

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ «КАЗАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ПЛОТНИКОВ МИХАИЛ ВИКТОРОВИЧ

ПРИМЕНЕНИЕ ФРАКЦИИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ, ОБОГАЩЕННОЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИМИ СТВОЛОВЫМИ
КЛЕТКАМИ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Максимов А.В.

Казань – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Эпидемиология и актуальные проблемы заболеваний периферических артерий.....	13
1.2. Основные механизмы патогенеза заболеваний периферических артерий.....	15
1.3. Хирургические методы лечения облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей.....	17
1.4. Возможности терапевтического ангиогенеза в лечении ишемии нижних конечностей.	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.1. Характеристика пациентов, критерии включения и исключения...	31
2.2. Методы обследования.....	34
2.2.1. Лодыжечно-плечевой индекс.....	34
2.2.2. Тредмил тест.....	35
2.2.3. Ангиография.....	36
2.2.4. Изменения клинического статуса.....	40
2.3. Методика стимуляции ангиогенеза с применением фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками.....	40
2.4. Методика морфологического исследования скелетной мышцы...	43
2.5. Алгоритм исследования у пациентов, после аутологичной трансплантации мононуклеаров периферической крови.....	45
2.6. Методы статистической обработки результатов.....	46

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	47
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ АРТЕРИЙ В ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ СО СТАНДАРТНОЙ ТЕРАПИЕЙ.....	47
ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МОНОНУЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЕМ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ АРТЕРИЙ.....	55
4.1. Непосредственные результаты аутологичной трансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемо- поэтическими стволовыми клетками, у пациентов с ЗПА.....	55
4.2. Отдаленные результаты аутологичной трансплантации мононук- леаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими ство- ловыми клетками, у пациентов с ЗПА.....	62
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	81
ВЫВОДЫ.....	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АББШ – аорто-бедренное бифуркационное шунтирование
- АД – артериальное давление
- АСЕ - ангиотензин-превращающий фермент
- БПШ - бедренно-подколенное шунтирование
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
- ДБХ – дистанция безболевого ходьбы
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЗПА – заболевания периферических артерий
- К/М – соотношение капилляров к мышечному волокну
- КИНК – критическая ишемия нижних конечностей
- КМ – костный мозг
- ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс
- ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
- ММП - матриксные металлопротеиназы
- МПК - мононуклеары периферической крови
- ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
- ПСЭ - поясничная симпатэктомия
- ПХ – перемежающаяся хромота
- реБПШ - повторное бедренно-подколенное шунтирование
- РОТ - реваскуляризирующая остеоперфорация
- САД – систолическое артериальное давление
- ЭКГ - электрокардиограмма
- ЭПК - эндотелиальные прогениторные клетки
- ЭХО-КС – эхокардиоскопия
- CD - мембранный белок, молекула межклеточной адгезии
- FGF - фактор роста фибробластов

G-CSF - рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор

HB-EGF - гепарин-связывающий фактор роста эпидермиса

HB-EGF- инсулин-подобный фактор роста

HGF - печёночный фактор роста

HIF- фактора ишемии

PD-ECGF - фактор роста клеток эндотелия тромбоцитарного происхождения

PDGF - фактор роста тромбоцитарного происхождения

TGF - трансформирующий фактор роста

VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста

vWF – фактор Виллебранда

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Заболевания периферических артерий (ЗПА) являются одной из наиболее частых причин снижения качества жизни, инвалидизации и занимают большую долю в структуре смертности (Савельев В.С., 2010; Fowkes G.R., Rudan D., Rudan I. et al., 2013; Mueller T., Hinterreiter F. et al., 2014, Camargo-Arias E., Aponte-Rodriguez J. et al., 2015). Основными принципами их лечения считаются модификация факторов риска, выполнение шунтирующих и ренгенэндоваскулярных вмешательств, а также консервативная терапия (Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A. et al., 2007; Gil de Lamadrid José Hernández, Delgado Osorio H, 2015; Marques L, Hopf-Jensen S, Müller-Hülsbeck S., 2016).

