

*На правах рукописи*

ГОРДОВ МАКСИМ ЮРЬЕВИЧ

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

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Курск – 2017г.

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:** Суковатых Борис Семенович,  
доктор медицинских наук, профессор

**Научный консультант:** Артюшкова Елена Борисовна,  
доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Кохан Евгений Павлович** - доктор медицинских наук, профессор, лауреат Государственной премии СССР, 3 Центральный военный госпиталь им. А.А. Вишневского Министерства обороны Российской Федерации, Центр сосудистой хирургии, консультант-хирург.

**Староверов Илья Николаевич** – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт последиplomного образования, кафедра хирургии, заведующий кафедрой.

**Ведущая организация:** ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «15» сентября 2017г. в 12-00 часов на заседании объединенного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук Д 999.052.02 на базе ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, по адресу: 105203, Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института усовершенствования врачей ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (105203, Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 65), и на сайте <http://www.pirogov-center.ru>

Автореферат разослан «24» июля 2017г.

Ученый секретарь объединенного  
диссертационного совета

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Критическая ишемия нижних конечностей (КИНК) по материалам Трансатлантического международного согласительного документа (TASC II, 2007) встречается у 500-1000 человек на 1 млн. жителей в год. Однако, принимая во внимание неуклонное старение населения, глобальное увеличение распространенности метаболического синдрома, сахарного диабета, курения и ожирения, прогнозируется значительное увеличение числа больных (TASC II, 2007).

Ежегодно по данным мировой статистики на 1 млн. жителей выполняется до 500 больших и малых ампутаций. В России ежегодно от 50 до 70 тысяч ампутированных больных становятся инвалидами, что представляет собой не только медицинскую, но и социальную проблему (Абалмасов К.Г., Бузиашвили Ю.И., Морозов К.М., 2004). Наиболее частой причиной развития критической ишемии являются распространенные окклюзионно-стенотические поражения бедренно-подколенно-берцового сегмента артериального русла нижних конечностей. При поражении артерий голени и стопы и неудовлетворительном состоянии дистального русла большинство хирургов предпочитают отказываться от реконструктивных операций и проводят консервативную терапию без или в сочетании с паллиативными оперативными вмешательствами (реваскуляризирующая остеотрепанация, поясничная симпатэктомия) (Поляков И.И., 2012; Староверов И.Н., 2014; Батрашов В.А., 2015). Отсутствие возможности выполнения реконструктивной операции диктует необходимость разработки, внедрения и тщательного анализа новых путей паллиативной реваскуляризации.

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 (Лебедев С.В., 2013). 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 (Elmali N., 2007; Boselli C., 2007; Воронов Д.А., 2009; Waterman R.S., 2011; Каменская О.В., 2014). Следовательно, актуальным является поиск и разработка новых способов моделирования экспериментальной ишемии конечности.

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 (Лебедев С.В., Карасев А.В., Кунгурцев В.В., 2015). На основании анализа мировой литературы опубликован обзор принципов, фундаментальных концепций и возможностей

генно-инженерных технологий стимуляции ангиогенеза (Гавриленко А.В., Воронов Д.А., 2015). 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 (МНФ) (Watson K., Pharm D., Watson V.D., 2006; Walter D. H., 2011).

В литературе описаны способы введения стволовых клеток в ишемизированные мышцы бедра и голени пораженной конечности инфильтрационно из шести различных точек (Tidball J.G., 2010; Waterman R. S., 2011), в системный кровоток (Miranville A., Heeschen C., Sengens C., 2004) или же внутриаартериально (Yoshida M., Horimoto H., Mieno S., 2003; Rosova I., 2008). Основным недостатком данных способов введения клеток костного мозга является отсутствие стимуляции развития коллатерального кровотока из зоны с достаточным кровоснабжением в дистальные ишемизированные участки.

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 (Петров, Р.В., 2005). КИНК можно рассматривать как ишемическое повреждение тканей вследствие недостаточного поступления артериальной крови. Поэтому можно ожидать позитивного влияния препарата на течение критической ишемии конечностей.

Таким образом, поиск новых решений для лечения критической ишемии нижних конечностей путем стимуляции неоваскулогенеза с целью снижения количества ампутаций и улучшения качества жизни пациентов является актуальным.

**Степень разработанности темы исследования.** Несмотря на внушительное количество и разнообразие методов лечения критической ишемии конечностей по имеющимся литературным данным, остаются открытыми следующие вопросы. Во-первых, остаются противоречивыми результаты традиционной консервативной терапии без и в сочетании с реваскуляризирующей остеотрепанацией (РОТ) при лечении больных с критической ишемией нижних конечностей. Во-вторых, до настоящего времени не создано такой модели экспериментальной критической ишемии, которая позволяет полностью воспроизводить патогномичную картину критической ишемии как у пациентов с хроническими облитерирующими заболеваниями

артерий нижних конечностей (ХОЗАНК). В-третьих, весьма ограниченно изучено влияние на процессы неоваскулогенеза и микроциркуляции субпопуляции моноклеарных 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.

**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:**

- изучить результаты традиционной консервативной терапии без и в сочетании с реваскуляризирующей остеотрепанацией у больных с критической ишемией нижних конечностей;
- разработать модель экспериментальной критической ишемии конечности, позволяющей получить схожую патогномичную картину ишемии конечности, соответствующую III-IV стадии ишемии по классификации Покровского-Фонтейна у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей;
- разработать способ лечения экспериментальной критической ишемии конечности моноклеарными клетками аутологичного костного мозга;
- изучить влияние на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза моноклеарных клеток аутологичного костного мозга на примере лечения экспериментальной критической ишемии конечности;
- изучить влияние на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза препарата «Миелопид» при лечении экспериментальной критической ишемии конечности;
- изучить комбинированное применение моноклеарных клеток аутологичного костного мозга и препарата «Миелопид» при лечении экспериментальной критической ишемии конечности.

