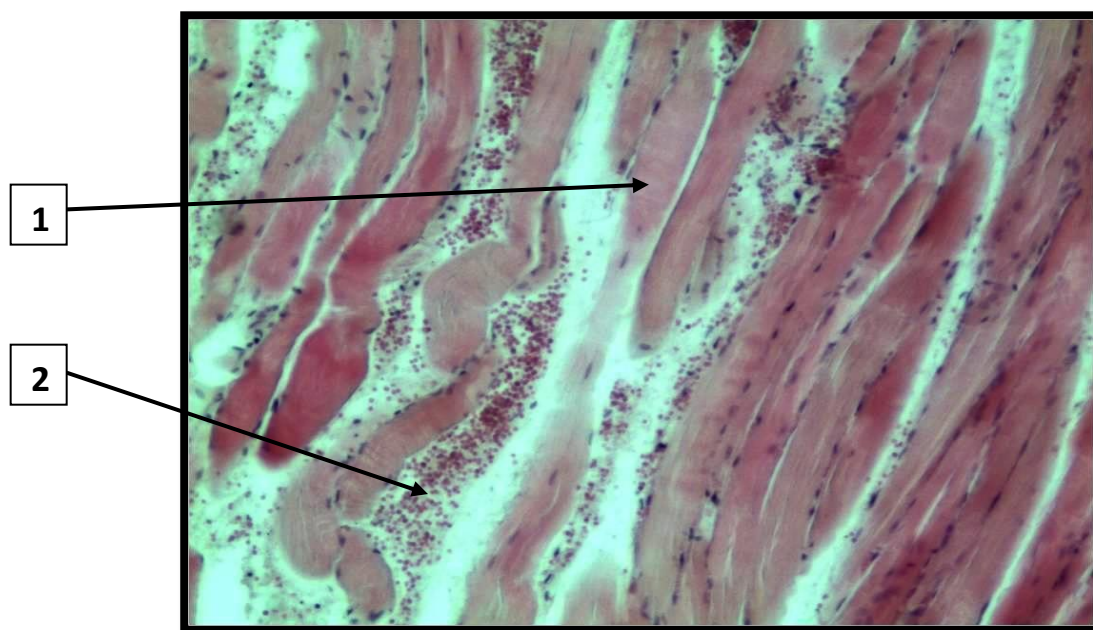


Рисунок 13 – Микрофотография участка мышечных волокон на 21-е сутки эксперимента в контрольной группе (1 – некрозы мышечных волокон, 2 – очаговые кровоизлияния между мышечными волокнами). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 100$ .

В контрольной группе животных на фоне моделирования критической ишемии конечности на 21-е сутки эксперимента наблюдали полиморфную картину некротических и дистрофических изменений (Рисунок 13).

На 21-е сутки эксперимента в 1-й опытной группе (МНФ) продолжалось замещение участков некроза грануляционной тканью, происходила регенерация мышечных волокон (Рисунок 14 Б). Воспалительная реакция стихала. Вне зон некроза и грануляционной ткани формировались новообразованные сосуды (Рисунок 14 А).



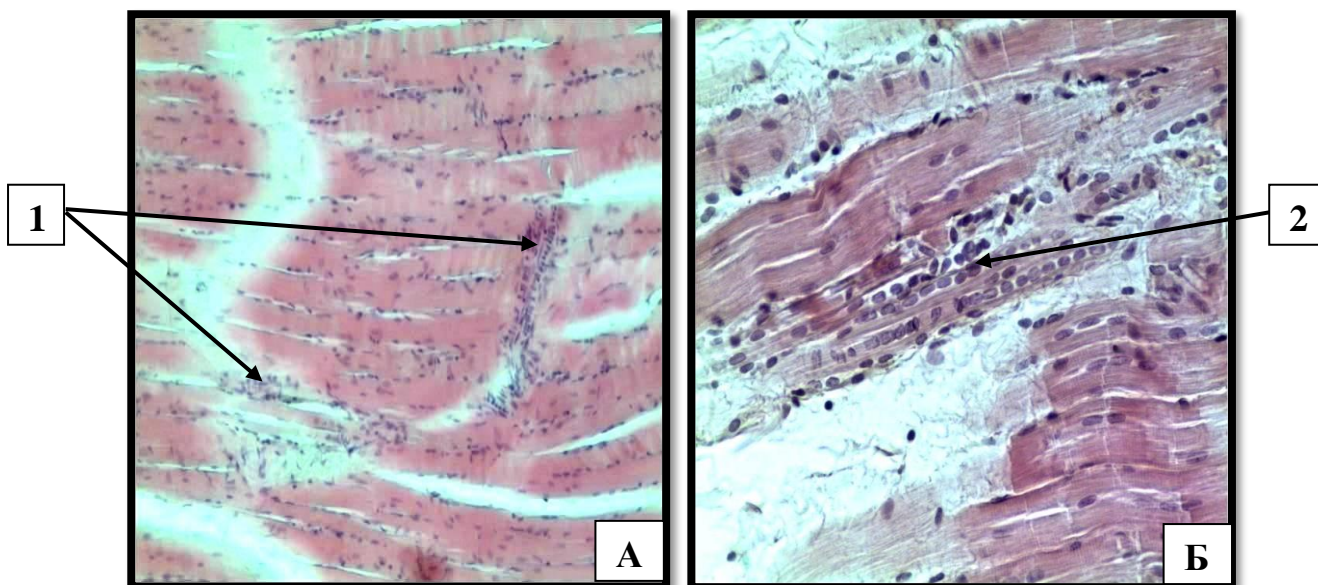


Рисунок 14 – Микрофотография участка мышечных волокон на 21-е сутки эксперимента в 1-й опытной группе (МНФ). А (1 – новообразованные сосуды вне зоны фиброзно-грануляционной ткани). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 100$ . Б (2 – линейно упорядоченные скопления миобластов). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 400$ .

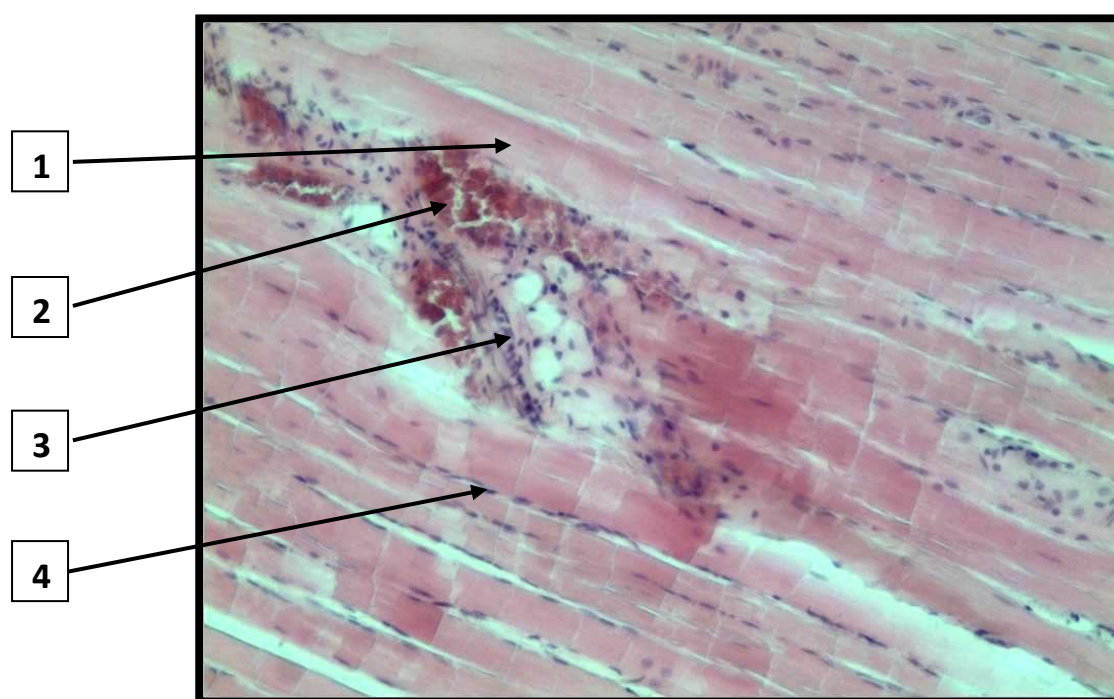


Рисунок 15 – Микрофотография участка мышечных волокон на 21-е сутки эксперимента во 2-й опытной группе («Миелопид») (1 – некрозы мышечных волокон, 2 – кровоизлияния между мышечными волокнами, 3 – запустевание капилляров, 4 – скопления миобластов). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 200$ .

На 21-е сутки выявлялись небольшие очаги некрозов с разрастанием фиброзно-грануляционной ткани и формирование капиллярной сети. Воспалительная реакция с инфильтрацией ткани макрофагами и гистиоцитами была выражена незначительно. Появлялись обширные скопления регенерирующих миобластов. На отдельных участках сохранялись дистрофические и атрофические изменения мышечных волокон (Рисунок 15).

В 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») на 21-е сутки сохранялись небольшие очаги заместительного некроза с элементами регенерации отдельных мышечных волокон и началом образования капиллярной сети (Рисунок 16).

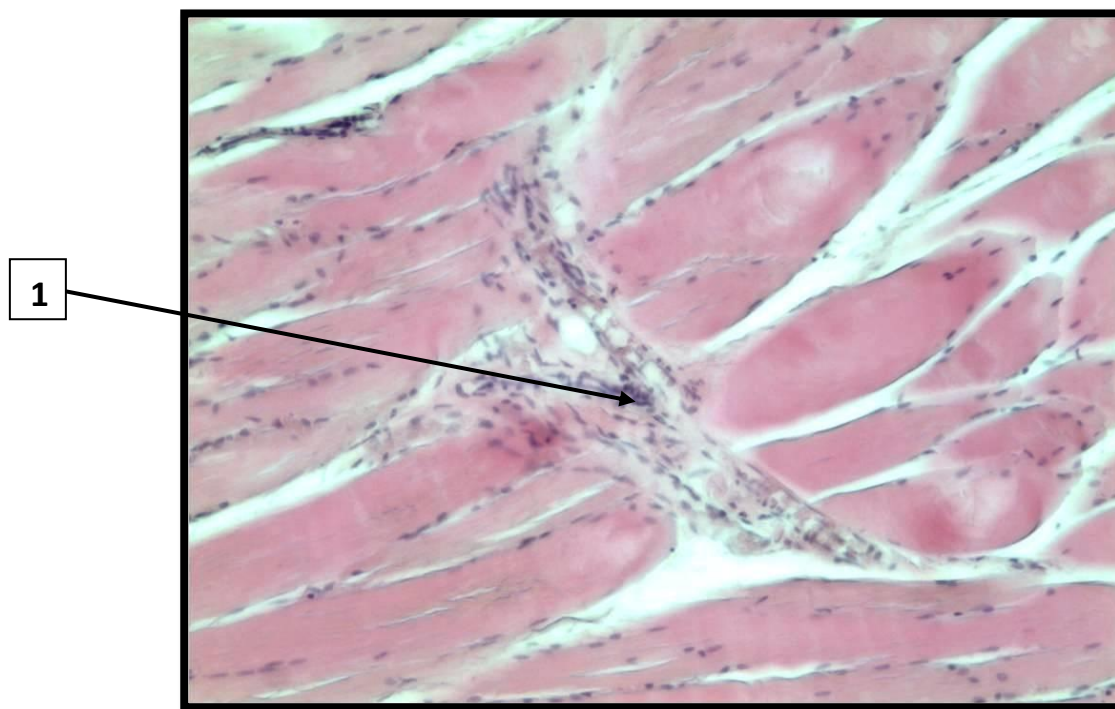


Рисунок 16 – Микрофотография участка мышечных волокон на 21-е сутки эксперимента в 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») (1 – новообразованный сосуд микроциркуляторного русла). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 400$ .

На 28-е сутки в контрольной группе зона некротизированной ткани постепенно замещалась грануляционной (Рисунок 17 А), наблюдали скопления регенерирующих миобластов (Рисунок 17 Б).

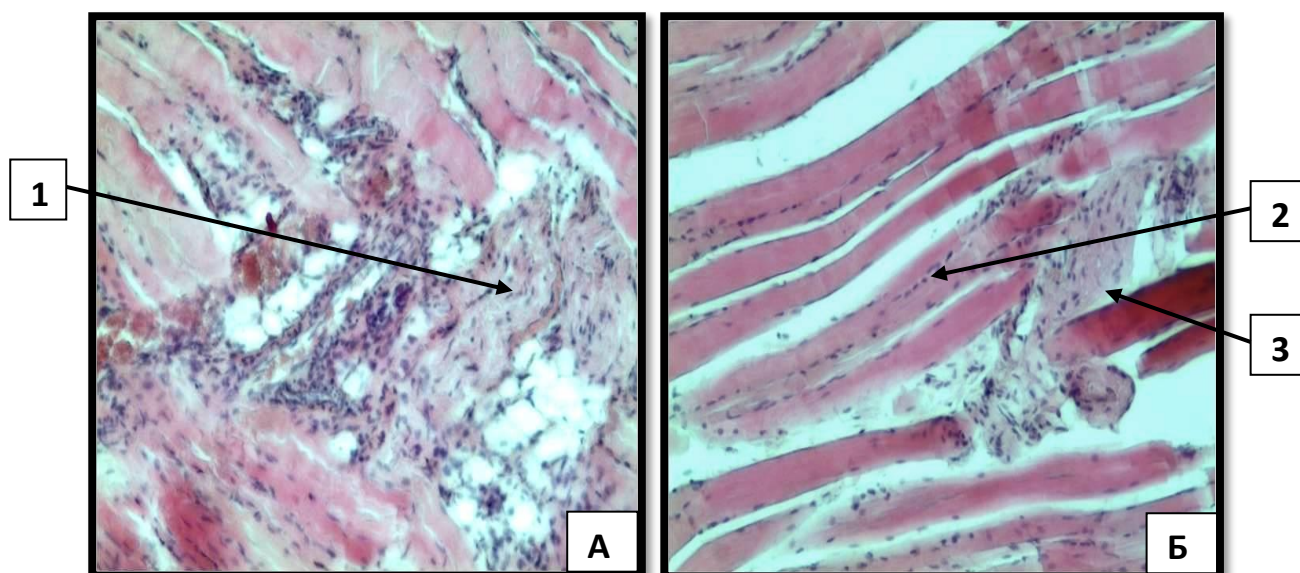


Рисунок 17 – Микрофотография участка мышечных волокон на 28-е сутки эксперимента в контрольной группе. А (1 – очаги заместительного склероза). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 200$ . Б (2 – миобласты, 3 – разрастание соединительной ткани). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 200$ .

В 1-й опытной группе после лечения МНФ на 28-е сутки определялись отдельные участки некроза мышечных волокон. Имелись новообразованные сосуды капиллярного типа, миобласты в большом количестве (Рисунок 18).

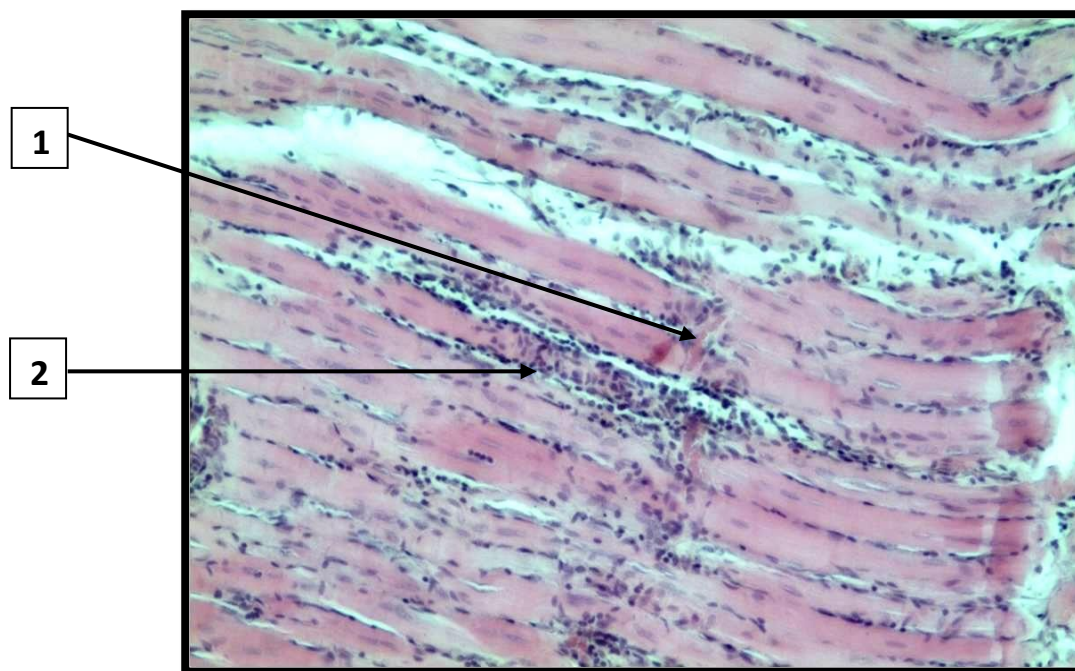


Рисунок 18 – Микрофотография участка мышечных волокон на 28-е сутки эксперимента в 1-й опытной группе (МНФ) (1 – новообразованный сосуд, 2 – скопления миобластов). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 200$ .