Прямая реваскуляризация конечности считается наиболее адекватным методом восстановления кровообращения в конечности, однако, отсутствие адекватного кондуита и/или дистального принимающего русла является причиной неудовлетворительных отдаленных результатов лечения (Казанчан П.О., Попов В.А., Дебелый Ю.В. и др., 2001; Reinecke H., Unrath M. et al., 2015; Brothers T.E., 2015). Это определяет сохраняющийся интерес к непрямым методам реваскуляризации, таким как десимпатизация, реваскуляризирующая остоперфорация, артериализация венозной системы и т.д. (Староверов И.Н., Лончакова О.М., 2014; Cherviakov Iu.V., Staroverov I.N. et al., 2015; Blessing E., 2015). Отсутствие доказательной базы ограничивает их широкое применение для лечения ЗПА и не рекомендует как альтернативу прямой реваскуляризации (Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей, 2013; Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A. et al., 2007).

На протяжении последних трех десятилетий сформировалась новая концепция лечения ишемии - терапевтический ангиогенез (Suzuki J.I., Shimamura M. et al., 2015). Он представляет собой новую тактику улучшения

перфузии ишемизированных тканей с помощью усиления естественных процессов неоваскуляризации.

Толчком к интенсивному исследованию механизмов ангиогенеза стала гипотеза Judah Folkman, выдвинутая им в 1971 году, о том, что прогрессирующее развитие злокачественных опухолей зависит от их васкуляризации (Folkman J., 1971). Экспериментальные работы нашли обоснование предложенной теории, что привело к появлению нового термина - «терапевтический ангиогенез» (Takeshita S., Zheng L.P. et al., 1994). Первыми применением теории в клинической практике стали сообщения о лечении ишемии конечности J. Isner (1999) в 1994 году с применением гена VEGF-165 в плазмидном векторе и E. Tateishi Yuuyama в 2002 году клеточной терапии (Tateishi Yuuyama E., 2002).

Последующие экспериментальные и клинические работы привели к формированию двух направлений терапевтического ангиогенеза: первое – изучение факторов роста и стимуляция их выработки на уровне генома клетки при помощи плазмидных конструкций, вторая – применение проангиогенных свойств прогениторных клеток.

В настоящее время существует большое количество работ по применению различных проангиогенных факторов роста (Деев Р.В., Григорян А.С., Потапов И.В., 2011; Ko S.H., Bandyk D.F., 2014; Suzuki J.I., Shimamura M. et al., 2015). Однако сложности получения носителей гена и неполное представление о потенциальных патогенетических эффектах данных аллогенных субстанций ограничивает их широкое применение.

В данном контексте выгоднее представляется использование аутологичных, т.е. собственных, прогениторных клеток пациента. В настоящее время имеется ограниченное количество зарубежных клинических публикаций по трансплантации аутологичных прогениторных клеток больным с ЗПА, большинство из них носит характер пилотных (Шевченко Ю.Л., 2006; Шойхет Я.Н., Хорев Н.Г., 2011; Raval Z., Losordo D.W., 2013; Furnston J., Patel A.S., Ludwinski F., Zuzel V. et al., 2014; Peeters Weem S.M., Teraa M. et al.,

2015). Оценка терапевтического эффекта в них проводилась исключительно на основе данных инструментальных и физикальных методов обследования. Изучение гистологического материала после введения аутологичных прогениторных клеток носили единичный или случайный характер. Отечественных работ по клеточной терапии ЗПА, кроме сообщения Е.А. Корымасова и др. (2009) и К.А. Талицкого и др. (2011) мы не нашли.

Таким образом, до сих пор ни в одном исследовании не были отражены аспекты патоморфологического механизма клинического улучшения, наблюдаемого у пациентов с ЗПА после введения аутологичных прогениторных клеток.

Цель исследования: улучшение результатов лечения пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени путем стимуляции ангиогенеза посредством аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками.

В соответствии с данной целью сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработать методику лечения хронической артериальной недостаточности нижних конечностей путем стимуляции ангиогенеза посредством аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в пораженную конечность и оценить её безопасность.
2. Изучить качественную и количественную характеристику ауто-трансплантата, полученного при применении предложенной методики.
3. Изучить отдаленные результаты аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени в сравнении с группой пациентов со стандартной терапией.