**Научная новизна исследования:** Впервые разработана оригинальная модель экспериментальной критической ишемии конечности, позволяющей получить схожую патогномичную картину ишемии конечности у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

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

Доказано позитивное влияние на процессы микроциркуляции и неоваскулогенез мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга при лечении экспериментальной критической ишемии конечности.

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

Изучено влияние на процессы микроциркуляции и неоваскулогенез комбинированного применения мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга и препарата «Миелопид» при лечении экспериментальной критической ишемии конечности. На основании проведенного исследования установлено, что данный метод позволяет достоверно улучшить результаты лечения экспериментальной критической ишемии конечностей.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Обоснованы:

- 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;
- экспериментальная методика забора клеток костного мозга у лабораторных животных для лечения экспериментальной критической ишемии конечности;
- методика получения и введения мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга в ишемизированную конечность, позволяющая улучшать коллатеральное кровообращение и активизировать процессы неоваскулогенеза в ишемизированных тканях.

Доказаны:

- ангиопротективные свойства препарата «Миелопид» при лечении экспериментальной критической ишемии конечности, которые выражаются в позитивном влиянии на микроциркуляцию и регенераторный процесс в ишемизированных тканях;
- благоприятное влияние комбинированного применения мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга и препарата «Миелопид» на процессы микроциркуляции и неоваскулогенеза при лечении экспериментальной критической ишемии.

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

**Положения диссертации, выносимые на защиту:**

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.

Разработанный способ введения мононуклеарной 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.

Иммуностимулирующий препарат «Миелопид» в дозировке 50 мкг/кг/сут способствует стимуляции неоваскулогенеза и позитивно влияет на процессы микроциркуляции.

Комбинированное применение мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга и иммуностимулирующего препарата «Миелопид» позитивно влияет на течение экспериментальной критической ишемии конечностей за счет развития неоваскулогенеза и усиления коллатерального кровообращения.

**Реализация и внедрение результатов исследования.** 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 Курского государственного медицинского университета Минздрава России.

**Апробация и практическая реализация работы.** Апробация работы состоялась 24 марта 2017 года на совместном заседании кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии, хирургических болезней № 1, хирургических болезней № 2, хирургических болезней ФПО, общей хирургии и фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Материалы диссертационного исследования 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.** По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 5 – в изданиях, определенных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для опубликования результатов диссертационного исследования. По материалам диссертационной работы получены 2 патента на изобретение №2556606 от 10.07.2015г., №2559937 от 20.08.2015г.

**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.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

### **Материалы и методы исследования.**

Для выполнения поставленных нами задач были проведены два блока исследований: клинический и экспериментальный.

**Клиническое исследование.** 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. Критерии включения пациентов: 1) больные с острыми артериальными тромбозами артерий голени и дистальных бедренно-подколенных шунтов на фоне их окклюзионно-стенозных 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, берцовых); 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. Все пациенты были мужского пола. У 100% пациентов во всех группах выявлена различная сопутствующая соматическая патология: 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%).



В первой группе больных (n=20), отказавшихся от предложенной первичной ампутации ввиду невозможности выполнения реконструктивной операции и наличия распространенных некротических процессов на голени и стопе, проводилась традиционная консервативная терапия (антикоагулянты, ангиопротекторы, обезболивание, физиопроцедуры).

Во второй группе (n=20), при отсутствии распространенных некротических процессов на стопе и голени, на фоне консервативной терапии решением консилиума проводилась операция РОТ под спинномозговой анестезией по стандартной методике.

В качестве инструментальной диагностики использовали функциональные методы исследования сосудистой системы нижних конечностей: реовазография с определением реовазографического индекса (РИ), доплерография с измерением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), фотоплетизмография с определением фотоплетизмографического индекса (ФИ), ультразвуковое ангиосканирование с выявлением частоты окклюзионно-стенотических поражений артерий нижних конечностей. Все инструментальные обследования в первой и во второй группе выполнялись до и после проведенного лечения.

Результаты проведенного лечения также оценивались через 6 месяцев на основании степени изменения клинического статуса по отношению к периоду до лечения по шкале Rutherford et. al., рекомендованную в качестве стандарта Российским обществом ангиологов и сосудистых хирургов.

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

**Экспериментальное исследование.** Экспериментальные исследования выполнены на базе НИИ Экспериментальной медицины ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России на 130 белых крысах линии “Wistar” в 5 группах исследования. 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.

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 мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга (МНФ) (n=30), во 2-й – иммуностимулирующим препаратом «Миелопид» (n=30), в 3-й – комбинированным применением МНФ и препарата «Миелопид» (n=30).

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».

**Моделирование экспериментальной критической ишемии конечности.** 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).

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. Перевязывали и пересекли а. saphena (аналог глубокой артерии бедра у человека). В дистальном направлении, в области бифуркации подколенной артерии, ее лигировали и отсекали. Участок магистрального сосуда, включающий бедренную, подколенную артерию, артерию сафена и начальные отделы артерий голени удаляли. На кожу шелковой нитью размером 1.0 накладывали один непрерывный шов.

#### **Методика получения и введения МНФ.**

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.

МНФ выделяли по методу Vöyum (Vöyum A., 1998), принцип которого основан на различии в плавучей плотности форменных элементов. Аспирированный костный мозг разводили физиологическим раствором (рН 7,2) в соотношении 1:5; центрифугировали в градиенте плотности фиколл-верографин при 400g в течение 30 мин. Полученную моноклеарную фракцию трижды отмывали в физиологическом растворе, забуференном с помощью фосфатно-солевого буфера (ЗФФР) и ресуспендировали в среде RPMI-1640 в

концентрации  $10^6$  клеток в мл. Жизнеспособность клеток, определяемая по методу окрашивания с трипановым синим, превышала 96%.

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.