К 28-м суткам во 2-й опытной группе («Миелопид») зона некроза замещалась рыхловолокнистой соединительной тканью. Воспалительная инфильтрация отсутствовала. В неповрежденных мышцах отмечалась пролиферация капилляров, не связанных с грануляционной тканью. Дистрофические и атрофические изменения мышечных волокон отсутствовали, завершался процесс регенерации мышечной ткани (Рисунок 19).

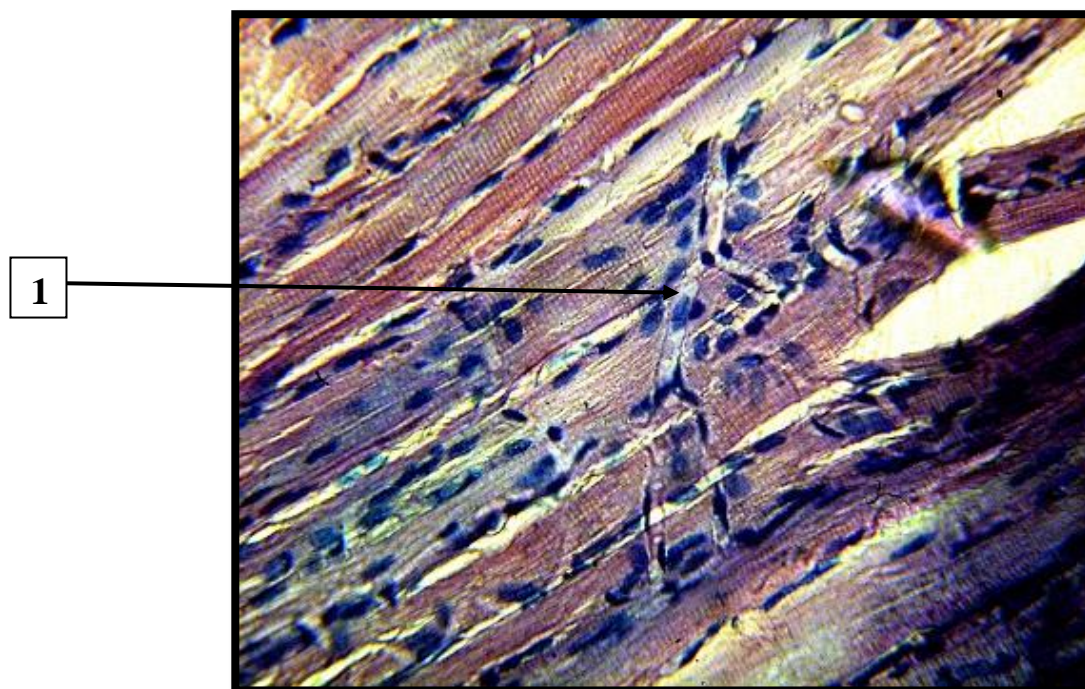


Рисунок 19 – Микрофотография участка мышечных волокон на 28-е сутки эксперимента во 2-й опытной группе («Миелопид») (1 – новообразованные капилляры в неповрежденных мышцах). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 400$ .

В 3-й опытной группе при комбинированном лечении МНФ и препаратом «Миелопид» на 28-е сутки завершался процесс замещения участков некроза соединительной тканью, между которыми находились новообразованные сосуды (Рисунок 20).

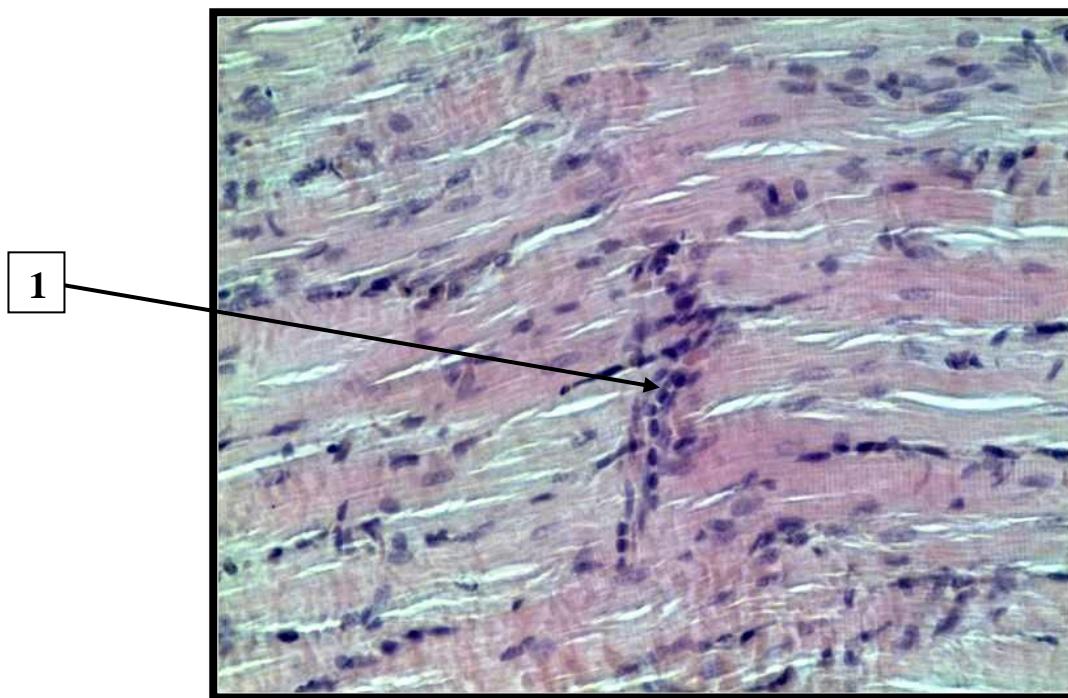


Рисунок 20 – Микрофотография участка мышечных волокон на 28-е сутки эксперимента в 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») (1 – новообразованные капилляры). Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 400$ .

### Резюме

Таким образом, анализ изготовленных гистологических препаратов показал позитивное влияние МНФ, препарата «Миелопид» и их комбинированного применения на процессы неоваскулогенеза и регенерации мышечных волокон при экспериментальной критической ишемии конечностей. Неоваскулогенез наблюдался уже на 10-е сутки эксперимента в 1-й (МНФ) и 3-й (МНФ + «Миелопид») опытных группах. Новообразованные сосуды были представлены капиллярами, находящимися в толще миобластов. Во 2-й опытной группе («Миелопид») рост новообразованных сосудов происходил с 21-х суток и завершался к 28-м. В контрольной группе животных неоваскулогенез не был установлен: гистологическая картина была представлена разрастанием грануляционной ткани и единичными скоплениями миобластов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хроническая ишемия нижних конечностей регистрируется в 5–8% случаев у лиц старше 50 лет, при наличии таких факторов риска, как курение, сахарный диабет, гиперлипидемия и артериальная гипертония – примерно у 30% [81, 154]. В Российской Федерации количество пациентов с перемежающейся хромотой составляет около 5% среди лиц пожилого возраста, то есть около 2 млн человек [1, 44].

Основным методом терапии КИНК остаются хирургическая и эндоваскулярная реваскуляризация конечности. Несмотря на впечатляющие достижения в этих областях [154], примерно у 20-40% пациентов с КИНК такие технологии не могут быть применены вследствие особенностей анатомической локализации поражений магистральных сосудов, длительности заболевания или сопутствующей патологии [185]. Также актуальной остается проблема раннего послеоперационного тромбоза шунтов и протезов. В силу этих причин ампутация конечности часто оказывается единственной возможностью продлить жизнь больному с КИНК [41, 44, 195].

Следовательно, должно приветствоваться развитие новых, менее инвазивных направлений в качестве дополнения к уже существующим методам лечения больных с окклюзирующими заболеваниями артерий нижних конечностей [90, 95].

Прорывом в поиске новых способов лечения хронической ишемии конечностей стала разработка инновационных технологий терапевтического ангиогенеза – стимуляции роста кровеносных сосудов и коллатералей в зоне ишемии с помощью фармакологических и иных средств [41]. На основании анализа мировой литературы опубликован обзор принципов, фундаментальных концепций и возможностей генно-инженерных технологий стимуляции ангиогенеза [22].

Следует подчеркнуть, что современные методики генноинженерной стимуляции неоваскулогенеза являются не только эффективными, но и безопасными: не вызывают специфических осложнений, не способствуют возникновению онкологических заболеваний [21]. К сожалению, высокая стоимость отечественного фармакологического препарата «Неоваскулген» препятствует широкому применению генно-инженерных стимуляторов в клинической практике.

Интенсивное изучение клеточных механизмов ангиогенеза и выделение клеток-предшественников сосудистого эндотелия и ангиобластов позволила сначала в экспериментальных, а затем в клинических условиях для лечения ишемии тканей широко применять стволовые клетки, содержащиеся в моноклеарной фракции костного мозга [144, 202].

Однако выделение стволовых клеток из костного мозга является слишком затратным с экономической точки зрения. В то же время имеются фармакологические препараты из клеток костного мозга, которые в основном применяются как иммуностимуляторы при вторичных иммунодефицитных состояниях, а действие их на ишемизированную ткань не изучено. Одним из таких препаратов является миелопид – экстракт из костного мозга телят, который применяется при иммунодефицитных состояниях после хирургических операций, механических, термических и химических травмах [166]. Критическую ишемию конечностей можно рассматривать как ишемическое повреждение тканей вследствие недостаточного поступления артериальной крови. Поэтому можно ожидать позитивного влияния препарата на течение критической ишемии конечностей.

Анализ результатов лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей показал неэффективность консервативной терапии и непрямой реваскуляризации (РОТ) при невозможности выполнения реконструктивной операции. С течением времени у данной группы «неоперабельных» больных снижались показатели макрогемодинамики и микроциркуляции в пораженной

конечности, нарастали симптомы ишемии и, вследствие чего, им выполняли первичные ампутации.

Стимуляция периостального кровотока (РОТ) и десимпатизация конечности (ПСЭК) при невозможности выполнения прямой реконструктивной операции не позволяют в полной мере компенсировать кровообращение пораженной конечности [6, 15, 93]. Этот факт побудил нас на основе экспериментального исследования разработать новый способ лечения критической ишемии конечностей путем введения моноклеарных клеток аутологичного костного мозга.

В связи с этим, целью данного исследования явилось изучение влияния моноклеарной фракции аутологичного костного мозга, иммуностимулирующего препарата «Миелопид» и их комбинированного применения на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза при экспериментальной критической ишемии конечностей.

Для достижения поставленной цели были проведены экспериментальные исследования в 5 группах на 130 белых крысах линии “Wistar”. В качестве опытных животных выбраны крысы, так как данные животные имеют схожее с человеком строение артериального и венозного русла конечностей, устойчивы к инфекциям мягких тканей, удобны в обращении и в заборе биологических материалов.

В первую, интактную, группу вошло 10 животных, у которых оценены показатели микроциркуляции и морфологии мягких тканей, принятых за предполагаемую норму. В контрольной группе проводилось моделирование критической ишемии без последующего лечения. В опытных группах выполнялось моделирование критической ишемии с последующим лечением в 1-й группе МНФ по разработанной методике, во 2-й – иммуностимулирующим препаратом «Миелопид», в 3-й – комбинированным применением МНФ и препарата «Миелопид».

В нашем исследовании разработана оригинальная экспериментальная модель критической ишемии, которая практически полностью отвечает



необходимым требованиям, позволяет воспроизводить картину критической ишемии нижних конечностей, как у человека (патент на изобретение №2559937 от 20.08.2015г).

Препарат «Миелопид» вводился в дозировке 50 мкг/кг/сут через 3 часа после операции, затем ежедневно в течение пяти суток. Принятая схема соответствует проведенным ранее экспериментальным исследованиям, выполненным на крысах, на данной модели экспериментальной ишемии конечности [11, 74].

В экспериментальном исследовании применяли клинические (общее состояние животных, местно: выраженность признаков ишемии конечности), электрофизиологические (измерение уровня микроциркуляции методом ЛДФ на различных сроках эксперимента), морфологические (оценка микропрепаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, планиметрия срезов) и статистические (обработка полученных результатов методом доверительного интервала и корреляционного анализа) методы исследования.

В ходе исследования микроциркуляции в группах экспериментальных животных изучены такие показатели, как: уровень перфузии тканей, площадь некроза мышечных волокон, средний диаметр артериол, капилляров и венул, плотность капиллярной сети, индекс артериовенулярного шунтирования и средний диаметр мышечных волокон.

При оценке уровня перфузии мягких тканей в группах экспериментальных животных на различных сроках исследования выявлен закономерный характер изменения перфузии: с течением времени отмечалось возрастание перфузии во всех группах, однако, показатели роста отличались в зависимости от методов лечения (Рисунок 21).

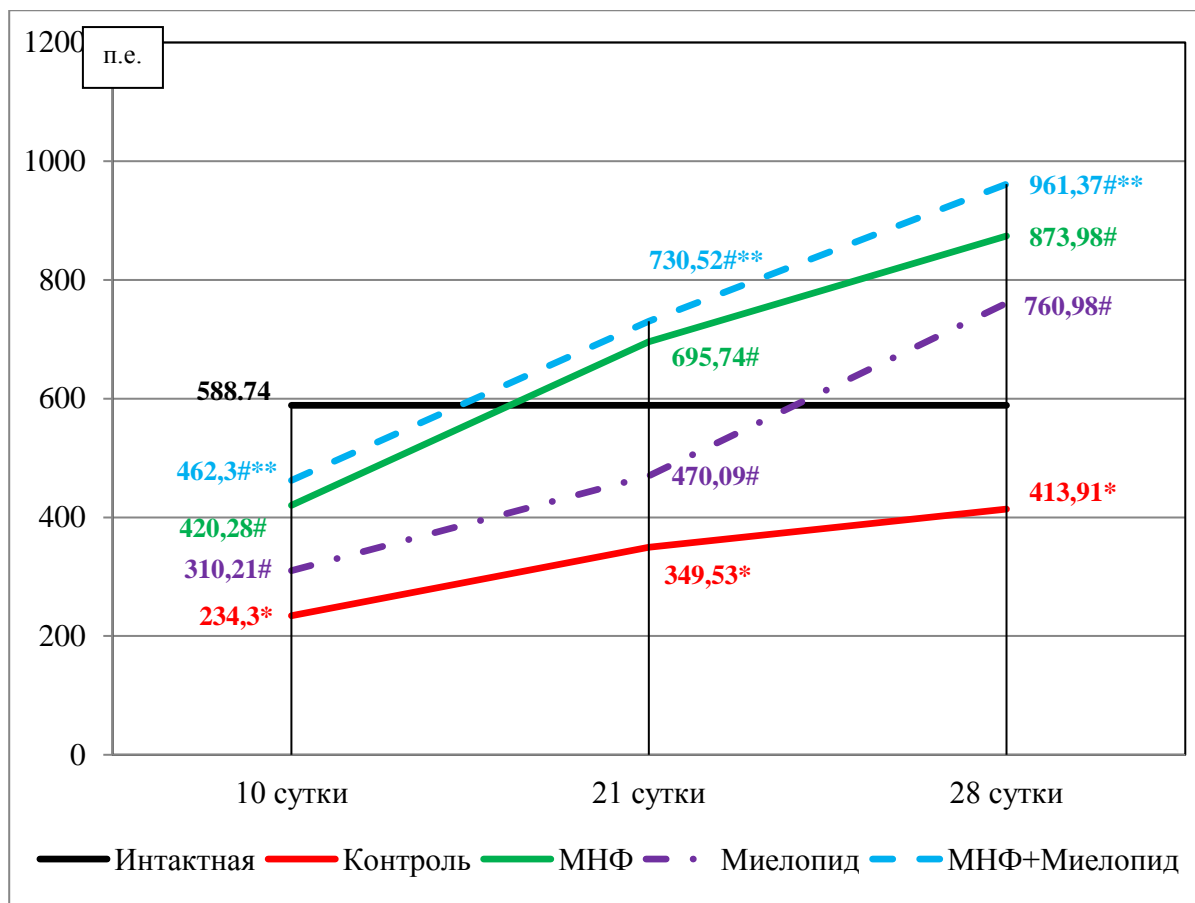


Рисунок 21 – Показатели перфузии мягких тканей в группах экспериментальных животных, п.е.