4. Доказать влияние аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, на стимуляцию ангиогенеза в мышцах пораженной конечности.

Научная новизна. Проведено комплексное морфологическое и функциональное изучение результатов аутологичной трансплантации мононуклеаров периферической крови, содержащих фракцию гемопоэтических стволовых клеток, у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени.

Проведено сравнение отдаленных результатов течения заболевания периферических артерий в группах пациентов со стандартной терапией и после аутотрансплантации мононуклеаров периферической крови.

Впервые выполнено изучение морфологических изменений, происходящих в скелетной мышце нижней конечности в ответ на аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток периферической крови после цитокиновой мобилизации.

Впервые выявлена корреляция между плотностью вновь образованной капиллярной сети и клеточным составом аутотрансплантата.

Впервые установлено минимальное целевое значение количества гемопоэтических стволовых клеток, содержащихся во фракции мононуклеаров при аутотрансплантации, для получения клинически значимых результатов у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени.

Практическая значимость. Разработана методика стимуляции ангиогенеза в ишемизированных мышцах нижних конечностей посредством аутологичной трансплантации фракции мононуклеаров периферической крови в мышцы нижних конечностей, после их цитокиновой мобилизации, а также установлена её безопасность.

Доказано улучшение функциональных параметров кровоснабжения конечности после аутологичной трансплантации фракции мононуклеаров пе-

риферической крови в мышцы нижних конечностей у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени.

Доказано наличие процесса ангиогенеза в мышцах нижних конечностей у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей IIБ степени в ответ на трансплантацию аутологичных мононуклеаров периферической крови, содержащих гемопоэтические стволовые клетки.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методика аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками после их цитокиновой мобилизации, в мышцы пораженной конечности у пациентов с хронической артериальной недостаточностью IIБ степени является эффективной и безопасной.

2. Предложенный метод получения аутотрансплатата позволяет получить клеточный материал, объем которого и содержание в нем гемопоэтических стволовых клеток является достаточным для стимуляции ангиогенеза в мышцах конечностей у пациентов с хронической артериальной недостаточностью IIБ степени. Кроме того, применяемая методика позволяет выполнить не только аутотрансплантацию, но и криоконсервирование клеточного материала в банке стволовых клеток.

3. Методика аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов со IIБ степенью хронической артериальной недостаточности нижних конечностей приводит к стойкому и длительному улучшению функциональных параметров кровоснабжения конечности. Течение заболевания на фоне стандартной терапии у пациентов со IIБ степенью хронической артериальной недостаточности нижних конечностей характеризуется прогрессивным снижением резервов коллатерального кровообращения и нуждается в применении дополнительных методов лечения.

4. Аутотрансплантация фракции моноклеров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов со IIБ степенью хронической артериальной недостаточности нижних конечностей стимулирует процесс ангиогенеза, причем эффективность стимуляции носит дозу зависимый, от количества гемопоэтических стволовых клеток в аутотрансплантате, эффект.

Личное участие соискателя заключается в постановке целей и задач исследования, определении методов исследования и лечения. Автором лично проведен обзор, анализ и обобщение данных отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Весь объем клинических наблюдений и операций выполнен непосредственно автором. Автор самостоятельно провел изучение отдаленных результатов исследования на основе очных осмотров, инструментальных исследований и почтового анкетирования на сроках до 5 лет.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в практику отделения сосудистой хирургии №1 ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» МЗ РТ, отделения сосудистой хирургии ГАУЗ «Городская клиническая больница №7» МЗ РТ, а также используются при проведении практических занятий и лекций на кафедре кардиологии, рентгеноваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на: 21 (XXI) Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов (Самара, 2009), Межрегиональной междисциплинарной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ангиологии и сосудистой хирургии» (Казань, 2010), 60-ом международном конгрессе Европейского Общества сердечно-сосудистых хирургов (ESCVS) (Москва, 2011), Республиканской научно-практической конференции «День сердечно-сосудистого хирурга» (Альметьевск, 2012), 2-й Всерос-

сийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в хирургии» (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, в том числе 4 работы опубликовано в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК Министерства образования и науки РФ, 1 в виде коллективной монографии.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, четырех глав, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержит 30 рисунков и 20 таблиц. Список литературы представлен 201 источником.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология и актуальные проблемы заболеваний периферических артерий

Общая распространенность заболеваний периферических артерий (ЗПА) в популяции по данным различных исследований варьирует в пределах 3-10%, возрастая до 15-20% в возрастной группе старше 70 лет [93, 167, 195]. За период с 2000 по 2010 год отмечается рост числа больных с ЗПА более чем 23% [87]. Частота ЗПА, протекающих асимптомно, в 3-4 раза больше симптомных форм заболевания [97, 118, 197]. При этом у трети асимптомных пациентов имеется окклюзия магистральных артерий нижних конечностей [100, 194].

Перебегающая хромота (ПХ) - основной клинический синдром поражения артерий нижних конечностей. Распространенность перебегающей хромоты у лиц моложе 50 лет составляет 1-5% и значительно увеличивается с возрастом, достигая 10-14% среди людей 50-70 лет [141, 172]. Частота возникновения симптомов ПХ у первично здоровых субъектов в возрасте 40-60 лет составляет 5-8,6 случаев на 1000 человек в год [90, 119]. Прогноз сохранения конечности при ПХ является в целом благоприятным. Однако, примерно в четверти случаев наблюдается либо сохранение симптомов ЗПА, либо их прогрессирование. Установлено, что прогрессирование симптомов ПХ происходит у 7-8% в течение первого года после установления диагноза ЗПА, с последующим ухудшением симптоматики каждый год ещё на 2-3%. Среди больных с ПХ спустя пять лет наблюдения у 28,8% сохранялась боль в ноге, у 8,2% выполнялись ампутация или реваскуляризация конечности, у 1,4% развились ишемические язвы [152].

В ходе проспективного 3-х летнего исследования, проведенного А.Л. Комаровым, Е.Л. Панченко, А.Д. Деевым и др. (2000), было отмечено стабильное течение перемежающейся хромоты у 87% больных, хирургическое лечение потребовалось 11,6%, ампутация конечности выполнена в 2,4% случаев [37].

Существуют и более пессимистичные данные. Так, в 15-ти летнем наблюдении за 1244 пациентами с ПХ было установлено прогрессивное снижение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) на 0,014 за год и уменьшение дистанции безболевого ходьбы на 9,2 ярда (8,41 метра) в год [146]. Установлен кумулятивный 10-летний риск развития ишемических язв и ишемических болей покоя у 23% и 30% пациентов соответственно. Кроме того, установлено, что сопутствующий ЗПА сахарный диабет в 3-5 раз повышает риск прогрессирования ПХ с возникновением критической ишемии нижних конечностей и риска ампутации [23, 75, 188].

По результатам национального исследования, проведенного Ангиологическим Советом Великобритании (1996-2006), в течение пяти лет 5% больных с перемежающейся хромотой переходят в стадию критической ишемии нижних конечностей (КИНК), что составляет от 300 до 400 человек на 1 млн. населения в год [184]. Термин «критическая ишемия» нижних конечностей впервые был введен P.R.F. Bell в 1982 году [180]. КИНК - это боль в конечности в покое и/или наличие трофических расстройств, обусловленные существенным снижением локального кровотока с угрозой ее потери в случае неадекватного или неэффективного лечения в течение 6 месяцев [25]. При этом, лишь половине пациентов с диагнозом КИНК возможна реваскуляризация конечности, четверть пациентов получают консервативное лечение, остальным выполняется первичная ампутация нижней конечности на уровне бедра или голени [114, 120]. Эффективность консервативной терапии также невелика: только в 40% случаев конечность может быть сохранена в течение первых 6 месяцев, 20% больных ожидает летальный исход, остальным выполняется большая ампутация [46]. К концу первого года после установления ди-

агноза КИНК у 45% больных удается сохранить конечность, выживаемость после ампутации бедра или голени составляет чуть более 30%, а 25% больных ожидает летальный исход [120, 132, 144].