Лечение экспериментальной ишемии МНФ начато на седьмые сутки после операции. Согласно результатам предшествующих исследований (Tilg, H., Eibl, B., Pichl, M., 2003; Fadini G. P., 2010; Powell R.J., Goodney P., Mendelsohn F.O., 2010) 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.

**Обоснование дозы исследуемого препарата.** В работе использовался иммуностимулирующий препарат «Миелопид» (производство ГНЦ Антибиотиков и ГНЦ Институт иммунологии, Россия, Код АТХ: L03A). Ангиопротективные эффекты препарата «Миелопид» на модели экспериментальной критической ишемии конечности изучали в дозе 50 мкг/кг/сут, исходя из средней терапевтической дозы 0,05 мг/кг у человека (Инструкция по применению препарата «Миелопид»). «Миелопид» разводили в 0,9% растворе натрия хлорида и вводили внутримышечно в дозе 0,1 мл на 100 г массы тела животного через 3 часа после операции, затем ежедневно в течение пяти суток.

**Методы оценки эффективности разработанных методов.** Изучали следующие местные и общие проявления смоделированной ишемии конечности: общее состояние животных, их двигательная активность; выраженность ишемического отека и цвет оперированной конечности, реакция животного на касание инструментом пораженной конечности, явления «перемежающей хромоты» по косвенным признакам, наличие трофических нарушений. Наблюдения выполняли на 7 сутки после моделирования экспериментальной ишемии конечности.

Лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) осуществлялась лазер-доплеровским флоуметром «Віорас-systems MP-100» и специализированным датчиком «TSD-144». Запись и обработка полученных данных производилась при помощи компьютерной программы «AcqKnowledge-38». Исследование перфузии у лабораторных животных выполнялось 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 мышце пораженной конечности.

После измерения уровня перфузии исследуемая мышца забиралась на аутопсию для морфологического исследования. 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 (ИАВШ) производили следующим образом по формуле (Савельев В.С., Кошкин В.М., Каралкин А.В., 2010):

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

где,  $\varnothing \text{ вен}$  – средний диаметр венул,  $\varnothing \text{ арт}$  – средний диаметр артериол.

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).

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 (Гмурман В.Е., 2004; Шмойлова Р.А., 2004; Кочетов А.Г., Лянг О.В., Масенко В.П., 2012).

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

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.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.**

**Результаты клинического исследования.** У больных, как в первой, так и во второй клинических группах, зарегистрировано дистальное поражение артериального русла нижних конечностей: окклюзию подколенной артерии

(ПКА) и задней большеберцовой артерии (ЗББА) наблюдали у 33 (82,5%) больных, а стеноз – у 7 (17,5%) больных.

Результаты изучения макрогемодинамики и микроциркуляции в исследуемых клинических группах до и после проведенного лечения представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – 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 после проведенного лечения 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.

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. У этих двух больных выявлено поражение бедренно-подколенного сегмента артериального русла, а берцовые артерии были проходимы.

Таким образом, проведенный нами анализ результатов лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей показал неэффективность консервативной терапии без и в сочетании с непрямой реваскуляризацией (РОТ).

### Результаты экспериментального исследования.

**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 (Таблица 2).

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

Таблица 2 - 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
«Переменяющаяся 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

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.

**Результаты лечения экспериментальной критической ишемии конечности по данным морфометрического исследования.** Для определения нормальных показателей у интактных животных оценен уровень перфузии мышечных тканей конечности методом ЛДФ. 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 1).

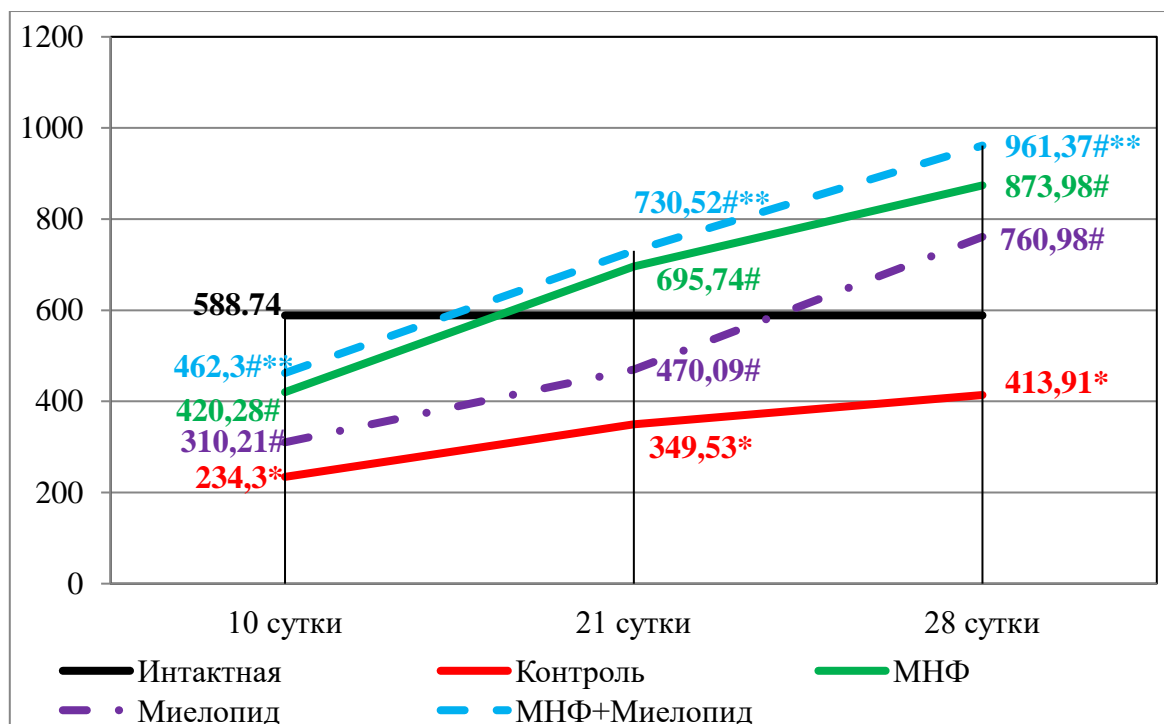


Рисунок 1 – Показатели перфузии мягких тканей в группах экспериментальных животных, п.е. Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной группами, \*\* – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

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%. 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.