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами, \*\* – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

Самые максимальные значения выявлены в группе животных, получавших комбинированное лечение МНФ и препаратом «Миелопид» (на 10-е сутки  $462,3 \pm 18,35$  п.е., на 21-е –  $730,52 \pm 24,52$  п.е., на 28-е –  $961,37 \pm 38,53$  п.е.). В случае лечения препаратом «Миелопид» (2-я опытная группа) и МНФ (1-я опытная группа) она была статистически значимо меньше. При этом минимальные значения перфузии тканей были получены во 2-й опытной группе (на 10-е сутки  $310,21 \pm 16,05$  п.е., на 21-е –  $470,09 \pm 23,03$  п.е., на 28-е –  $760,98 \pm 70,12$  п.е.). На 21-е и 28-е сутки эксперимента в 1-й опытной группе (МНФ) отмечалось увеличение перфузии в сравнении с интактной на 18,2% и 48,5% соответственно.

При изучении артериального притока в микроциркуляторное русло по данным среднего диаметра артериол получены следующие результаты (Рисунок 22).

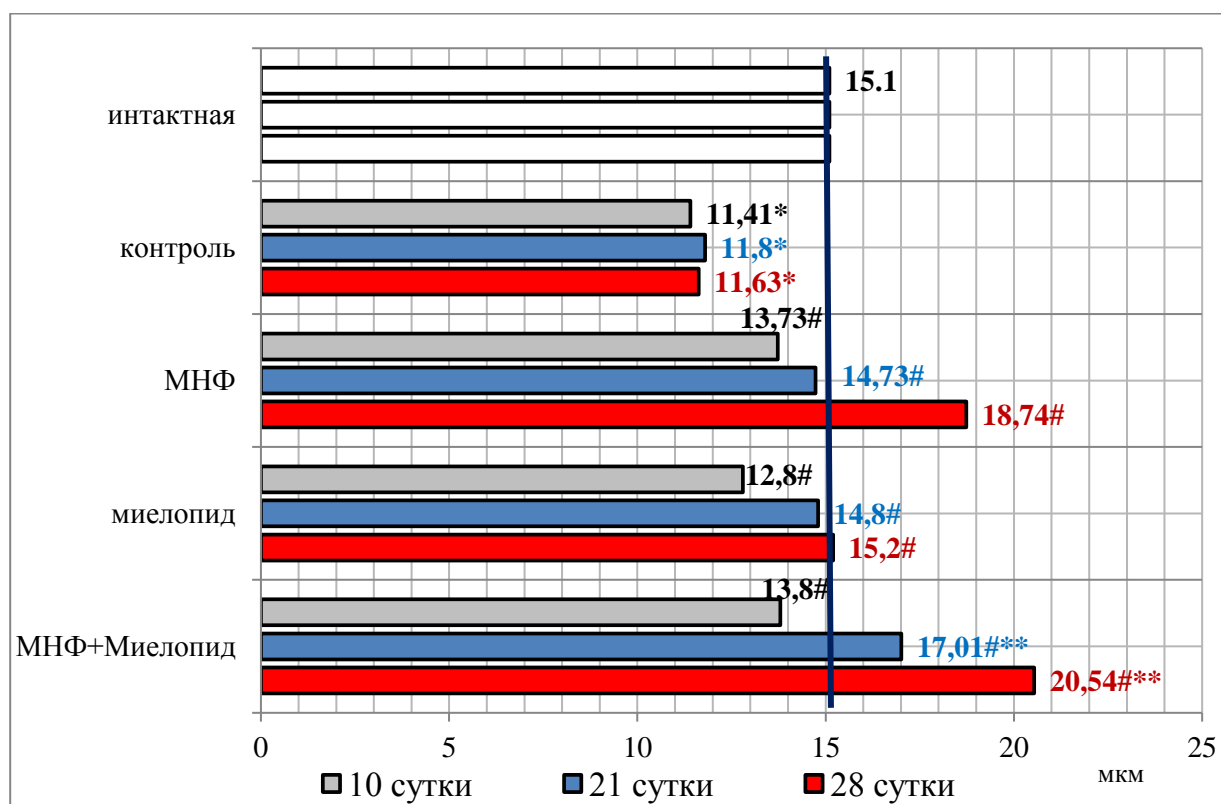


Рисунок 22 – Показатели среднего диаметра артериол в группах экспериментальных животных, мкм.

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами, \*\* – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

Во всех опытных группах значение диаметра артериол было статистически значимо выше на всех сроках эксперимента, чем в контрольной группе. На 10-е сутки статистически значимых различий между опытными группами не выявлено, диаметр артериол колебался от  $12,8 \pm 0,25$  мкм до  $13,8 \pm 0,73$  мкм. Самый большой показатель наблюдался в группе животных, пролеченных комбинированным способом (МНФ + «Миелопид») – на 21-е сутки  $17,01 \pm 0,43$  мкм, на 28-е –  $20,54 \pm 0,73$  мкм. Минимальный диаметр артериол зафиксирован во 2-й опытной группе («Миелопид»): на 28-е сутки он составлял  $15,2 \pm 0,38$  мкм. В 1-й опытной группе (МНФ) на 28-е сутки

исследования отмечались статистически значимые различия в сравнении со 2-й опытной группой, диаметр артериол был выше на 23,3%.

Изучение венозного оттока из микроциркуляторного русла при экспериментальной критической ишемии конечности путем определения диаметра венул показало следующее (Рисунок 23).

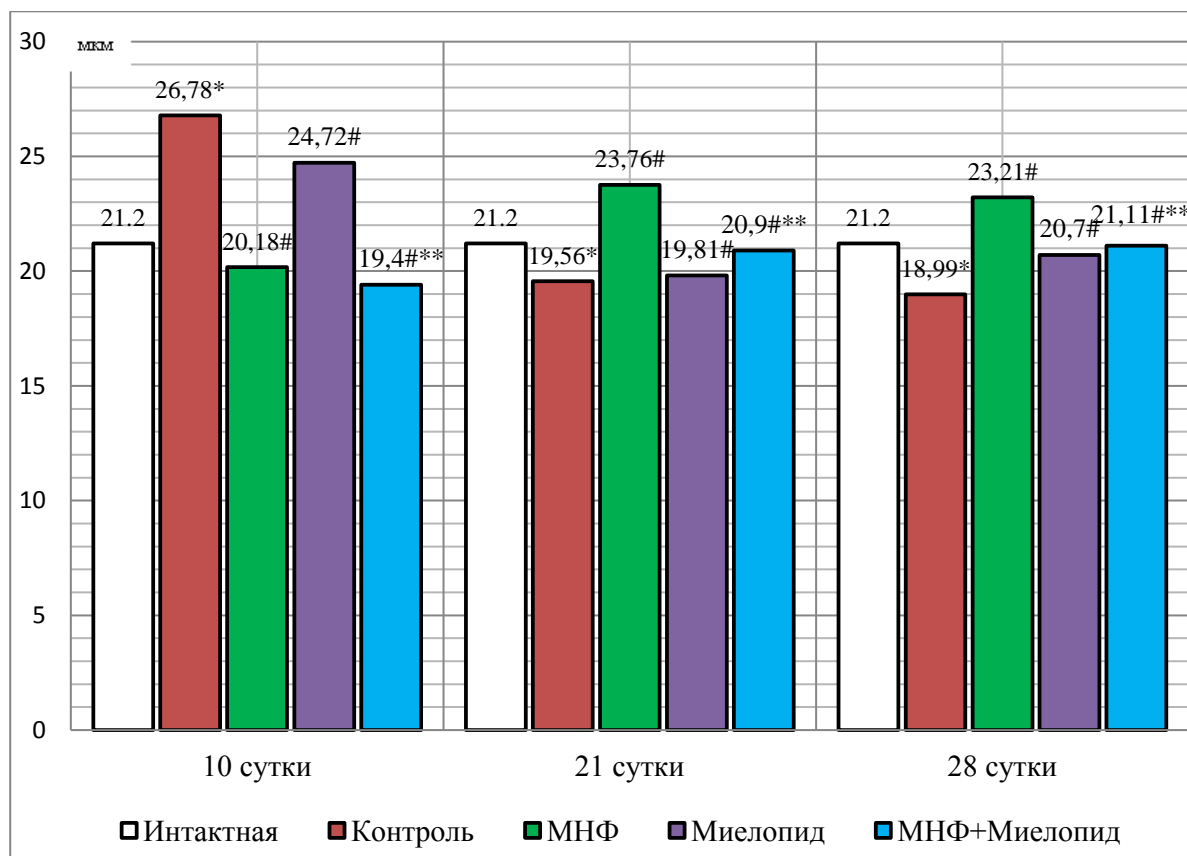


Рисунок 23 – Показатели среднего диаметра венул в группах экспериментальных животных, мкм.

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами, \*\* – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

В контрольной группе диаметр венул на 10-е сутки был выше на 26,3%, на 21-е и 28-е сутки ниже – на 7,7% и 10,4% соответственно, – в сравнении с интактной группой животных. В 1-й опытной группе (МНФ) исследуемый показатель в сравнении с контролем был ниже на 10-е сутки на 24,6%. а на 21-е и 28-е сутки выше – на 21,5% и 22,2%. Во 2-й опытной группе диаметр венул на 10-е сутки был ниже на 7,7%, на 28-е сутки выше на 9% при сравнении с

контрольной группой экспериментальных животных. В 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») исследуемый диаметр венул снижался на 10-е сутки на 27,5%, на 28-е сутки возрастал на 11,2%.

Исследование патофизиологического феномена АВШ проводилось путем расчета ИАВШ (Рисунок 24).

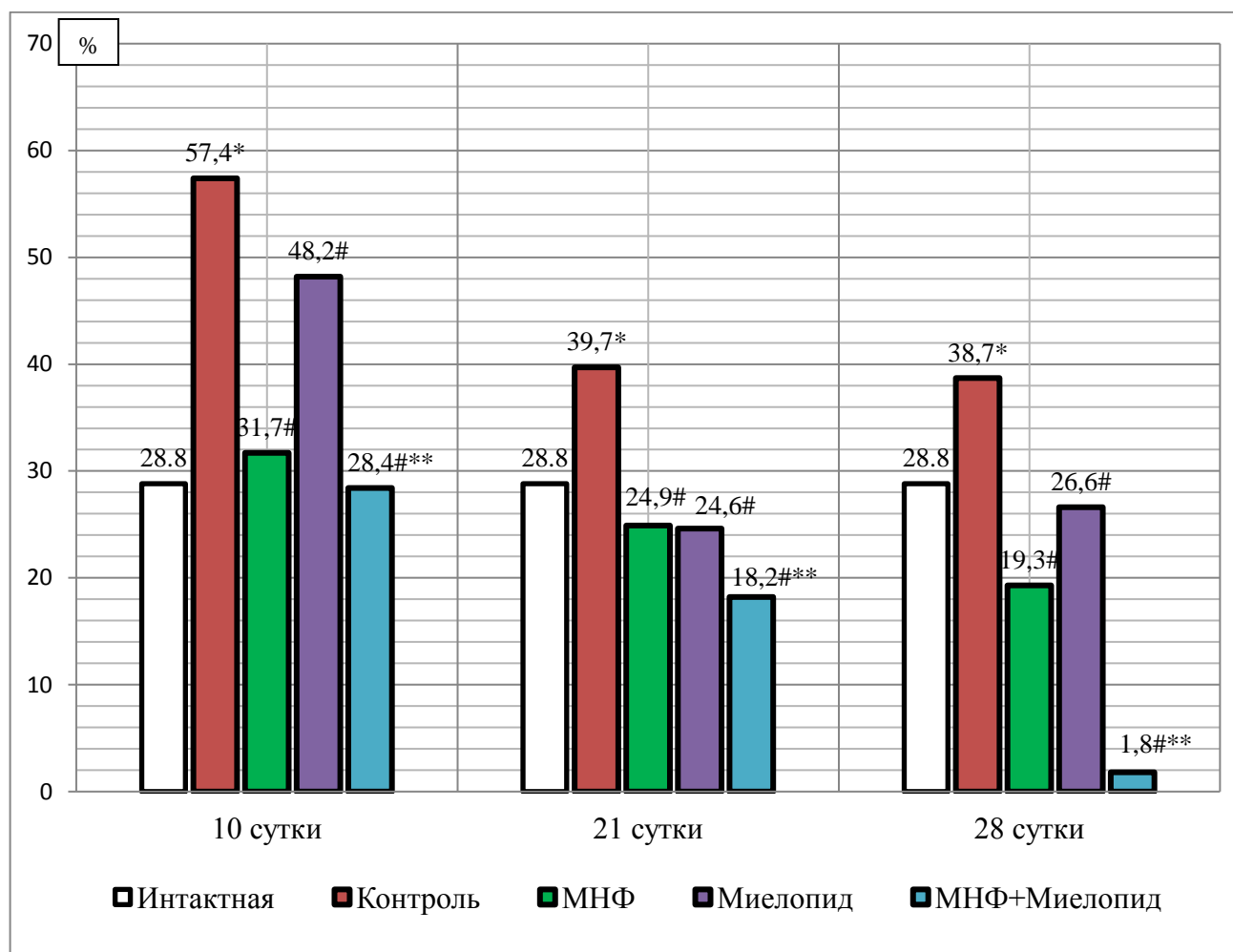


Рисунок 24 – Показатели индекса артериовенулярного шунтирования в группах экспериментальных животных, %.

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами, \*\* – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

Максимальные значения ИАВШ зафиксированы в контрольной группе – на 10-е сутки  $57,4 \pm 1,60\%$ , на 21-е –  $39,7 \pm 1,38\%$ , на 28-е –  $38,7 \pm 3,25\%$ . Самые низкие показатели АВШ выявлены в 3-й опытной группе (МНФ +

«Миелопид») – на 10-е сутки –  $28,4 \pm 4,17\%$ , на 21-е –  $18,2 \pm 2,04\%$ , на 28-е –  $1,8 \pm 4,88\%$ . В 1-й опытной группе (МНФ) низкий показатель ИАВШ наблюдался на 28-е сутки –  $19,3 \pm 1,56\%$ . Во группе животных, пролеченных препаратом «Миелопид», показатель АВШ колебался от  $48,2 \pm 0,97\%$  на 10-е сутки эксперимента до  $24,6 \pm 2,87\%$  на 21-е сутки.

При исследовании диаметра капилляров при критической ишемии в эксперименте получены следующие результаты (Рисунок 25).