Ежегодное число ампутаций конечности варьирует от 13,7 до 32,3 на каждые 100 тыс. населения экономически развитых стран [11, 46, 67]. Данный аспект определяется демографической структурой населения, распространенностью ЗПА и КИНК. Существуют данные о снижении числа ампутаций за счет улучшения качества и количества реваскуляризирующих вмешательств [53, 178, 200]. Однако количество больших ампутаций по-прежнему остается высоким. Летальность в течение 30 дней после больших ампутаций составляет от 4 до 30%, а риск развития осложнений, таких как инфаркт, инсульт или инфекция - от 20 до 37% [189]. В течение первых 2 лет у больных с КИНК летальность после большой ампутации в два раза выше, чем у больных с сохраненной конечностью, а порог смертности в 50% достигается уже через два года [191]. Реабилитация после ампутаций путем протезирования конечности у многих пожилых больных затруднена, что оказывает отрицательное влияние на отдаленные результаты и качество их жизни [79].

1.2. Основные механизмы патогенеза заболеваний периферических артерий

Среди нозологических форм ЗПА ведущую роль имеет атеросклероз, на долю которого приходится от 80-90% в структуре заболеваемости [93]. К прочим причинам ЗПА, не более 10-20%, можно отнести облитерирующий тромбангиит, неспецифический аорто-артериит и диабетическую ангиопатию [34, 93].

В зависимости от этиологии ЗПА могут отличаться морфологические изменения сосудов. Так, в отличие от атеросклероза, при эндартериите процесс начинается в дистальных отделах сосудов, затем распространяется на более крупные. При этом деструктивные изменения в системе мелких сосу-

дов значительно опережают патологические изменения магистральных сосудов [6, 162]. Однако, независимо от этиологии, патогенез развития заболевания приблизительно одинаков.

Постепенная редукция артериального русла приводит к возникновению и прогрессированию признаков артериальной недостаточности. Происходит декомпенсация периферического кровообращения, обусловленная несоответствием между существующим притоком артериальной крови и необходимым для нормального функционирования органа уровнем перфузии [10, 138]. Низкий уровень перфузионного давления вследствие нарушения макродинамики провоцирует запуск патологических процессов на уровне микроциркуляторного русла [34, 88]. Несостоятельность капиллярного кровообращения является одним из ведущих факторов в развитии грубых трофических нарушений у пациентов. При хронической ишемии нижних конечностей страдает микроциркуляция не только мышц, но и кожных покровов, что свидетельствует о тотальном нарушении функции капилляров [6]. Происходит развитие тканевой гипоксии: при второй стадии ишемии напряжение кислорода в среднем составляет 47,7 мм рт.ст., при третьей - 23,3 мм рт.ст., при четвертой - 14,8 мм рт.ст. [82].

При изучении морфологических изменений ЗПА различной этиологии были выявлены изменения всех трех компонентов микроциркуляторного русла, более выраженные в дистальных отделах конечности. Отмечена извилистость, неровность и деформация артериол, сужение их диаметра и утолщение стенки (булавовидная деформация капилляров). Посткапиллярная сеть и венулы дилатированы и их масса преобладает над артериальным компонентом микроциркуляторного звена [34]. При развитии КИНК отмечается большое количество функционирующих артерио-венозных анастомозов, являющихся шунтовыми приспособлениями.

При дальнейшем снижении давления в постокклюзионных сегментах магистральных артериях происходит полная редукция просвета артериол и капилляров. В результате этого значительно утолщается базальный слой ка-

пилляра, усиливается перикапиллярный склероз, часть капилляров фрагментируется и некротизируется. Нарушения капиллярного кровотока приводит к структурным изменениям мышечных волокон, которые сводятся к их гомогенизации, набуханию и отёку [34]. Возникающие при этом компенсаторно-приспособительные реакции сводятся к активации анаэробного гликолиза, изменению плотности капилляров и ядер миоцитов [9, 139]. Развитие выраженной ишемии приводит к нарушению регуляторной функции эндотелия. Как следствие, происходит повышение вязкости крови, снижение эластичности эритроцитов и лейкоцитов и усиление агрегации элементов крови. В результате развивается ацидоз, локальная гиперосмолярность и гиперфибриногенемия, накопление в эндотелии кальция [18, 160]. Нарушение функционального состояния эндотелия, активация лейкоцитарного и тромбоцитарного звена у больных КИНК является также фактором стимулирующим изменению сосудистой стенки, что определяет их участие в процессах атерогенеза [34, 130].