Исследование патофизиологического феномена АВШ проводилось путем расчёта артериовенулярного индекса (Рисунок 2).

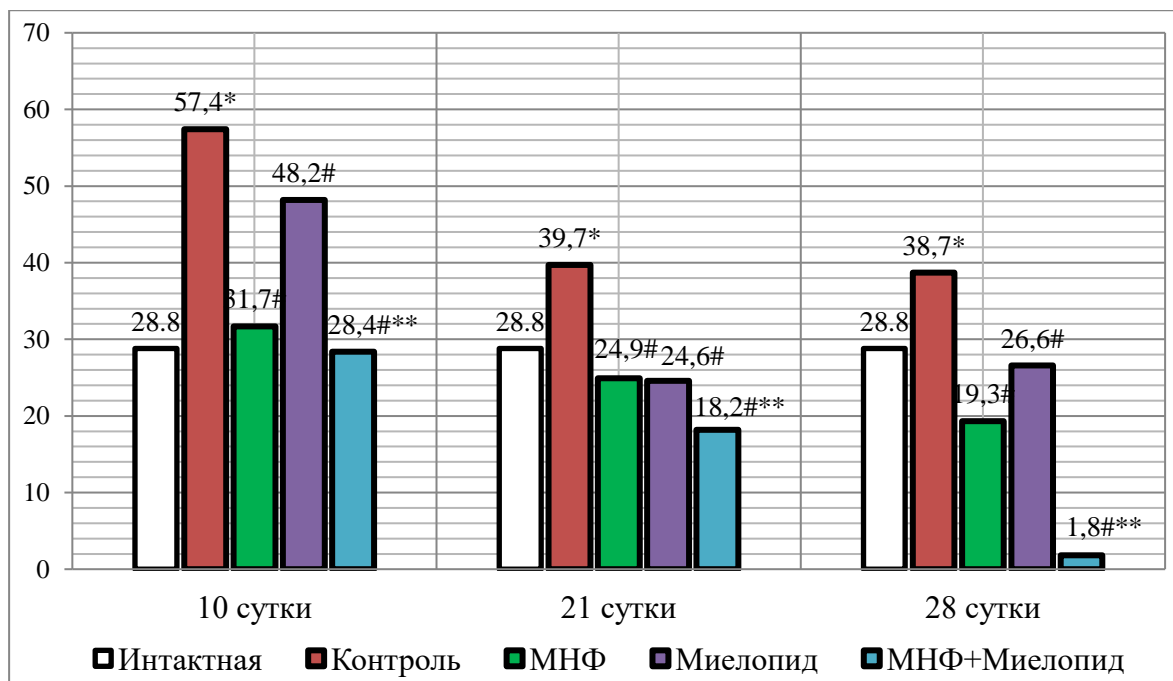


Рисунок 2 – Показатели индекса артериовенулярного шунтирования в группах экспериментальных животных, %. Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и контрольной 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 2-й группе опытных 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 плотности капиллярной сети путем подсчета количества капилляров в стандартном поле зрения микроскопа, установлено следующее. 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%. 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 3).

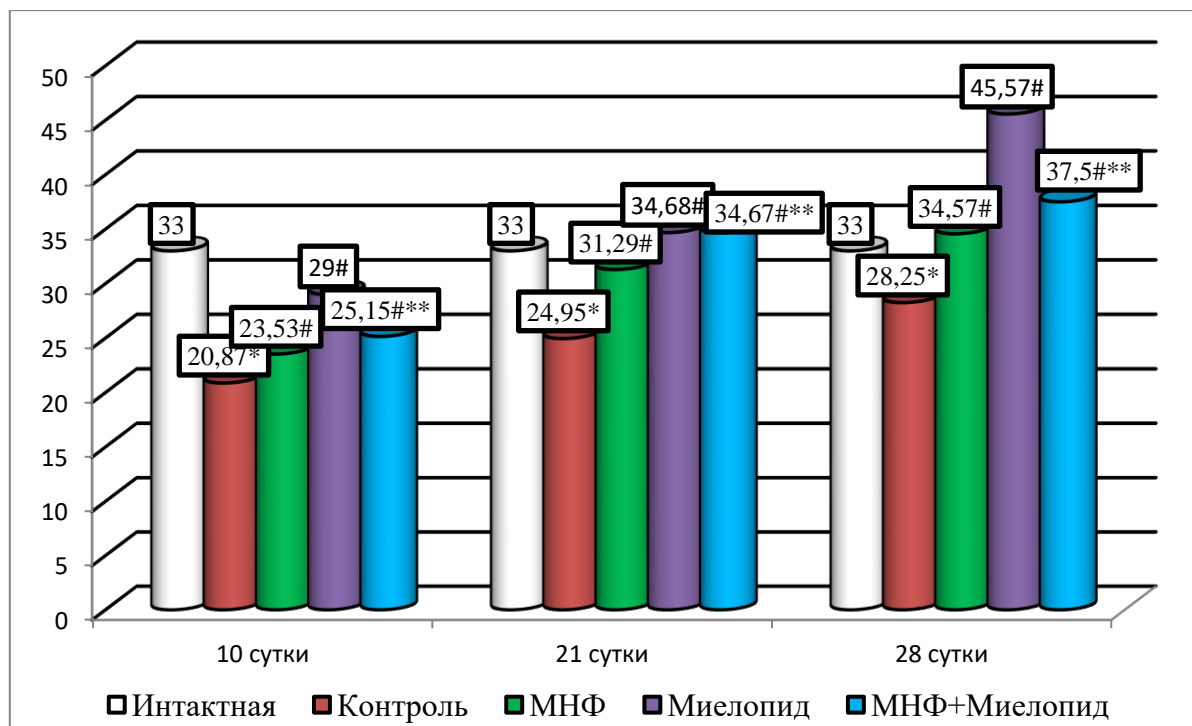


Рисунок 3 – Показатели плотности капиллярной сети в стандартном поле зрения микроскопа в группах экспериментальных животных. Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между контрольной и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между 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 показало, что 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 4).