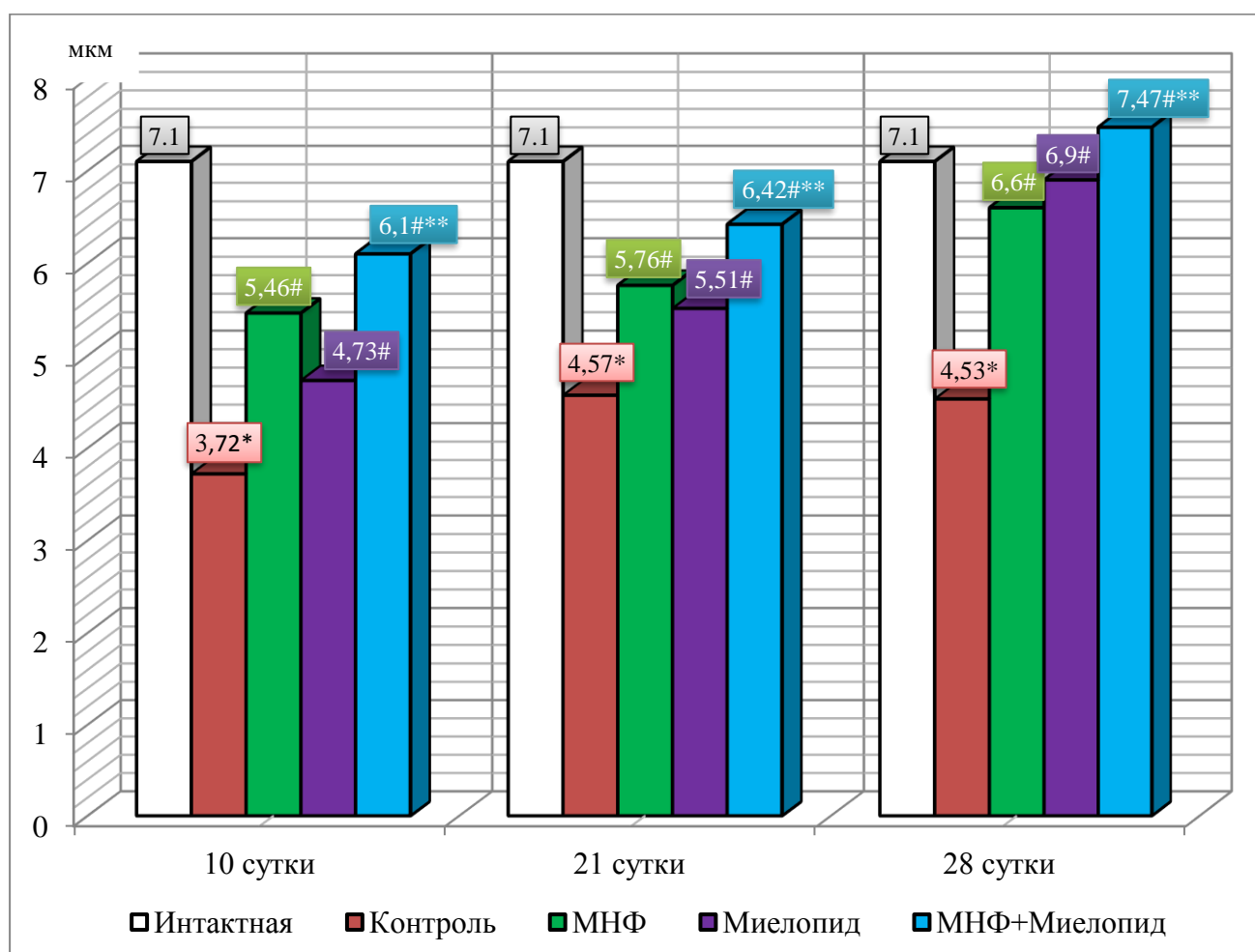


Рисунок 25 – Показатели среднего диаметра капилляров в группах экспериментальных животных, мкм.

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами, \*\* – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

Как видно из Рисунка 25 в группе животных, получавших комбинированное лечение МНФ и препаратом «Миелопид» (3-я опытная), диаметр капилляров был статистически значимо выше, чем в остальных группах на всех сроках исследования, а на 28-е сутки превосходил показатель в интактной группе на 5,2%. Самый низкий диаметр капилляров выявлен в контрольной группе: на 10-е сутки –  $3,72 \pm 0,19$  мкм, на 21-е –  $4,57 \pm 0,24$  мкм, на 28-е –  $4,53 \pm 0,24$  мкм. В 1-й опытной группе (МНФ) исследуемый параметр был статистически значимо выше, чем в контроле, но в то же время и статистически значимо ниже, чем в 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») на 10-е сутки на 11,7%, на 21-е – на 11,5%, на 28-е – на 13,2%. Во 2-й опытной группе («Миелопид») диаметр капилляров был ниже на 10-е сутки на 28,9%, на 21-е – на 16,5%, на 28-е – на 8,3%, чем при комбинированном способе лечения.

При исследовании плотности капиллярной сети путем подсчета количества капилляров в стандартном поле зрения микроскопа, установлено следующее (Рисунок 26). В 1-й опытной группе (МНФ) на 10-е сутки исследования плотность капиллярной сети была ниже, чем во 2-й («Миелопид») на 23,2%, на 21-е – на 10,8%, на 28-е – на 31,8%. При сравнении 1-й опытной группы (МНФ) с 3-й (МНФ + «Миелопид») установлено, что плотность капилляров в 3-й группе была выше на 10-е сутки на 6,9%, на 21-е – на 10,8%, на 28-е – на 8,5%. Плотность капиллярной сети во 2-й группе («Миелопид») статистически значимо выше, чем в 3-й группе (МНФ + «Миелопид») на 10-е сутки на 15,3%, на 28-е – на 21,5%, а на 21-е сутки статистически значимых различий в данных группах не обнаружено.

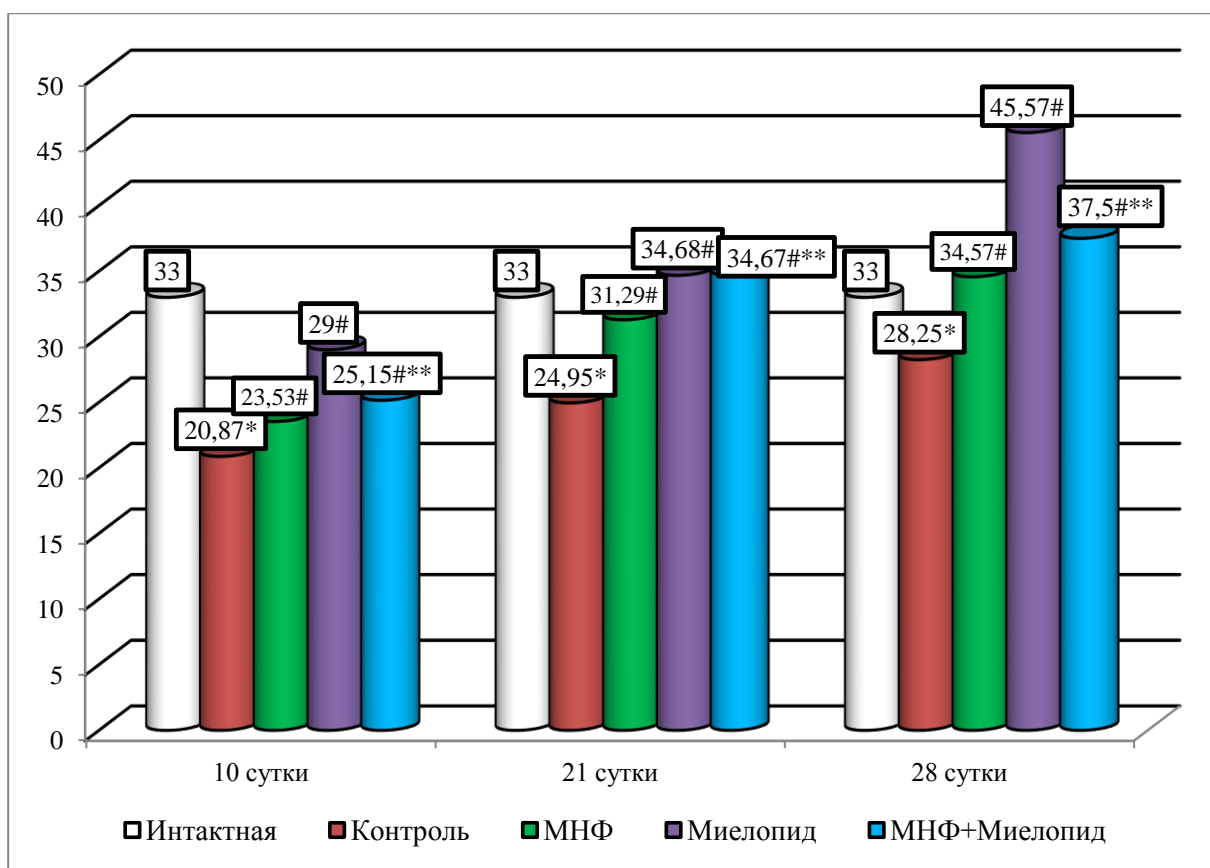


Рисунок 26 – Показатели плотности капиллярной сети в стандартном поле зрения микроскопа в группах экспериментальных животных.

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами, \*\* – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

Изучение удельной площади некроза мышечных волокон на разных сроках эксперимента представлено на Рисунке 27. Минимальные значения площади некроза мышечных волокон зафиксированы в 1-й опытной группе (МНФ) – на 10-е сутки  $13,55 \pm 1,07\%$ , на 21-е –  $5,52 \pm 0,34\%$ , на 28-е –  $2,51 \pm 0,09\%$ . Самые высокие показатели исследуемого параметра выявлены в контрольной группе: на 10-е сутки  $37,46 \pm 0,14\%$ , на 21-е –  $19,94 \pm 0,35\%$ , на 28-е –  $13,1 \pm 0,39\%$ . Во 2-й опытной группе («Миелопид») площадь некроза колебалась от  $16 \pm 0,71\%$  на 10-е сутки эксперимента до  $4 \pm 0,28\%$  на 28-е и была статистически значимо ниже в сравнении с контрольной. В 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид») статистически значимых различий с 1-й опытной (МНФ) на всех сроках исследования не выявлено.



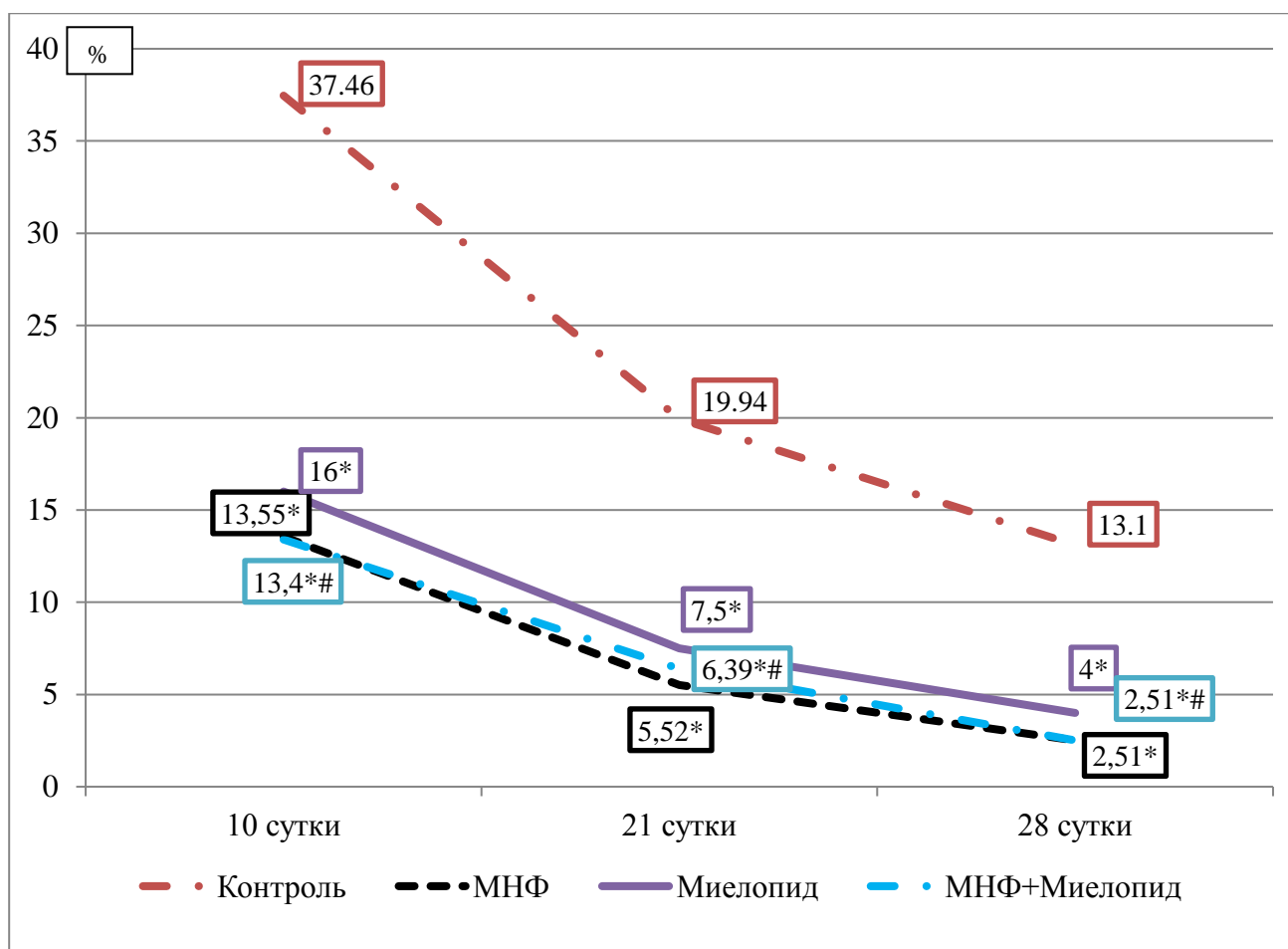


Рисунок 27 – Показатели удельной площади некроза мышечных волокон в группах экспериментальных животных, в %.

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

При изучении влияния МНФ, препарата «Миелопид» и их комбинированного применения на процессы регенерации мышечной ткани в ишемизированной конечности получены следующие результаты (Рисунок 28).

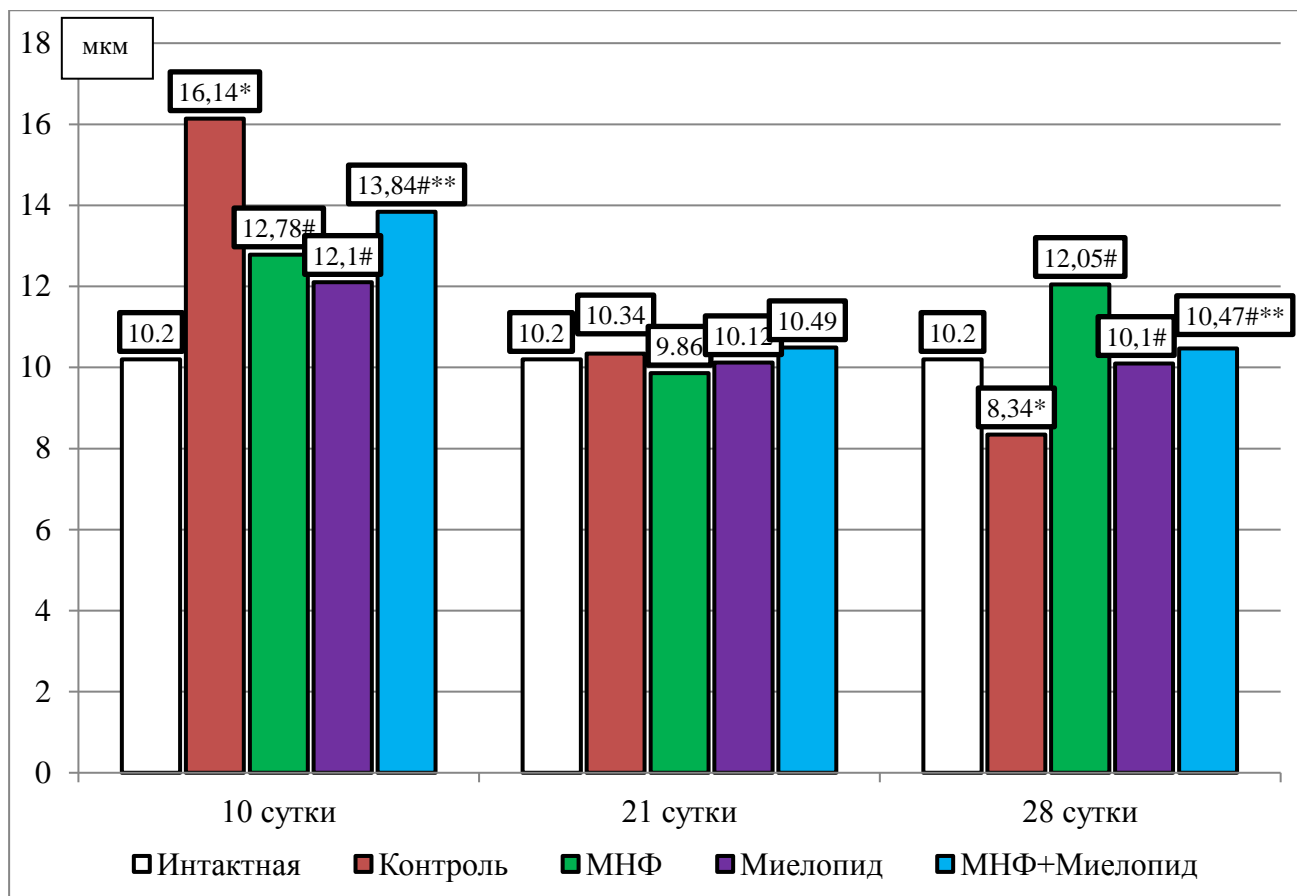


Рисунок 28 – Показатели среднего диаметра мышечных волокон в группах экспериментальных животных, мкм.