Однако, несмотря на всестороннее изучение патогенеза ЗПА прогноз естественного течения по-прежнему определяется как неблагоприятный. Это обуславливает необходимость применения хирургических методов реваскуляризации [195].

1.3. Хирургические методы лечения облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей

Ограничение качества жизни или развитие КИНК является основным показанием к хирургическому лечению [34, 114]. Несмотря на большое количество работ, посвященных эпидемиологии ЗПА, потребность в специализированной ангиохирургической помощи четко не определена. Считается, что она составляет около 1000 операций на 1 млн. населения в год [31]. С начала «нулевых годов» XI века отмечается ежегодное увеличение количества выполняемых артериальных реконструкций. Так, в отчете А.В.Покровского

«Состояние сосудистой хирургии в России в 2014 году», количество операций в специализированных ангиохирургических отделениях за последние пять лет выросло почти на 15 тысяч и составило 119119. Однако, количество выполненных в России операций на артериях, по прежнему не только не покрывает потенциальную потребность, но и не соответствует уровню хирургической активности развитых стран. По данным за 2007 год в США было выполнено 162 реконструкции артерий нижних конечностей на 100 тыс. населения [53]. В России в 2014 году количество всех (!) артериальных реконструктивных операций составила всего лишь 40 на 100тыс. населения [31].

Рентгенэндоваскулярный метод лечения патологии аорто-бедренного сегмента в настоящее время является приоритетным. Первичный технический и клинический успех достигает 90%, а в случае локальных поражений - 100% [181]. Открытые шунтирующие или протезирующие операции рекомендуется при диффузном и распространенном поражении аорто-подвздошно-бедренного сегмента. 10-летняя проходимость аорто-бедренных шунтов составляет 80-90% [22, 166].

Результаты хирургического лечения инфраингвинальных поражений менее оптимистичны. Применение реверсированной аутовены, или по методике «in situ», для инфраингвинальных реконструкций считается предпочтительным и имеет наилучшие показатели проходимости на отдаленных сроках [140, 164, 165, 193]. При отсутствии аутовены применяются синтетические протезы из дакрона и политетрафторэтилена. Однако, они демонстрируют менее удовлетворительные результаты [140, 164]. Мета-анализ результатов применения различных кондуитов демонстрирует следующие показатели проходимости: для аутовенозных шунтов - от 60 до 80% на сроке 5 лет, для аллошунтов – от 30 до 50% за 5 лет при бедренно-подколенных реконструкциях и не более 25% за 3 года при шунтировании в берцовые артерии [25, 76, 140, 164].

Большое значение при реваскуляризации подколенно-берцового сегмента имеет состояние дистального принимающего русла. «Неудовлетвори-

тельное» значение балла оттока по шкале Rutherford достоверно отрицательно влияет на прогноз проходимости шунтов [28]. Кроме того, тромбоз шунта нередко приводит к развитию более тяжелой степени ишемии, чем до вмешательства, и резко снижает возможность повторного вмешательства [35, 153].

Показаниями к эндоваскулярному лечению инфраингвинальных поражений в настоящее время являются стенозы или окклюзии протяженностью до 10 см. Клинический успех превышает 95%, однако развитие рестеноза на месте имплантации стента является основной причиной ограничения их применения [103, 192].

Таким образом, анализ состояния периферического русла и данные о проходимости шунтов определяют возможность выполнения и выбор способа реваскуляризации конечности. Если при КИНК приоритетным способом лечения является прямая реваскуляризация и предлагается использовать все возможные кондуиты независимо от состояния принимающего русла, то при лечении ЗПА в стадии перемежающейся хромоты целесообразность реконструкции бедренно-подколенного сегмента дискуссионна [150].