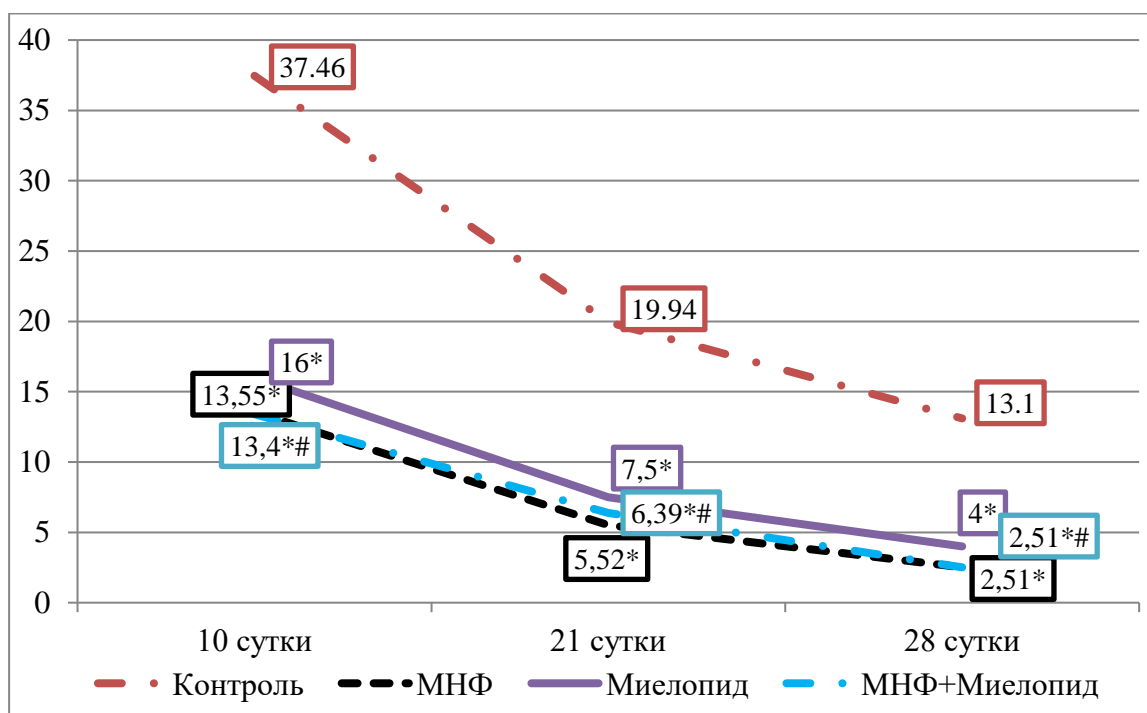


Рисунок 4 – Показатели удельной площади некроза мышечных волокон в группах экспериментальных животных, в %. Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений между опытными и интактной группами, # – наличие статистически значимых отличий средних значений между 3-й опытной (МНФ + «Миелопид») и 1-й (МНФ) и 2-й («Миелопид») опытными группами.

При анализе корреляционной связи между интегральными показателями микроциркуляции (перфузия мягких тканей, плотность капиллярной сети, уровень АВШ, площадь некроза мышечных волокон) на различных сроках эксперимента во всех опытных группах установлено следующее:

- отрицательная корреляционная связь выявлена между площадью некроза мышечных волокон и уровнем перфузии, между уровнем АВШ и перфузией, между площадью некроза и плотностью капилляров, между АВШ и плотностью капилляров;

- положительная корреляционная связь установлена между площадью некроза и уровнем артериовенулярного шунтирования, между плотностью капилляров и перфузией ткани.

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 выявлено. Наиболее сильная корреляционная связь, как прямая ( $r = 0,7 - 1$ ), так и обратная ( $r = (-0,7) - (-1)$ ), выявлена в группе животных, получавших лечение МНФ.