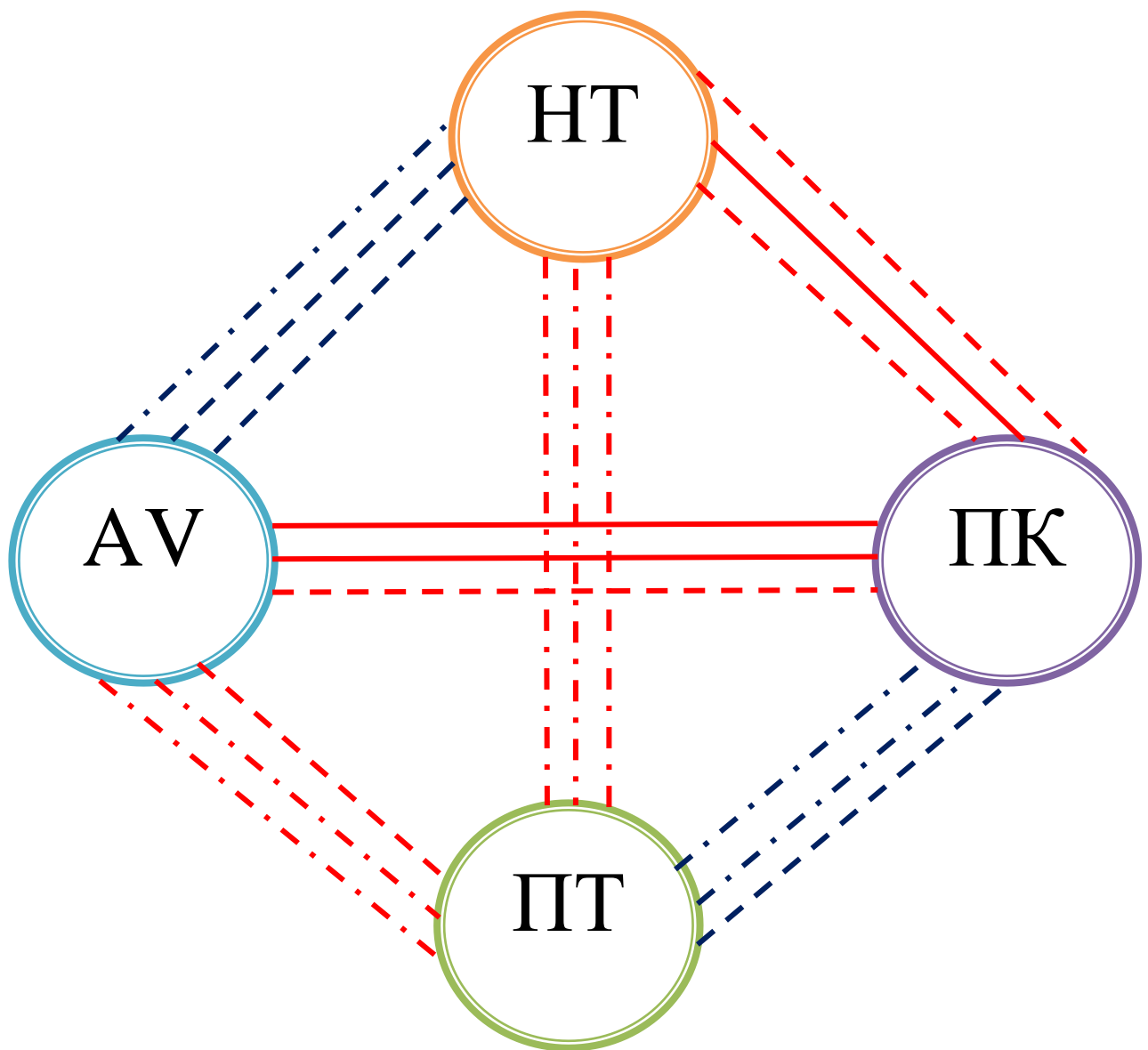
Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами, \*\* – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

На 10-е сутки эксперимента отмечается резкое возрастание диаметра мышечных волокон в контрольной группе при сравнении с интактной, на 58,2%. В опытных группах на тех же сроках диаметр мышечных волокон был статистически значимо ниже, чем в контрольной: в 1-й опытной (МНФ) на 26,3%, во 2-й («Миелопид») на 33,4%, в 3-й (МНФ + «Миелопид») на 16,1%. На 21-е сутки статистики значимых отличий между интактной, контрольной и опытными группами не выявлено. На 28-е сутки максимальный диаметр мышечных волокон зафиксирован в 1-й опытной группе (МНФ) –  $12,05 \pm 0,23$  мкм. Во 2-й и 3-й опытных группах показатель был статистически значимо ниже

на 28-е сутки ( $10,1 \pm 0,11$  мкм и  $10,47 \pm 0,37$  мкм соответственно), чем в 1-й опытной.

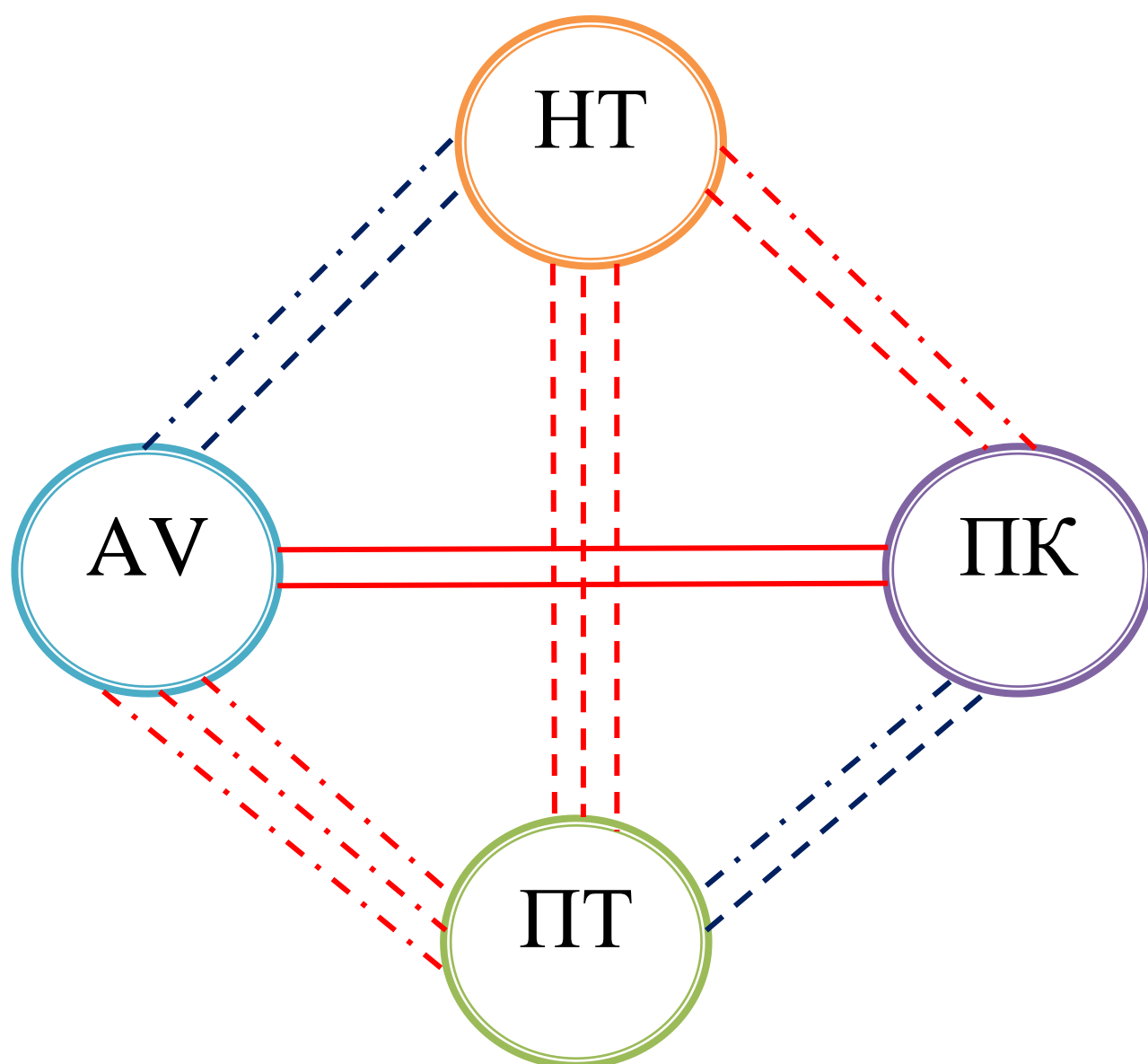
На основании анализа мировой и отечественной литературы [14, 51, 87, 106, 167] в качестве интегральных показателей, характеризующих процессы микроциркуляции, выбраны уровень перфузии мягких тканей, плотность капиллярной сети, индекс артериовенулярного шунтирования и площадь некроза мышечных волокон. При анализе корреляционной связи между интегральными показателями на различных сроках эксперимента во всех опытных группах установлено следующее (Рисунки 29, 30, 31). Самым высоким показателям перфузии тканей и плотности капиллярной сети соответствуют самые низкие значения уровня артериовенулярного шунтирования и площади некроза мышечных волокон. Наиболее сильная корреляционная связь, как прямая ( $r = 0,7 - 1$ ), так и обратная ( $r = (-0,7) - (-1)$ ), выявлена в группе животных, получавших лечение МНФ (Рисунок 29).





- · — · — · — · — слабая прямая корреляционная связь ( $r = 0 - 0,3$ )
- — — — — умеренная прямая корреляционная связь ( $r = 0,3 - 0,7$ )
- · — · — · — · — слабая обратная корреляционная связь ( $r = 0 - (-0,3)$ )
- — — — — умеренная обратная корреляционная связь ( $r = (-0,3) - (-0,7)$ )
- — — — — сильная обратная корреляционная связь ( $r = (-0,7) - (-1,0)$ )

Рисунок 30 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи интегральных показателей микроциркуляции во 2-й опытной группе («Миелопид»): AV – артериовенулярное шунтирование; HT – некроз тканей; ПК – плотность капилляров; ПТ – перфузия тканей.



- . . . . . – слабая прямая корреляционная связь ( $r = 0 - 0,3$ )
- - - - - – умеренная прямая корреляционная связь ( $r = 0,3 - 0,7$ )
- . . . . . – слабая обратная корреляционная связь ( $r = 0 - (-0,3)$ )
- - - - - – умеренная обратная корреляционная связь ( $r = (-0,3) - (-0,7)$ )
- – сильная обратная корреляционная связь ( $r = (-0,7) - (-1,0)$ )

Рисунок 31 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи интегральных показателей микроциркуляции в 3-й опытной группе (МНФ + «Миелопид»): AV – артериовенулярное шунтирование; NT – некроз тканей; ПК – плотность капилляров; ПТ – перфузия тканей.

Способы стимуляции регенераторного процесса в ишемизированные мышцы изучены недостаточно. С одной стороны большое внимание уделяется развитию неоваскулогенеза. Идея терапевтического ангиогенеза базируется на представлениях о том, что в тканях конечности, ишемизированной вследствие окклюзии просвета магистральных артерий, число функционирующих кровеносных капилляров уменьшается, и постулируется необходимость его увеличения [41]. Трактовка такого механизма ангиогенеза весьма затруднительна с физической точки зрения. Согласно закону Пуазейля, увеличение площади сечения за счет сосудов меньшего диаметра приводит к росту сопротивления тока жидкости в системе и не вызывает увеличения объемной скорости кровотока, т.е. не усиливает кровоснабжение конечности [17, 41, 100]. Следовательно, с другой стороны, для возрастания уровня микроциркуляции необходимо не только развитие новых сосудов в ишемизированных мышцах, но и возрастание притока крови к ним по развитым коллатералям [109].

Терапевтический неоваскулогенез представляется важной стратегией спасения тканей при КИМК. Быстрая реваскуляризация в ишемизированных и в регенерирующих органах чрезвычайно важна для восстановления функций. Сосудистая травма или ишемия тканей активирует каскад молекулярно-генетических реакций, главным результатом которых является мобилизация из костного мозга и других источников предшественников эндотелиальных клеток, обеспечивающих реваскуляризацию за счет образования новых сосудистых формаций [196].

Повреждение стенки сосуда и, вследствие этого, ишемия тканей приводят к повышению уровня сосудистых факторов роста (VEGF, PLGF). Активируя матриксную металлопротеиназу-9 (MMP-9), которая содержится в остеобластной зоне стромальной ткани костного мозга, сосудистые факторы роста способствуют усилению биодоступности цитокинов, активных в отношении стволовых клеток. В ответ на это происходит усиленная циркуляция и пролиферация гемопоэтических клеток, лимфоцитов и ПЭ. Увеличение количества циркулирующих стволовых клеток приводит к появлению клеток-

предшественников в зонах ангиогенеза, что ведет к образованию новых кровеносных сосудов (Рисунок 32).

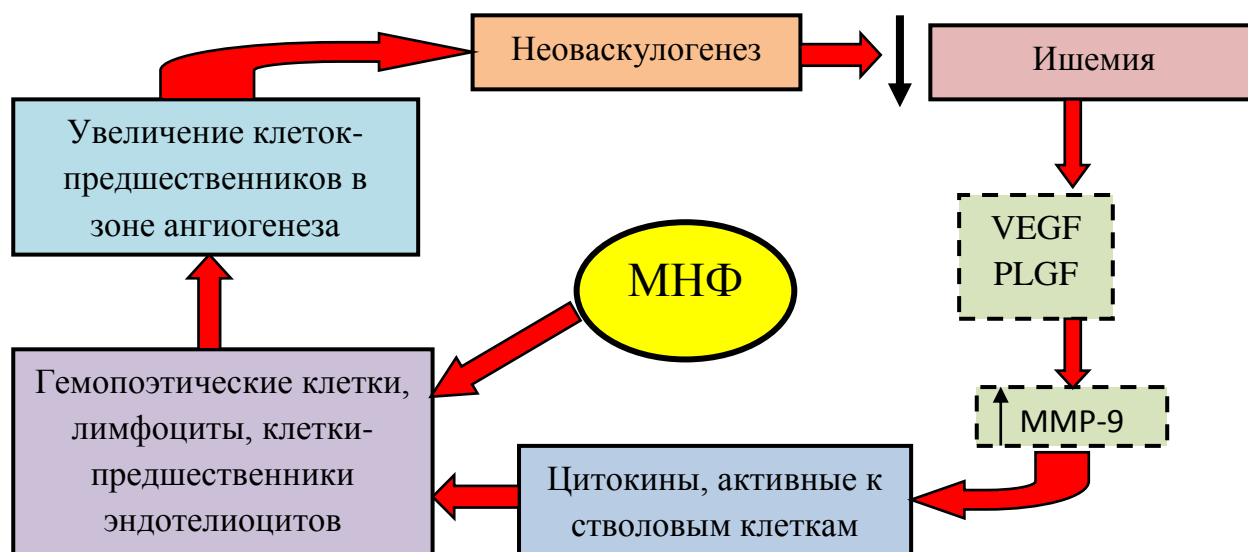


Рисунок 32 – Механизм действия мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга: МНФ – мононуклеарная фракция аутологичного костного мозга; VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста; PLGF – плацентарный фактор роста; MMP-9 – матриксная металлопротеиназа-9.

Таким образом, обладая мультипотентными свойствами, МНФ может способствовать замещению дефектов тканей и неоваскулогенезу. Лимфоидные клетки этой фракции в силу своих морфогенетических особенностей способны принимать участие в процессах восстановительной регенерации поврежденных органов и тканей [137].

На основании ранее проведенных исследований [113, 116, 121, 131, 135, 142, 190] установлено, что введение МНФ в ишемизированную зону усиливает процессы неоваскулогенеза и регенерации поврежденных тканей. Однако активация ангиогенеза и развитие местного коллатерального кровообращения является недостаточным для адекватной перфузии ишемизированной зоны.