Все перечисленные аспекты определяют сохраняющийся интерес к непрямым методам реваскуляризации – десимпатизация, артериализация венозной системы, имплантация фрагмента большого сальника на голень, реваскуляризирующая остоперфорация [36].

Поясничная симпатэктомия (ПСЭ) уменьшает функциональную недостаточность путей перетока при диффузном или многоэтажном характере поражения артериального русла [34]. Получены непосредственные хорошие результаты ПСЭ у 88,3 % пациентов при II стадии заболевания, хорошие и удовлетворительные результаты у 72,9% пациентов с КИНК [16]. Однако в целом результаты лечения по-прежнему оцениваются как противоречивые [34, 84].

Основными механизмами купирования КИНК при артериализации венозного кровотока стопы считается блокировка артериоловеноулярного шунтирования крови, увеличение притока крови по капиллярам, улучшение ок-

сигенации тканей и стимуляция развития коллатералей [2]. По данным некоторых авторов, артериализация позволила сохранить конечность через 5 лет у 79,4 и 93,3% пациентов, при использовании поверхностной и глубокой венозной систем соответственно [7, 12, 19, 36].

Реваскуляризирующая остеоперфорация (РОТ) и пересадка фрагмента большого сальника на голень, лечение экстравазатами крови по Бытка П.Ф. – не получили большой распространенности в ангиохирургии. Обусловлено это, прежде всего, недостаточной изученностью механизмов их положительного влияния [30]. Однако анализ морфологических изменений, происходящих после данных вмешательств, спроецированных на современные исследования ангиогенеза, возможно смогут обосновать их клиническую эффективность. Тем не менее, эти методы не рекомендованы согласительными документами для лечения ЗПА как не имеющие доказательной базы [25, 120]. Впрочем, количество таких операций, выполняемое в России, все ещё остается высоким [31].

Использование аутокрови и её компонентов для стимуляции коллатерального кровообращения были предприняты ещё в 70-х годах прошлого века. Попытки внедрения и возрождения методики экстравазации аутокрови выполнялись не раз [4, 21]. Незнание механизма положительного влияния при ЗПА, нередкие осложнения и сопоставимость результатов с прочими методами не прямой реваскуляриции привели к отказу практикующих врачей от широкого применения метода П.Ф. Бытка. Лишь взгляд на периферическую кровь как на комплекс компонентов из клеток и белков, стимулирующих и непосредственно участвующих в регенеративных процессах, подвинул на дальнейшее изучение её свойств. Эта концепция подтверждается сравнительным исследованием эффекта введения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами и аутокрови (по методу П.Ф. Бытка) в мышцы пораженной конечности [13].

1.4. Возможности терапевтического ангиогенеза в лечении ишемии нижних конечностей.

Наличие пациентов, кому выполнение реконструктивной операции невозможно и неудовлетворительные результаты применения методов непрямой реваскуляризации подтолкнули к поискам альтернативных способов лечения ЗПА. Одним из таких путей является стимуляция ангиогенеза на основе генно-инженерных и клеточных технологий [24, 40, 127, 129].

Еще в 1995 году Judah Folkman выявил зависимость развития опухоли от её неоваскуляризации, которую регулируют факторы роста сосудов [106]. Идентификация этих факторов роста явилась основой для понимания механизма и изучения возможности индуцирования ангиогенеза.

Во всех патологических и физиологических процессах основным индуктором ангиогенеза выступает гипоксия тканей, которая стимулирует секрецию HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) [47, 108, 168]. В свою очередь, HIF-1 запускает целый каскад на молекулярном и клеточном уровне. Одну из главных ролей отводят, так называемым, ангиогенным цитокинам, среди которых, ключевым в настоящее время считается фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и его рецепторы [48, 182]. В настоящее время открыто целое семейство VEGF, включающее в себя VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и плацентарный фактор роста (PlGF) [143]. Из них VEGF-A, главным образом, участвует в ангиогенезе.