**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. 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 5 А).

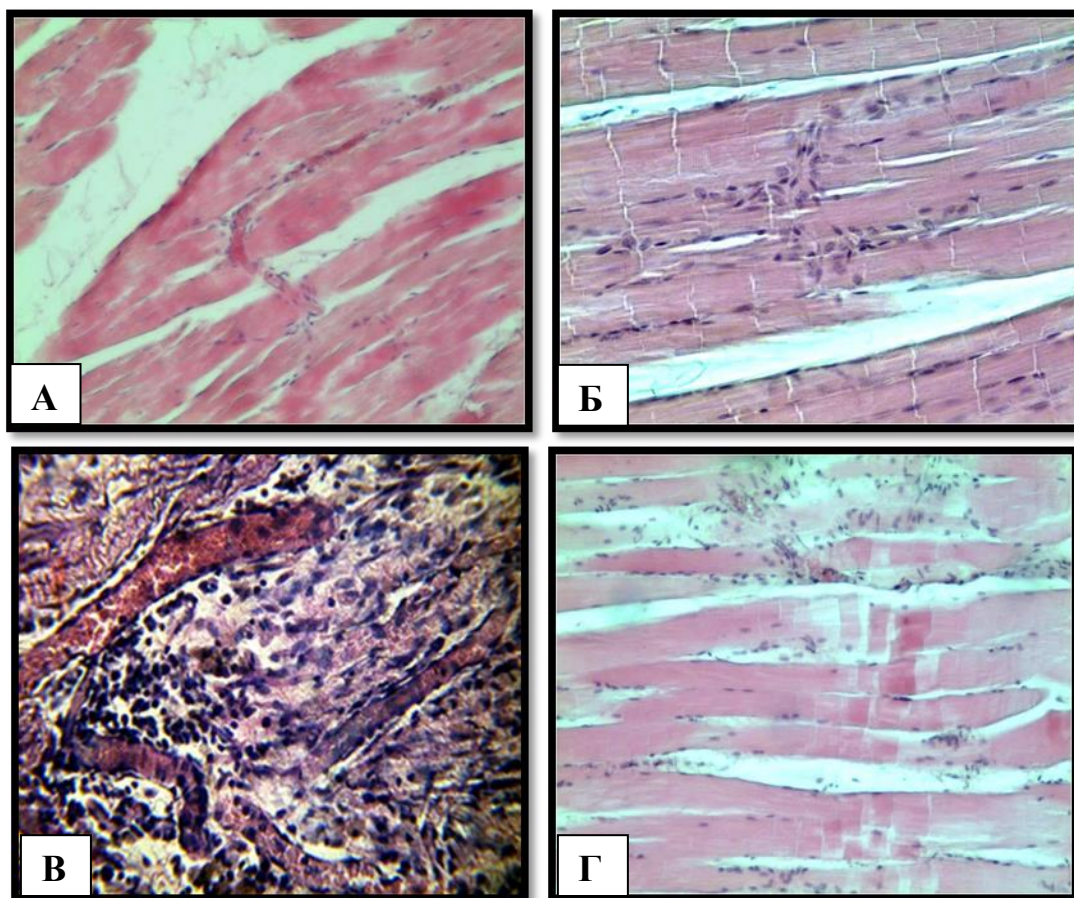


Рисунок 5 – Микрофотография участка мышечных волокон на 10-е сутки эксперимента в группах экспериментальных животных. Окраска гематоксилин и эозин. А – контрольная группа (отек интерстиция, полнокровие капилляров), увеличение×100; Б – 1-я опытная группа (МНФ) (единичный формирующийся капилляр), увеличение×400; В – 2-я опытная группа («Миелопид») (полнокровие сосудов микроциркуляторного русла), увеличение×400; Г – 3-я опытная группа (МНФ + «Миелопид») (новообразованный капилляр, скопление миобластов), увеличение×200.

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 миобластов. Имелись единичные новообразованные сосуды капиллярного типа (Рисунок 5 Б).

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 немногочисленным миоцитами (Рисунок 5 В).

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 миоциты (Рисунок 5 Г).

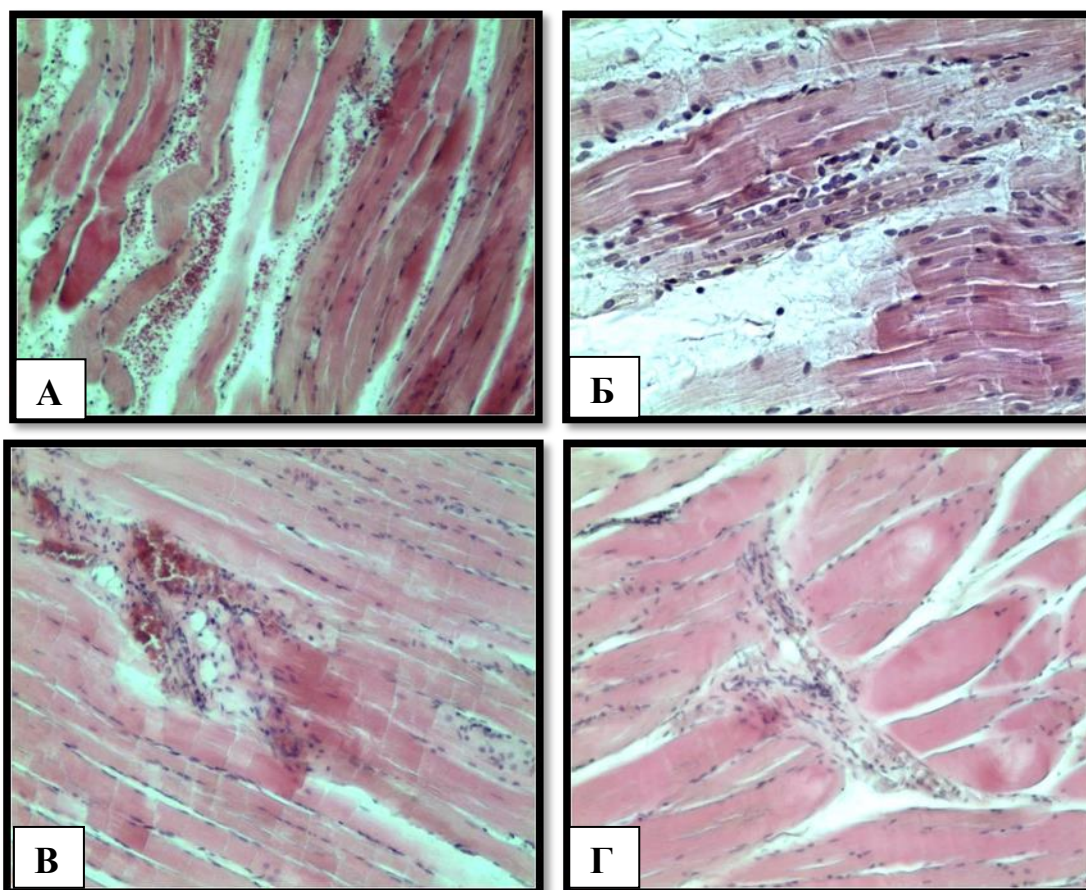


Рисунок 6 – Микрофотография участка мышечных волокон на 21-е сутки эксперимента в группах экспериментальных животных. Окраска гематоксилин и эозин. А – контрольная группа (некрозы мышечных волокон), увеличение×100; Б – 1-я опытная группа (МНФ) (линейно упорядоченные скопления миоцитаров), увеличение×400; В – 2-я опытная группа («Миелопид») (запустевание капилляров, скопления миоцитаров), увеличение×200; Г – 3-я опытная группа (МНФ + «Миелопид») (новообразованный сосуд микроциркуляторного русла), увеличение×400.