В результате проведенного нами исследования установлено, что разработанный способ введения мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга в объеме 200 мкл в ишемизированную конечность из двух точек: 1) непосредственно под паховую связку в зону анатомического расположения



коллатералей внутренней подвздошной артерии и ее ветвей; 2) интрамукулярно в икроножную мышцу передне-латеральной поверхности средней трети голени, - с одной стороны позволяет активизировать коллатеральное кровообращение за счет резерва функционально незадействованных коллатеральных артерий и усиления притока крови из проксимальных отделов конечности в дистальные, а с другой стороны – стимулирует неоангиогенез в ишемизированных тканях.

Разработанный способ получения и введения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга может быть рекомендован для клинических испытаний при лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей.

При сопоставлении результатов, полученных в ходе нашего исследования, с данными мировой и отечественной литературы установлено, что препарат «Миелопид» благоприятно влияет на течение критической ишемии конечностей. В предыдущих исследованиях изучались его противовоспалительные и регенераторные свойства при экспериментальной модели проникающего ранения глаза [34], влияние на уровень перфузии при экспериментальной ишемии конечности [95].

«Миелопид» имеет в своем составе 6 миелопептидов, действует физиологично и эффективен в крайне низких концентрациях. МП-4 и МП-6 согласно проведенным ранее исследованиям [28, 35, 64, 166] являются эндогенными факторами клеточной дифференцировки, в частности гемопоэтических клеток, способствуя их более быстрому созреванию [28]. Клетками-мишенями для данных миелопептидов являются бласты – предшественники клеток крови [35]. МП-4 и МП-6 запускает дифференцировку и созревание гемопоэтических клеток, усиливают синтеза белка, способствуют появлению зрелых клеточных форм и снижению числа бластов [28, 63, 64]

Эти представления побудили нас экспериментально обосновать возможность применения иммуностимулятора «Миелопид» для лечения экспериментальной ишемии конечности. В нашем исследовании детально показано, что препарат «Миелопид» увеличивает перфузию тканей и плотность капиллярной сети, уменьшает артериовенулярное шунтирование и площадь

некроза мышечных волокон, т.е. оказывает позитивное влияние на процессы микроциркуляции и регенерации в ишемизированных тканях (Рисунок 33).



Рисунок 33 – Механизм действия иммуностимулирующего препарата «Миелопид» при экспериментальной критической ишемии конечностей.

Поэтому можно рекомендовать включение препарата «Миелопид» в систему консервативного лечения больных с критической ишемией нижних конечностей на почве ХОЗАНК. Схема введения: содержимое одного флакона (3 мг порошка для приготовления раствора для инъекций) растворяют в 1–2 мл изотонического физиологического раствора хлорида натрия и вводят из расчета 0,05 мг/кг внутримышечно ежедневно в течение 5 дней.

Комбинированное применение МНФ и иммуностимулирующего препарата «Миелопид» также положительно влияет на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза. Так, в группе животных, пролеченных комбинированным способом, статистически значимо увеличивались уровень перфузии мягких тканей и плотность капиллярной сети, уменьшались показатель артериовенулярного шунтирования и площади некроза тканей в сравнении с изолированным применением МНФ и препарата «Миелопид».

МНФ ускоряет высвобождение, циркуляцию и пролиферацию гемопоэтических клеток, лимфоцитов и ПЭ, что приводит к появлению клеток-предшественников в зонах ангиогенеза. При гистологическом исследовании ишемизированных мышц после введения в них МНФ срок образования новых полноценных капилляров в среднем составляет 4 недели. При развитии критической ишемии конечности желательное уменьшение сроков формирования новой сосудистой сети, что позволит предупредить развитие гангрены конечности.

«Миелопид», благодаря наличию в своем составе МП-4 и МП-6, ускоряют дифференцировку гемопоэтических клеток, созревание зрелых клеточных форм, тем самым способствует усилению коллатерального кровотока в уже имеющихся новообразованных кровеносных сосудах. Гистологические исследования ишемизированных мышц после введения в них МНФ и препарата «Миелопид» показали, что формирование новой, полноценной капиллярной сети происходит уже на 10-21-е сутки эксперимента, что вдвое меньше, чем при изолированном применении МНФ. Этим эффектом можно объяснить более

позитивное влияние их комбинированного введения на микроциркуляцию и неоваскулогенез при критической ишемии конечностей.

## ВЫВОДЫ

1. Традиционная консервативная терапия критической ишемии нижних конечностей в сочетании с реваскуляризирующей остеотрепанацией позволяет сохранить пораженную конечность у 5% больных при наличии проходимых берцовых артерий.

2. Разработанная оригинальная модель создания критической ишемии конечностей в эксперименте путем иссечения магистрального сосуда, включающего бедренную артерию, подколенную артерию и артерию сафена, позволяет получить схожую патогномичную картину ишемии конечности, соответствующую III–IV стадии ишемии по классификации Покровского-Фонтейна у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

3. Разработанный способ получения и введения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга  $4 \times 10^6$  клеток в объеме 200 мкл в ишемизированную конечность из двух точек по 100 мкл в каждую: 1) непосредственно под паховую связку в зону анатомического расположения коллатералей внутренней подвздошной артерии и ее ветвей; 2) интрамускулярно в икроножную мышцу переднелатеральной поверхности средней трети голени, – вызывает неоваскулогенез в ишемизированных тканях, позволяет активизировать коллатеральное кровообращение за счет резерва функционально незадействованных коллатеральных артерий и усилить приток крови из проксимальных отделов конечности в дистальные.

4. Моноклеарная фракция аутологичного костного мозга при лечении экспериментальной критической ишемии конечностей увеличивает уровень перфузии в ишемизированных тканях в среднем на  $96,5 \pm 13,5\%$  и плотность капиллярной сети на  $20,3 \pm 4,4\%$ ; уменьшает индекс артериовенулярного шунтирования на  $19,9 \pm 2,2\%$  и площадь некротизированных тканей на  $16,3 \pm 4,7\%$  по сравнению с контрольной группой животных за счет развития неоваскулогенеза.

5. Иммуностимулирующий препарат «Миелопид» в дозировке 50 мкг/кг/сут обладает ангиопротективными свойствами при лечении экспериментальной критической ишемии конечностей: увеличивает плотность капиллярной сети в среднем на  $46,4 \pm 9,8\%$  и уровень перфузии на  $50,3 \pm 16,5\%$ ; уменьшает индекс артериовенулярного шунтирования на  $12,1 \pm 3,2\%$  и удельную площадь некроза мышечных волокон на  $14,3 \pm 3,7\%$  в сравнении с контрольной группой за счет развития коллатерального кровообращения.

6. Комбинированное применение моноклеарной фракции аутологичного костного мозга и иммуностимулирующего препарата «Миелопид» улучшает уровень перфузии мягких тканей в среднем на  $112,9 \pm 10,6\%$  и плотность капиллярной сети на  $30,7 \pm 7,6\%$ ; уменьшает индекс артериовенулярного шунтирования на  $29,1 \pm 5,4\%$  и площадь некротизированных тканей на  $16,1 \pm 4,7\%$  по сравнению с контрольной группой животных за счет развития неоваскулогенеза и усиления коллатерального кровообращения.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Моделирование экспериментальной критической ишемии конечности заключается в следующем. Под действием средств для наркоза («Хлоралгидрат» в дозе 300 мг/кг, внутривенно, в виде раствора) животных необходимо фиксировать на спине. Затем в асептических условиях, на выбритом от шерсти участке, в области внутренне-медиальной поверхности бедра, производится линейный разрез кожи, подкожно-жировой клетчатки и фасции от паховой складки до коленного сустава. Далее обнажается сосудисто-нервный пучок, бедренная артерия мобилизуется (отсекается от нее ветви первого порядка) на протяжении всего разреза и берется на резиновые держалки. Перевязывается и пересекается а. saphena (аналог глубокой артерии бедра у человека). В дистальном направлении, в области бифуркации подколенной артерии, ее лигируют и отсекают. Участок магистрального сосуда, включающий бедренную, подколенную артерию, артерию сафена и начальные отделы артерий голени удаляют. На кожу шелковой нитью размером 1.0 накладывают один непрерывный шов.

2. Забор костного мозга для лечения острой экспериментальной критической ишемии конечности необходимо выполнять следующим образом. У крысы, перенесшей операцию моделирования ишемии задней конечности, на противоположной конечности пальпируется бедренно-большеберцовый сустав, образованный латеральными и медиальными мышцами бедренной и большеберцовой костей. Сустав фиксируется в положении флексии. После санации 70% этиловым спиртом, иглой, диаметром 20G, соединенной со шприцем, содержащим 2500 ЕД гепарина, разбавленного с 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:1 в объеме 1мл, перкутанно через хрящевые суставные мениски под надколенником осуществляется пункция костномозговой полости. Аспирация костного мозга в шприц осуществляется путем поступательных движений иглы в полости вперед и назад в объеме от 1 до 1,5 мл.

3. Получать моноклеарную фракцию из гепаринизированного аутологичного костного мозга рекомендуется следующим образом. Заготовленный костный мозг разводят физиологическим раствором (рН 7,2) в соотношении 1:5. Далее центрифугируют в градиенте плотности фиколл-верографин при 400g в течение 30 мин. Полученная моноклеарная фракция трижды отмывается в физиологическом растворе, забуференным с помощью фосфатно-солевого буфера и ресуспендируется в среде RPMI-1640 в концентрации  $10^6$  клеток в мл. Жизнеспособность клеток определяется по методу окрашивания с трипановым синим.

4. Лечение экспериментальной критической ишемии конечности моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в количестве  $4 \times 10^6$  клеток в объеме 200 мкл необходимо осуществлять из двух точек, в каждую из которых вводится 100 мкл: 1) непосредственно под паховую связку в зону анатомического расположения коллатералей подвздошной артерии и ее ветвей; 2) интрамускулярно в икроножную мышцу переднелатеральной поверхности средней трети голени.

5. Разработанный способ лечения экспериментальной критической ишемии конечности моноклеарной фракцией аутологичного костного мозга может быть рекомендован для клинических испытаний при лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей.

6. Для лечения экспериментальной критической ишемии конечности рекомендуется применять иммуностимулирующий препарат «Миелопид» в дозировке 50 мкг/кг/сут интрамускулярно в ишемизированную конечность через три часа после моделирования ишемии, а затем в последующие трое суток один раз в сутки.

7. Целесообразно использовать для клинических испытаний при лечении критической ишемии конечности препарат «Миелопид» по следующей схеме: содержимое одного флакона (3 мг порошка для приготовления раствора для инъекций) растворяют в 1–2 мл изотонического физиологического раствора и вводят из расчета 0,05 мг/кг внутримышечно ежедневно в течение 5 дней.



## ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АВШ – артериовенулярное шунтирование

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

ГБА – глубокая артерия бедра

ГНЦ – Гематологический Научный Центр

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗБА – задняя большеберцовая артерия

ЗФФР – забуференный физиологический фосфатно-солевой раствор

ИАВШ – индекс артериовенулярного шунтирования

ИЛ-2 – интерлейкин-2

КИНК – критическая ишемия нижних конечностей

ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия

ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

МНК – моноклеарные клетки

ММП-9 – матричная металлопротеиназа-9

МП-1,-2,-3,-4,-5,-6 – миелопептиды-1,-2,-3,-4,-5,-6

МНФ – моноклеарная фракция аутологичного костного мозга

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ОБА – общая бедренная артерия

ПБА – поверхностная бедренная артерия

ПкА – подколенная артерия

ПЭ – предшественники эндотелиоцитов

ПСЭК – поясничная симпатэктомия

РИ – реовазографический индекс

РОТ – ревазуляризирующая остетрепанация

СК – стволовые клетки

ФИ – фотоплетизмографический индекс

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

ХНЗЛ – хронические неспецифические заболевания легких

ХОЗАНК – хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей

ЭК – эндотелиальные клетки

ЭКГ – электрокардиография

bFGF – основной фактор роста фибробластов

HGF – фактор роста гепатоцитов

PLGF – плацентарный фактор роста

RPMI-1649 – среда Roswell Park Memorial Institute medium

TAF – опухолевой сосудистый фактор роста

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

VPF – фактор проницаемости сосудов

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 80 лекций по хирургии / под ред. общ. В. С. Савельева. – М. : Литтерра, 2008. – 910 с.
2. Андожская, Ю. С. Коррекция микроциркуляции у больных с атеросклеротическим поражением различных сосудов эфферентными методами лечения // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. – 2007. – № 6. – С. 64–67.
3. Андожская, Ю. С. Состояние регионарной гемодинамики у больных с атеросклерозом в зависимости от фокальности поражения и тяжести ишемии нижних конечностей // Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – № 2. – С. 75-78.
4. Асланов А.Д., Логвина О.Е., Куготов А.Г. и др. Опыт лечения критической ишемической болезни нижних конечностей на фоне диффузного поражения артерий // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – Т. 18. – №4. – С. 125–127.
5. Аутологичные стволовые клетки. Экспериментальные исследования и перспективы клинического применения: рук. для врачей / под ред. В. А. Ткачука. – М. : Литтерра, 2009. – 448 с.
6. Барыкин, Д. Ю. Комбинированный подход в лечении многоуровневого поражения артерий нижних конечностей / Д.Ю. Барыкин, М.Ю. Речкин, Ю.А. Корабельников, Е.Н. Щурова // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2009. – Т. 15, № 2 (Прил.). – С. 37-38.
7. Безопасность и фармакоэкономическая эффективность применения различных препаратов ацетилсалициловой кислоты у пациентов с ИБС / А. Л. Верткин [и др.] // РМЖ. – 2009. – Т. 17, № 9. – С. 570–575.
8. Берсенева, А. В. Аутогенная трансплантация клеток при ишемии конечностей в клинике // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 1. – С. 40–43.

9. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций / под ред. В. И. Шумакова, Н. А. Онищенко. – М. : Лавр. 2009. – 308 с.
10. Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М. А. Пальцева. – М. : Медицина. 2009. – 728 с.
11. Блинков, Ю. Ю. Изучение влияния миелопида и его компонентов на иммунологическую реактивность и репаративный остеогенез : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.36 / Ю. Ю. Блинков ; [Курск. гос. мед. ун-т]. – Курск, 2000. – 22 с.
12. Бокерия Л.А. Темрезов М.Б., Борсов М.Х. и др. Прямая реваскуляризация - метод выбора в лечении больных критической ишемией нижних конечностей // Российский медицинский журнал. – 2011. – №6. – С. 23–27.
13. Бырихин, Н. И. Комплексный подход к лечению больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей : дис. д-ра мед. наук : 14.00.44 / Н. И. Бырихин; Ин-т хирургии им. А.В. Вишневского РАМН (ИХВ РАМН). – М., 2002. – 369 с.
14. Бытка, П. Ф. Микроциркуляция при облитерирующих заболеваниях сосудов нижних конечностей / П. Ф. Бытка, А. К. Опря // Клинич. медицина. – 1973. – № 4. – С. 44–48.
15. Вараксин В.А. Хирургическое лечение больных с облитерирующими поражениями артерий дистальных отделов нижних конечностей: автореф. дис. канд. мед. наук. – Ярославль, 1994. – 19с.
16. Влияние препарата «Актовегин» на метаболическую и вазомоторную функции микрососудистого эндотелия кожи человека / А. А. Федорович [и др.] // Рацион. фармакотерапия в кардиологии. – 2009. – Т. 6, № 1. – С. 53–60.
17. Влияние фармакотерапии хронических облитерирующих заболеваний артерий и нижних конечностей на состояние микроциркуляторного русла / И. Г. Учкин [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 20, № 2. – С. 27–35.

18. Возможности генной терапии в лечении хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / Ю. В. Червяков // Хирургия. Журн. им. Н. И. Пирогова. – 2014. – № 4. – С. 40–45.
19. Воронов, Д. А. Стимуляция ангиогенеза в улучшении результатов хирургического лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: экспериментальное обоснование и эффективность клинического применения / Д. А. Воронов, А. В. Гавриленко, Н. П. Бочков // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2009. – Т. 2, № 3. – С. 45–49.
20. Гавриленко А.В. Вестник Российской академии наук. – 2003. – №12. – С.74-77.
21. Гавриленко, А. В. Генные технологии стимуляции ангиогенеза как инновационное направление в ангиологии и сосудистой хирургии / А. В. Гавриленко, Д. А. Воронов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 7–14.
22. Гавриленко, А. В. Результаты комплексного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных технологий стимуляции ангиогенеза (часть 2) / А. В. Гавриленко, Д. А. Воронов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. – Т. 21, № 4. – С. 29–34.
23. Гавриленко, А. В. Современные возможности и перспективы хирургического лечения больных с критической ишемией нижних конечностей / А. В. Гавриленко, С. И. Скрылев, Е. А. Кузубова // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2002. – Т. 8, № 4. – С. 80–86.
24. Гавриленко, А. В. Эффективность применения генно-инженерных конструкций VEGF165 в комплексном лечении хронической ишемии нижних конечностей / Гавриленко, А.В., Олейник, Е.М. // Анналы хирургии. – 2015. – № 6. – С. 5–9.
25. Галстян, Г. Е. Алгоритм диагностики и лечения заболеваний артерий нижних конечностей // Consilium-Medicum. – 2006. – Т. 8, № 12. – С. 34–38.

26. Гмурман, В. Е. Теория вероятностей и математическая статистика : учеб. пособие для вузов / В. Е. Гмурман. – 10-е изд., стер. – М. : Высш. шк., 2004. – 479 с.

27. Гулевский, А. К. Клеточная трансплантация в кардиомиопластике при ишемическом повреждении миокарда / А. К. Гулевский, И. И. Щенявский, Е. С. Абакумова // Біотехнологія (Україна). – 2011. – Т. 14, № 1. – С. 60–72.

28. Дифференцировка клеток миелобластного (HL-60) и эритробластного (К-562) лейкозов под влиянием миелопептида-4 и миелопептида-6 / Е. А. Кирилина [и др.] // Российский симпозиум по химии и биологии пептидов : тез. стенд. сообщений. – Москва, 2003. – С. 73.

29. Дуданов, И. П. Критическая ишемия нижних конечностей / И. П. Дуданов, А. В. Карпов, М. Ю. Капутин // 80 лекций по хирургии / под ред. В. С. Савельева. – М. : Литтера, 2008. – С. 119–128.

30. Журавлева, Л. С. Миелопептиды в регуляции функций эффекторов врождённого иммунитета : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.03.09 / Л.С. Журавлева ; [Ин-т экологии и генетики микроорганизмов Урал. отд-ния РАН]. – Пермь, 2016. – 23 с.

31. Егоров, А. А. Клинические и патогенетические аспекты операции реваскуляризирующей остеотрепанации у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей: автореф. дис. канд. мед. наук. - Рязань, 2007. – 21 с.

32. Зусманович, Ф. Н. Показания и противопоказания к реваскуляризирующей остеотрепанации в лечении хронической артериальной недостаточности конечностей / Ф. Н. Зусманович, В. М. Дмитриев // Ангиология и сосудистая хирургия. – 1995. – № 2. – С. 11.

33. Иммунокорректирующее действие миелопептида у больных после операции на сердце в условиях искусственного кровообращения / Н. С. Богомолова [и др.] // Иммунология. – 1991. – № 1. – С. 55–58.

34. Иммуномодулирующее действие миелопида при его включении в комплексную терапию пациентов с проникающим ранением глаза / Т. В. Гаврилова [и др.] // Мед. иммунология. – 2008. – Т. 10, № 2–3. – С. 239–244.

35. Индукция дифференцировки в лейкозных клеточных линиях под влиянием миелопептида-4 / Е. А. Кирилина [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – № 11. – С. 565–569.

36. Инструкция по применению препарата «Миелопид» (Код АТХ: L03A. ГНЦ Антибиотиков и ГНЦ Ин-т иммунологии, Россия).

37. Инструкция по применению препарата «Неоваскулоген» (Код АТХ: V03AX. Федер. Гос. бюджет. учреждение «Гематологический научный центр» М-ва здравоохранения и соц. развития РФ (Россия).

38. Казаков, А. Ю. Результаты реконструктивных операций у больных с атеросклеротическим поражением артерий ниже паховой связки при критической ишемии нижних конечностей / Ю. И. Казаков, М. Г. Хатыпов, В. В. Бобков // Успенские чтения : материалы науч.-практ. конф. – Тверь, 2003. – Вып. 3. – С. 311–312.

39. Казьмин, З. В. Комплексное хирургическое и консервативное лечение хронической критической ишемии при отсутствии условий прямой реваскуляризации нижних конечностей : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.44 / З. В. Казьмин. – Москва, 2006. – 17 с.

40. Качество жизни больных с хронической ишемией нижних конечностей / К. Г. Абалмасов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2004. – Т. 10, № 2. – С. 7–12.

41. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей / С. В. Лебедев [и др.] // Вестн. РАМН. – 2013. – № 3. – С. 33–44.

42. Клеточная терапия хронической ишемии нижних конечностей / А. Б. Смолянинов [и др.] // АГ-инфо. – 2007. – № 3. – С. 10–15.

43. Клинико-морфологический анализ применения моноклеарной фракции аутологичных клеток костного мозга при эндокардиальной трансплантации у больного с выраженной ишемической дисфункцией миокарда

левого желудочка / Е. Н. Кливер [и др.] // Вестн. трансплантологии и искусств. органов. – 2015. – Т. 17, № 1. – С. 126–133.

44. Клиническая ангиология : рук. для врачей : в 2 т. / под ред. А. В. Покровского. – М. : Медицина, 2004. – Т. 1. – 804 с. ; Т. 2. – 887 с.

45. Клиническое применение тиотриазолина в терапии / И. А. Мазур [и др.] // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 6. – С. 77–81.

46. Коваленко, В. М. Ангиопротекция в комплексном лечении больных облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей : метод. пособие для врачей / В. М. Коваленко, М. Б. Темрезов, И. М. Калитко. – М., 2010. – 22 с.

47. Консервативная терапия больных хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей / В. М. Кошкин [и др.]. – М., 2002.

48. Коррекция реологических свойств крови – патогенетический подход к лечению больных с вертебрально–базиллярной недостаточностью / А. Н. Бойко [и др.]. – Врач. – 2005. – № 6. – С. 45–49.

49. Кохан, Е. П. Повторные реконструктивные вмешательства на артериях дистальнее паховой складки / Е. П. Кохан, О. В. Пинчук, И. И. Поляков // Материалы 27-й Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. – 2012. – Т. 17, № 1 (приложение). – С. 207–208.

50. Кошкин, В. М. Особенности микроциркуляции у больных с сахарным диабетом типа 2 / В. М. Кошкин, А. В. Каралкин, И. В. Кошкина // Consilium medicum. – 2008. – № 8. – С. 131–134.

51. Кошкин, В. М. Регионарная венозная гипертензия – как фактор компенсации нарушений микроциркуляции при хронических облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 17, № 1. – С. 105–110.

52. Кротовский, Г. С. Тактика лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей / Г. С. Кротовский, А. М. Зудин. – М., 2005. – 160 с.



53. Кузнецов, М. Р. Ранние реокклюзии у больных облитерирующим атеросклерозом / М. Р. Кузнецов, В. М. Кошкин, А. В. Каралкин. – Ярославль : Медицина, 2007. – 176 с.

54. Куликов, А. Ю. Фармакоэкономический анализ антиагрегантной терапии у пациентов с ИБС и высоким риском гастропатии / А. Ю. Куликов, И. С. Крысанов // Клинич. фармакология и терапия. – 2007. – Т. 16, № 1. – С. 62–65.

55. Лазаренко, В. А. Лечение критической ишемии нижних конечностей с использованием серотонина / В. А. Лазаренко, А. П. Симоненков, Е. В. Лазарев // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 26–31.

56. Лазерная доплеровская флоуметрия в оценке состояния и расстройств микроциркуляции крови : метод. пособие для врачей / В. И. Козлов [и др.] ; РУДН, ГНЦ лазерной медицины. – Москва, 2012. – 32 с.

57. Лечение хронической ишемии нижних конечностей с использованием стимуляторов неоангиогенеза / Л. А. Бокерия [и др.] // Клинич. физиология кровообращения. – 2013. – № 1. – С. 55–60.

58. Методы статистической обработки медицинских данных : метод. рекомендации для ординаторов и аспирантов мед. учеб. заведений, науч. работников / А. Г. Кочетов [и др.]. – М., 2012. – 42 с.

59. Миелопептид-3 – эндогенный иммунорегулятор, обладающий противобактериальной активностью / А. А. Михайлова [и др.] // Иммунология. – 2003. – № 6. – С.324–327.

60. Миелопептид-5 отменяет вирус-индуцированную иммуносупрессию, восстанавливая функции Т-лимфоцитов / Р. Г. Белевская [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – № 1. – С. 62–66.

61. Миелопид: иммунокорректирующая активность при переломах лицевых костей и травматическом остеомиелите / Р. Н. Степаненко [и др.] // Иммунология. – 1991. – № 1. – С. 44–47.

62. Мировой опыт и тенденции генотерапии ишемических заболеваний / Р. В. Деев [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 17, № 2. – С. 145–154.
63. Михайлова, А. А. Миелопептиды – новая группа регуляторных пептидов // Иммунология. – 1999. – № 4. – С. 14–17.
64. Михайлова, А. А. Регуляторные пептиды костного мозга – иммуномодуляторы нового поколения // Аллергология и иммунология. – 2001. – Т. 2, № 1. – С. 46.
65. Натрийуретический пептид NT-proBNP как предиктор риска развития кардиальных осложнений в интра- и раннем послеоперационном периоде после реконструктивных операций на магистральных артериях нижних конечностей / Ю. Л. Шевченко [и др.] // Материалы 28-й Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. – 2013. – Т. 19, № 2 (приложение). – С. 440-441.
66. Национальный институт здоровья [Электронный ресурс]. – НИИ, 9000 Rockville Pike Bethesda, Maryland, USA, 20892. – URL: [www.nih.gov](http://www.nih.gov).
67. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей / под ред. А. В. Покровского. – М., 2013. – 74 с.
68. Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией (Российский согласительный документ). Часть 1. Периферические артерии. – М. : Изд-во НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2010. – 176 с.
69. Ноздрачев, А. Д. Анатомия крысы : учеб.-практ. рук. / А. Д. Ноздрачев. – СПб. : Лань, 2001. – 464 с.
70. Новые плазмидные конструкции, предназначенные для терапевтического ангиогенеза и несущие гены ангиогенных факторов роста VEGF, HGF и ангиопоэтина-1 / П. И. Макаревич [и др.] // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 47–52.

71. Общая теория статистики : учебник / под ред. Р. А. Шмойловой. – 4-е изд., перераб. – М. : Финансы и статистика, 2004. – 656 с.

72. Отдаленные результаты лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей методами не прямой реваскуляризации и генотерапии / Ю. В. Червяков [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2016. – Т. 22, № 1. – С. 29–36.

73. Отдаленные результаты применения р1-VEGF165 при хронической ишемии нижних конечностей вследствие облитерирующего атеросклероза / Р. В. Деев [и др.] // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2015. – Т. 8, № 4. – С. 43–49.

74. Орлова, А. Ю. Экспериментальное и клиническое обоснование фармакологической стимуляции неоваскулогенеза при ишемии конечности : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.25, 14.00.27 / А. Ю. Орлова ; [Курск. гос. мед. ун-т]. – Курск, 2009. – 22 с.

75. Периферическая микроциркуляция у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей на фоне метаболического синдрома / О. В. Каменская [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 20, № 4. – С. 21–26.

76. Петрищев, Н. Н. Лазер-индуцированный тромбоз микрососудов / Н. Н. Петрищев, И. А. Михайлова. – СПб. : СПбГМУ, 2001. – 87 с.

77. Петров, Р. В. Костномозговые иммунорегуляторы миелопептиды / Р. В. Петров, А. А. Михайлова, Л. А. Фомина // Рос. хим. журн. – 2005. – Т. 49, № 1. – С. 55–63.

78. Петров, Р. В. Эндогенные иммунорегуляторные пептиды (миелопептиды): структура, функция, механизм действия / Р. В. Петров, А. А. Михайлова, Л. А. Фомина // Биоорган. химия. – 1999. – Т. 25, № 11. – С. 811–815.

79. Покровский, А. В. Вазапостан (простагландин E1) в комплексном лечении больных с ишемической диабетической стопой / А. В. Покровский,

В. Н. Дан, А. В. Чупин // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2000. – Т. 6, № 2. – С. 19–26.

80. Применение поясничной симпатэктомии в лечении облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей – современный взгляд на проблему / А.В. Гавриленко [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2004. – Т. 10. – №3. – С. 90-96.

81. Реалии и перспективы применения генной терапии в сердечно-сосудистой хирургии / Н. Д. Мжаванадзе [и др.] // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. 58–62.

82. Реваскуляризирующая остеотрепанация в комплексном хирургическом лечении хронической критической ишемии нижних конечностей / Ю.А. Бельков [и др.] // Хирургия. – 2004. – № 9. – С. 14-16.

83. Рекомендуемые стандарты для оценки результатов лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей. Российский консенсус. М. – 2005.

84. Результаты повторных открытых реконструкций у больных с критической ишемией нижних конечностей / В.А. Батрашов [и др.] // Материалы 31-й Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. – 2015. – Т. 21, № 4 (приложение). – С. 18-19.

85. Родионов, О.А. Хирургическое лечение критической ишемии нижних конечностей у больных при поражении аорто-подвздошного сегмента с тяжелой сопутствующей соматической патологией : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.26 / О. А. Родионов ; [Курск. гос. мед. ун-т]. – Курск, 2017. – 24 с.

86. Самодай, В. Д. Нестандартная хирургия критической ишемии нижних конечностей / В. Д. Самодай, Ю. А. Пархисенко, А. А. Иванов. – М. : МИА, 2009. – 240 с.

87. Савельев, В. С. Патогенез и консервативное лечение тяжелых стадий облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей / В. С. Савельев, В. М. Кошкин, А. В. Каралкин. – М. : МИА, 2010. – 216 с. : ил.

88. Синтез и свойства ретро-аналога миелопептида-2 / Л. А. Фолина [и др.] // Биоорганич. химия. – 2005. – Т. 31, № 3. – С. 239–244.
89. Современные диагностические технологии в определении тактики лечения больных с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей / Д. Н. Майстренко [и др.] // Вестн. хирургии. – 2009. – № 2. – С. 41–46.
90. Соловьев, И. А. Роль ангиогенеза в сердечно-сосудистой патологии / И. А. Соловьев, В. В. Сопельняков // Клеточные технологии. – М., 2005. – С. 114–152.
91. Сосудистая хирургия по Хаймовичу. В 2 т. Т. 1 / под ред. Э. Ашера ; пер. с англ. под ред. А. В. Покровского. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 644 с.
92. Сравнительная оценка методов прогнозирования эффективности поясничной симпатэктомии у пациентов с критической ишемией нижних конечностей / Э.Е. Кислов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2009. – Т. 15. – № 1. – С. 138–141.
93. Староверов, И. Н. Новое в лечении больных с ХОЗАНК / И. Н. Староверов, Ю. В. Червяков, Е. Г. Нерсесян // Материалы IV Конгресса хирургов. – Москвы, 2011. – С. 135.
94. Староверов, И. Н. Пути улучшения диагностики и хирургического лечения послеоперационных стенозов и окклюзий магистральных артерий нижних конечностей : автореф. дис. ... докт. мед. наук. : 14.01.26 / И. Н. Староверов : [Яросл. гос. мед. ак.] – Ярославль, 2014. – 49 с.
95. Суковатых, Б. С. Новые подходы к лечению хронической ишемии конечности в эксперименте / Б. С. Суковатых, А. Ю. Орлова, М. В. Покровский // Актуальные проблемы хирургии : сб. материалов конф. – Ташкент, 2009. – С. 280–281.
96. Сулодексид в консервативном лечении заболеваний периферических артерий / М. Р. Кузнецов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. – Т. 21, № 4. – С. 45-50.

97. Тактические ошибки в лечении больных с критической ишемией нижних конечностей при поражении бедра и голени / А. В. Гавриленко [и др.] // Хирургия. – 2011. – № 5. – С. 10–14.

98. Терещенко, С. Н. Антитромботическая терапия как основа профилактики сердечно-сосудистых осложнений. Фокус на ацетилсалициловую кислоту / С. Н. Терещенко, Н. А. Джиани // Трудный пациент. – 2008. – Т. 6, № 11. – С. 5–10.

99. Троицкий, А. В. Результаты реконструктивных операций у больных с поражением артерий голени / А. В. Троицкий, Е. Р. Лысенко, Р. И. Хабазов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2003. – № 1. – С. 102–108.