В контрольной группе животных на фоне моделирования критической ишемии конечности на 21-е сутки эксперимента наблюдали полиморфную картину некротических и дистрофических изменений (Рисунок 6 А).

На 21-е сутки эксперимента в 1-й опытной группе (МНФ) продолжалось замещение участков некроза грануляционной тканью, происходила регенерация

мышечных волокон. Воспалительная реакция стихала. Вне зон некроза и грануляционной ткани формировались новообразованные сосуды (Рисунок 6 Б).

На 21-е сутки во 2-й опытной группе («Миелопид») выявлялись небольшие очаги некрозов с разрастанием фиброзно-грануляционной ткани и формирование капиллярной сети. Появлялись обширные скопления миобластов. На отдельных участках сохранялись дистрофические и атрофические изменения мышечных волокон (Рисунок 6 В).

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 6 Г).

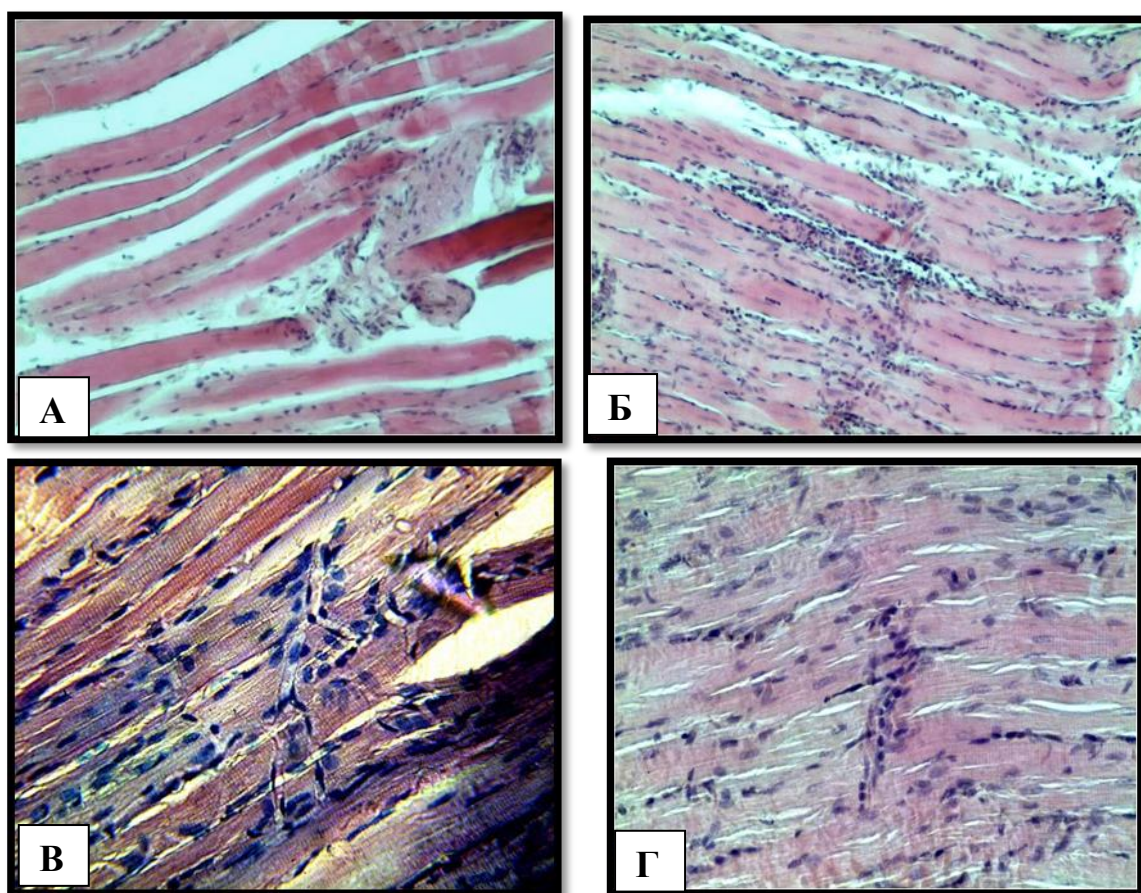


Рисунок 7 – Микрофотография участка мышечных волокон на 28-е сутки эксперимента в группах экспериментальных животных. Окраска гематоксилин и эозин. А – контрольная группа (миобласты, разрастание соединительной ткани), увеличение×200; Б – 1-я опытная группа (МНФ) (новообразованный сосуд, скопления миобластов), увеличение×200; В – 2-я опытная группа («Миелопид») (новообразованные капилляры в непораженных мышцах), увеличение×400; Г – 3-я опытная группа (МНФ + «Миелопид») (новообразованные капилляры), увеличение×400.

На 28-е сутки в контрольной группе зона некротизированной ткани постепенно замещалась грануляционной, наблюдали скопления миобластов (Рисунок 7 А).

В 1-й опытной группе после лечения МНФ на 28-е сутки определялись отдельные участки некроза мышечных волокон. Имелись новообразованные сосуды капиллярного типа и миобласты в большом количестве (Рисунок 7 Б).

К 28-м суткам во 2-й опытной группе («Миелопид») зона некроза замещалась рыхловолокнистой соединительной тканью. Воспалительная инфильтрация отсутствовала. В непораженных мышцах отмечалась пролиферация капилляров, не связанных с грануляционной тканью, завершался процесс регенерации мышечной ткани (Рисунок 7 В).