100. Учкин, И. Г. Влияние фармакотерапии хронических облитерирующих заболеваний артерий и нижних конечностей на состояние микроциркуляторного русла / И. Г. Учкин, А. М. Зудин, А. Г. Багдасарян // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 20, № 2. – С. 27–35.

101. Фонд биомедицинских исследований [Электронный ресурс]. – FBR, 1100 Vermont Ave., Ste. 1100 Washington, D.C., USA, 20005. – URL: [www.fbr.gov](http://www.fbr.gov).

102. Хабриев, Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М. : Медицина, 2005. – 832 с. : ил.

103. Хирургические болезни / под ред. В. С. Савельев, А. И. Кириенко. – 2-е изд., испр. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – Т. 1. – 603 с. ; Т. 2. – 398 с.

104. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Деев Р.В. Результаты лечения больных с ХОЗАНК препаратом на основе гена, кодирующего сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 73.

105. Шевченко, Ю. Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии / Ю. Л. Шевченко. – СПб. : Наука, 2006. – 287 с.

106. Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2

на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC / И. И. Салафутдинов [и др.] // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, № 2. – С. 62–67.

107. Эффективность и безопасность применения препарата Неоваскулген в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIВ–III фаза клинических испытаний) / П. Г. Швальб [и др.] // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 3. – С. 76–83.

108. A chromatin remodeling complex involved in transcription and DNA processing / X. Shen [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 406. – P. 541–544.

109. Actovegin: a biological drug for more than 5 decades / F. Buchmayer [et al.] // Wien. Med. Wochenschr. – 2011. – Vol. 161, N 3-4. – P. 80–88.

110. Al-Khaldi, A. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model / A. Al-Khaldi // Ann. Thorac. Surg. – 2003. – Vol. 75, N 1. – P. 204–209.

111. Andriuoli, G. Antithrombotic activity of a glycosaminoglycan (sulodexide) in rats / G. Andriuoli, R. Mastacchi, M. Barbanti // Thromb. Res. – 1984. – Vol. 34, N 1. – P. 81–86.

112. Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease: The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy / G. P. Clagetti [et al.] // J. Chest. – 2004. – Vol. 126, (suppl. 3). – P. 609S–626S.

113. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation / S. Shintani [et al.] // Circulation. – 2001. – Vol. 103, N 6. – P. 897–908.

114. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells improved heart function after myocardial infarction / G. S. Lin [et al.] // Acta Pharmacol. Sin. – 2004. – Vol. 25, N 7. – P. 876–886.

115. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice / G. C. Schatteman [et al.] // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 106, N 4. – P. 571–578.

116. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization / T. Asahara [et al.] // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85, N 3. – P. 221–228.
117. Bosiers, M. Critical limb ischemia / M. Bosiers, P. A. Schneider. – N.-Y. : Informa Healthcare USA, 2009. – 325 p.
118. Böyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* – 1998. – Vol. 21. Suppl. 97. – P. 1–9.
119. Carmeliet, P. Angiogenesis in cancer and other diseases / P. Carmeliet, R. K. Jain // *Nature.* – 2000. – № 407. – P. 249–257.
120. Catania, G. Pharmacological treatment of intermittent claudication: double blind controlled study of Sulodexide vs placebo / G. Catania, T. Salanitri // *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* – 2002. – Vol. 14, N 3. – P. 149–157.
121. Cilostazol activates function of bone marrow-derived endothelial progenitor cell for re-endothelialization in a carotid balloon injury model / R. Kawabe-Yako [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, Issue 9. – e24646.
122. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patients with ischaemic limb / J. M. Isner [et al.] // *Lancet.* – 1996. – Vol. 348, N 9024. – P. 370–374.
123. Clopidogrel protects from cell apoptosis and oxidative damage in a mouse model of ischaemia-reperfusion injury / H. Hu [et al.] // *J. Pathol.* – 2011. – Vol. 225, N 2. – P. 265–275.
124. Coccheri, S. Biological and clinical effects of sulodexide in arterial disorders and diseases // *Int. Angiol. Jun.* – 2014. – Vol. 33, N 3. – P. 263–274.
125. Coccheri, S. Development and use of sulodexide in vascular diseases: implications for treatment / S. Coccheri, F. Mannello // *Drug. Des. Devel. Ther. Dec.* – 2013. – Vol. 24, N 8. – P. 49–65.
126. Combination of cilostazol and clopidogrel attenuates Rat critical limb ischemia / J.-J. Sheu [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2012. – N 10. – P. 164.
127. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells / J. Tolar [et al.] // *Stem Cells.* – 2010. – Vol. 28, N 8. – P. 1446–1455.



128. De novo superficial femoropopliteal artery lesions: peripheral cutting balloon angioplasty and stenosis rates-randomized controlled trial / J. Amighi [et al.] // *Radiology*. – 2008. – Vol. 247, N 1. – P. 267–272.

129. Dimmtr, S. Vascular repair by circulation endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis / S. Dimmtr, A. M. Zeiher // *J. Mol. Med.* – 2005. – Vol. 82, N 10. – P. 671–677.

130. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia / M. R. Finney [et al.] // *Biol. Blood Marrow Transpl.* – 2006. – Vol. 12, N 5. – P. 585–593.

131. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration / S. M. Majka [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 111, N 1. – P. 71–79.

132. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury / N. Elmali [et al.] // *Ulus. Travma Acil Cerrahi Derg.* – 2007. – Vol. 13, N 4. – P. 274–280.

133. Elmlinger, M. W. Neuroprotective and Anti-Oxidative Effects of the Hemodialysate Actovegin on Primary Rat Neurons in Vitro / M. W. Elmlinger, M. Kriebel, D. Ziegler // *Neuromolecular Med.* – 2011. – Vol. 13, N 4. – P. 266–274.

134. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation / J. R. Crosby [et al.] // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87, N 9. – P. 728–730.

135. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration / H. Iwaguro [et al.] // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105, N 6. – P. 732–738.

136. Fadini, G. P. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature / G. P. Fadini, C. Agostini, A. Avogaro // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 209, N 1. – P. 10–17.

137. Fate of cultured-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics / C. Toma [et al.] // *Circ. Res.* – 2009. – Vol. 104, N 3. – P. 398–402.

138. Fibrinogen, D-dimer and thrombin-anti thrombin complexes in a random population sample: relationships with other cardiovascular risk factors / C. Gianstane [et al.] // *Thromb. Haemostasis.* – 1994. – Vol. 71, N 5. – P. 581–586.

139. Frati Munari, A. C. Medical significance of endothelial glycocalyx. Part 2: Its role in vascular diseases and in diabetic complications // *Arch. Cardiol. Mex.* – 2014. – Vol. 84, N 2. – P. 110–116.

140. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease // *Nat. Med.* – 1995. – № 1. – P. 27–31.

141. Folkman, J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors // *Ann. Surg.* – 1972. – Vol. 175, N 3. – P. 409–416.

142. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo / S. Kaushal [et al.] // *Nat. Med.* – 2001. – Vol. 7, N 9. – P. 1035–1040.

143. Gupta, R. Human Studies of Angiogenic Gene Therapy / R. Gupta, J. Tongers, D. W. Losordo // *Circ. Res.* – 2009. – Vol. 105, N 8. – P. 724–736.

144. Gurevich, V. S. Influenza, autoimmunity and atherogenesis // *Autoimmun. Rev.* – 2005. – Vol. 4, N 2. – P. 101–105.

145. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis / M. Sata [et al.] // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8, N 4. – P. 403–409.

146. Hoppensteadt, D. A. Pharmacological profile of sulodexide / D. A. Hoppensteadt, J. Fareed, // *Int. Angiol. Jun.* – 2014. – Vol. 33, N 3. – P. 229–235.

147. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells / I. Rosova [et al.] // *Stem Cells.* – 2008. – Vol. 26, N 8. – P. 2173–2182.

148. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines / H. Kamihata [et al.] // *Circulation*. – 2001. – Vol. 104, N 9. – P. 1046–1052.

149. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells / A. Miranville [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 110, N 3. – P. 349–555.

150. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells / U. M. Gehling [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 95, N 10. – P. 3106–3112.

151. Intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA) / D. H. Walter [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Interv.* – 2011. – Vol. 4, N 1. – P. 26–37.

152. Intra-arterial bone marrow cell transplantation induces angiogenesis in rat hind limb ischemia / M. Yoshida [et al.] // *Eur. Surg. Res.* – 2003. – Vol. 35, N 2. – P. 86–91.

153. Intra-myocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia / A. Kawamoto [et al.] // *Circulation*. – 2003. – Vol. 107, N 3. – P. 461–468.

154. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II) / L. Norgren [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2007. – Vol. 45, Issue 1, Suppl. – P. 5–67.

155. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara [et al.] // *Science*. – 1997. – Vol. 275, N 5302. – P. 964–967.

156. Lawall, H. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal / H. Lawall, P. Bramlage, B. Amann // *Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 103, N 4. – P. 696–709.

157. Left ventricular pseudoaneurysm after myocardial infarction / H. Koçak [et al.] // *Heart Vessels*. – 2003. – Vol. 18, N 3. – P. 160–162.

158. Lindsberg, P. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke / P. Lindsberg, A. Grau // *Stroke*. – 2003. – Vol. 34, N 10. – P. 2518–2532.

159. Luttun, A. Vascular progenitors: from biology to treatment / A. Luttun, G. Carmeliet, P. Carmeliet // *Trends Cardiovasc. Med*. – 2002. – Vol. 12, N 2. – P. 88–96.

160. Martino, R. The significance of sulodexide in the prevention of obliterative atherosclerotic arterial disease of the lower limbs / R. Martino, D. Benini // *Clin. Ter*. – 1985. – Vol. 112, N 5. – P. 429–437.

161. Meta-analysis of randomized, controlled clinical trials in angiogenesis: gene and cell therapy in peripheral arterial disease / J. De Haro [et al.] // *Heart Vessels*. – 2009. – Vol. 24, N 5. – P. 321–328.

162. Meta-analysis of some results of clinical trials on sulodexide therapy in peripheral occlusive arterial disease / A. Gaddi [et al.] // *Int. Med. Res*. – 1996. – Vol. 24, N 5. – P. 389–406.

163. Michaelson, I. C. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders // *Trans. Ophthalmol. Soc. UK*. – 1948. – Vol. 68. – P. 137–180.

164. Miyahara, Y. Monolayered mesenchymal stem cells repair system scarred myocardium after myocardial infarction / Y. Miyahara, N. Nagaya // *Nat. Med*. – 2006. – Vol. 12, N 4. – P. 459–465.

165. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs / K. Yamamoto [et al.] // *Ather. Thromb. Vasc. Biology*. – 2004. – Vol. 24, Issue 12. – P. 192–196.

166. Myelopeptides-bone marrow mediators with immunostimulating and endorphinlike activity / R. V. Petrov [et al.] // *Scand. J. Immunol*. – 1986. – Vol. 24. – P. 237–243.

167. Myoendothelial Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cells in Ischemic Limb Tissues / M. Pesce [et al.] // *Circ. Res*. – 2003. – Vol. 93, N 5. – P. 51–62.

168. Nakagami, H. Novel autologous cell Therapy in Ischemic Limb Disease Through Growth Factor Secretion by Cultured Adipose Tissue-Derived Stromal Cells / H. Nakagami, K. Maeda, R. Morishita // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25, N 12. – P. 25–42.

169. National Institute for Health and Clinical Excellence. Cilostazol, naftidrofuryl oxalate, pentoxifylline and inositol nicotinate for the treatment of intermittent claudication in people with peripheral arterial disease. 2011; 69.

170. Neovascularization induced by autologous bone cells implantation in peripheral arterial disease / K. Esato [et al.] // *Cell Transplant.* – 2002. – Vol. 11, N 8. – P. 747–752.

171. Nishikawa, M. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer / M. Nishikawa, L. Huang // *Hum. Gene Ther.* – 2001. – Vol. 12, N 8. – P. 861–870.

172. Ogawa, R. Vascular tissue engineering and vascularized 3D tissue regeneration / R. Ogawa, K. Oki, H. Hyakusoku // *Regen. Med.* – 2007. – Vol. 2, N 5. – P. 831–837.

173. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow / M. Reyes [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109, N 3. – P.337–346.

174. Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years / L. Armstrong [et al.] // *Stem Cells.* – 2012. – Vol. 30, N 1. – P. 2–9.

175. Pentoxifylline inhibits the synthesis and IFN-gamma-inducing activity of IL-18 / T. Samardzic [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2001. – Vol. 124. – P. 274–281.

176. Pepper, M. S. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17, N 4. – P. 605–619.

177. Pit'ha, J. What do have arterial and venous disease in common? / J. Pit'ha, O. Auzky, K. Roztocil // *Vnitr. Lek.* – 2014. – Vol. 60, N 11. – P. 985–989.

178. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action / F. Machicao [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2012. – Vol. 322, N 1-2. – P. 222–227.

179. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages / S. I. Nishikawa [et al.] // *Development*. – 1998. – Vol. 125, N 9. – P. 1747–1757.

180. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro / M. S. Pepper [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – Vol. 189. – P. 824–831.

181. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials / D. Hou [et al.] // *Circulation*. – 2005. – Vol. 112, Suppl. 9. – P. 1150–1156.

182. Rutherford R.B. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: Revised version / R.B. Rutherford, J.D. Baker, C. Ernst // *J. Vasc. Surg.* – 1997. – Vol. 26. – P. 516–538.

183. Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: results of the HGF-0205 trial / R. J. Powell [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2010. – Vol. 52, N 6. – P. 1525–1530.

184. Schainfeld, R. M. Critical limb ischemia: nothing to give at the office? / R. M. Schainfeld, J. M. Isner // *Ann. Intern. Med.* – 1999. – Vol. 130, N 5. – P. 442–444.

185. Second European Consensus Document on chronic critical leg ischemia // *Circulation*. – 1991. – Vol. 84 (IV). – P. 1–26.

186. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells / J. Rehman [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109, N 10. – P. 1292–1298.

187. Selective impairment of noradrenergic transmission in the bisected rat vas deferens following photochemically-induced cerebral ischaemia / C. Boselli [et al.] // *Int. J. Androl.* – 2007. – Vol. 30, N 3. – P. 129–136.

188. Shibuya, M. VEGF-VEGFR signals in health and disease // *Biomol. Ther.* – 2014. – Vol. 22, N 1. – P. 1–9.

189. Teissie, J. Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present knowledge / J. Teissie, M. Golzio, M. P. Rols // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol. 1724, N 3. – P. 270–280.
190. Tidball, J. G. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration / J. G. Tidball, S. A. Villalta // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2010. – Vol. 298, N 5. – P. R1173–1187.
191. Tibioperoneal (outflow lesion) angioplasty can be used as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: five-year follow-up / G. Dorros [et al.] // *Circulation.* – 2001. – Vol. 104, N 17. – P. 2057–2062.
192. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization / C. Kalka [et al.] // *Proc. Natl. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, N 7. – P. 3422–3427.
193. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization / T. Murohara [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 105, N 11. – P. 1527–1536.
194. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid / D. R. Senger [et al.] // *Science.* – 1983. – Vol. 219, N 4587. – P. 983–985.
195. Use of sulodexide in patients with peripheral vascular disease / J. Lasierra-Cirujeda [et al.] // *J. Blood. Med.* – 2010. – N 1. – P. 105–115.
196. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation / G. D. Yancopoulos [et al.] // *Nature.* – 2000. – N 407. – P. 242–248.
197. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family / E. Tischer [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. – Vol. 165, N 3. – P. 1198–1206.
198. Vascular endothelial growth factor gene transfer for diabetic polyneuropathy: a randomized, double-blinded trial / A. Ropper [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2009. – Vol. 65, N 4. – P. 386–393.
199. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF / P. J. Keck [et al.] // *Science.* – 1989. – Vol. 246, N 4935. – P. 1309–1312.

200. Vascular Society of Great Britain and Ireland // B.J.Surg. – 2007. – № 94: issue 2. – P. 1–13.

201. Waterman, R. S. Treating chronic pain with mesenchymal stem cells: A therapeutic approach worthy of continued investigation / R. S. Waterman, A. M. Betancourt // J. Stem. Cell Res. Ther. – 2011. – Vol. S2. – P. 001.

202. Watson, K. Peripheral arterial disease: a review of disease awareness and management / K. Watson, B. D. Watson, K. S. Pater // Am. J. Geriatr. Pharmacother. – 2006. – Vol. 4, N 4. – P. 365–379.