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 7 Г).

## 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 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) интрамукулярно 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) интрамукулярно 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 интрамукулярно в ишемизированную конечность через три часа после моделирования ишемии, а затем в последующие три 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.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы.**

В последнее время остается открытым вопрос о целесообразности использования терапевтического ангиогенеза в клинической практике у пациентов с критической ишемией конечностей. В отечественной и зарубежной литературе активно обсуждаются принципы и концепции генно-инженерных технологий стимуляции ангиогенеза. К сожалению высокая стоимость лечения препятствует широкому применению генно-инженерных стимуляторов в условиях отечественной медицины. В связи с чем, разработанный в данном исследовании экспериментальный метод лечения критической ишемии конечностей путем стимуляции неоваскулогенеза моноклеарными клетками аутологичного костного мозга в перспективе займет свое прочное место в комплексном лечении ангиохирургических пациентов.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

*в рецензируемых изданиях:*



1. Гордов, М.Ю. Эффективность моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в лечении экспериментальной критической ишемии конечности / М. Ю. Гордов, Б. С. Суковатых, Е. Б. Артющкова, А. Ю. Орлова // Новости хирургии. – 2015. – Т. 23, № 4. – С. 365–371.
2. Гордов, М.Ю. Результаты лечения экспериментальной критической ишемии конечности моноклеарной фракции аутологичного костного мозга / М. Ю. Гордов, Б. С. Суковатых, А. Ю. Орлова // Вестн. нац. медико-хирург. центра им. Н. И. Пирогова. – 2016. – Т. 11, № 2. – С. 65–68.
3. Гордов, М.Ю. Фармакологическая коррекция нарушений микроциркуляции и ишемических повреждений мышечных тканей при экспериментальной критической ишемии конечностей / М. Ю. Гордов, Б. С. Суковатых, Е. Б. Артющкова, А. Ю. Орлова // Вестн. эксперим. и клин. хирургии. – 2016. – Т. 9, № 3. – С. 222–230.
4. Гордов, М.Ю. Влияние актовегина и солкосерила на микроциркуляцию при критической ишемии конечности в эксперименте / М. Ю. Гордов, Б. С. Суковатых, Е. Б. Артющкова, А. Ю. Орлова // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2017. – Т. 23, № 1. – С. 29–35.
5. Гордов, М.Ю. Фармакологическое лечение экспериментальной критической ишемии конечностей / М. Ю. Гордов, Б. С. Суковатых, Е. Б. Артющкова, А. Ю. Орлова, Е. В. Артющкова, О. В. Полякова // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2017. – № 1.

***в других изданиях:***

6. Гордов, М.Ю. Эффективность плазмы, обогащенной тромбоцитами, и препарата «Миелопид» при острой экспериментальной ишемии конечности / М. Ю. Гордов, А. Ю. Орлова, Ю. С. Бондарь [и др.] // Материалы VIII Междунар. науч. конф. молодых ученых-медиков (2014 г.). – Воронеж, 2014. – Т. 3. – С. 120–121.
7. Гордов, М.Ю. Эффективность моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в лечении экспериментальной ишемии конечности / М. Ю. Гордов, А. Ю. Орлова, Т. Н. Барабанщикова [и др.] // Материалы IX Междунар. научно-практ. конф. молодых ученых-медиков (14-15 апреля 2015 г.). – Казань, 2015. – С. 218–221.
8. Гордов, М.Ю. Лечение острой экспериментальной ишемии конечности / М. Ю. Гордов, А. Ю. Орлова // Молодежная наука и современность: материалы 80-й Всерос. науч. конф. студентов и молодых ученых с междунар. участием, посвящ. 80-летию КГМУ. – Курск, 2015. – Т. 1. – С. 186.

### **Патенты на изобретения:**

1. Способ лечения хронической ишемии конечности в эксперименте: пат. 2556606 Рос. Федерация: МПК G09B23/28, A61K35/14, A61P9/10 / М. Ю. Гордов, А. Ю. Орлова, Б. С. Суковатых, Е.Б. Артющкова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации. – № 2014113802/14; заявл. 08.04.2014; опубли. 10.07.15, Бюл. № 19. – 8 с.

2. Способ фармакологической стимуляции неоангиогенеза в лечении острой экспериментальной ишемии конечности: пат. 2559937 Рос. Федерация: МПК G09B23/28, A61K35/14, A61P9/10 / М. Ю. Гордов, А. Ю. Орлова, Б. С. Суковатых, Е.Б. Артющкова, С.А. Абрамова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации. – № 2014133331/14; заявл. 12.04.2014; опубли. 20.08.15, Бюл. № 23. – 6 с.

### **Список сокращений**

АВШ – артериовенулярное шунтирование

ГНЦ – гематологический научный центр

ЗББА – задняя большеберцовая артерия

ИАВШ – индекс артериовенулярное шунтирование

КИНК – критическая ишемия нижних конечностей

ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия

ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

МНФ – моноклеарная фракция аутологичного костного мозга

ОБУЗ КГКБ СМП – Областное бюджетное учреждение «Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи»

ПСЭК – поясничная симпатэктомия

ПКА – подколенная артерия

РОТ – реваскуляризирующая остеотрепанация

РИ – реовазографический индекс

ФГБОУ ВО КГМУ – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет»

ФИ – фотоплетизмографический индекс

ХНЗЛ – хронические неспецифические заболевания легких

ХОЗАНК – хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей

Лицензия ЛР № 020862 от 30.04.99 г.

Сдано в набор .07.2017г. Подписано в печать .07.2017 г.

Формат 30x42<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Rom.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,0.

Тираж 90 экз. Заказ № .

Издательство Курского государственного медицинского университета  
305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3.