Другими проангиогенными факторами являются факторы роста фибробластов (кислый - aFGF и щелочной - bFGF), печёночный фактор роста (HGF), инсулин-подобный фактор роста (HB-EGF), трансформирующий фактор роста (TGF α и β), фактор роста клеток эндотелия тромбоцитарного происхождения (PD-ECGF), фактор роста тромбоцитарного происхождения (PDGF), ангиопоэтин-1 и 2, гепарин-связывающий фактор роста эпидермиса (HB-EGF), интерлейкин-8 и ангиотензин-превращающий фермент (ACE) [124]. Все они потенциальные агенты ангиогенеза, обладающие важными

свойствами - митогенной активностью по отношению к эндотелиальным клеткам и стимулируют их миграцию [98].

Главными эффекторами ангиогенеза являются моноциты, происходящие из костного мозга [98, 102, 182]. Их называют эндотелиальными клетками предшественниками (ЕРС англ.) или эндотелиальными прогенеторными клетками (ЭПК) [161]. Пути появления клеток-предшественников в зоне ишемии в настоящее время изучены. Первый - мобилизация их под воздействием цитокинов из, так называемых, «ниш», коими являются костный мозг и скелетные мышцы [116]. Второй источник – стволовые клетки периферической крови, которые в небольшой популяции постоянно в ней циркулируют и могут мобилизоваться при повреждении, обусловленном ишемией или воздействием гематopoэтических цитокинов [51, 179].

Взаимодействие индукторов и клеток-предшественников при ишемии предложено Eric Wahlberg в его схеме ангиогенеза и артериогенеза [199]. Первым этапом является стимуляция ЭПК факторами роста. Под воздействием HIF-1 фактора ишемии происходит стимуляция хромосомного локуса клеток, отвечающего за синтез VEGF. VEGF-транскрипция, индуцированная гипогликемией и ацидозом, сопровождается стимулированием других факторов роста, в частности фактора роста фибробластов-2 (FBF-2) и тромбоцитарного фактора роста [81].

Следующим шагом в процессе ангиогенеза является VEGF-опосредованное увеличение проницаемости сосудов. Это происходит за счет изменениями в клеточной структуре мембран и перераспределения внутриклеточных молекул адгезии (PECAM-1 и vascular endothelial-cadherin). Проницаемость сосудов контролируется и подавляется путем angiopoietin-1. Экстравазация белков плазмы крови стимулируется VEGF и создает условия для миграции ЭПК. Деградация внеклеточного матрикса под воздействием angiopoietin-2 и ряда протеиназ, в основном матриксных металлопротеиназ (ММП), также является частью этой подготовки [199].

Пролиферация и миграция ЭПК - два важных эффекта воздействия VEGF, которые опосредованы через три клеточных рецептора поверхности ЭПК. VEGFR-2 (KDR/Flk-1) опосредует митогенные процессы, выживание ЭПК, эффекты проницаемости VEGF и, в основном, экспрессируется на эндотелиальных клетках. VEGFR-1 (Flt-1) экспрессируется на воспалительных клетках, VEGFR-3 находится в лимфатической ткани [196].

Когда ЭПК достигают внеклеточного матрикса, они образуют тяжи с последующим формированием внутреннего просвета. Это достигается за счет истончения эндотелиальных клеток и слияния с существующим сосудами [101]. Различные изоформы VEGF, ангиопоэтина и интегрины регулируют диаметр просвета сосуда. Трансформирующий фактор роста- β и тромбоцитарный фактор роста стимулирует выработку внеклеточного матрикса и миграцию перицитов для стабилизации новой сосудистой структуры [199].

Выявление индукторов и эффекторов ангиогенеза подтолкнуло к изучению возможности их терапевтического применения в эксперименте, а затем и в клинике. Попытки введения белковой молекулы VEGF при ишемии выявили ряд существенных недостатков, свойственных любому чужеродному белку: короткий срок функционирования, высокие дозы и неоднократные введения для получения эффекта, системные реакции в виде аллергии и нефротического синдрома [91]. Возникшая проблема была решена за счет стимуляции выработки «*in vivo*» аутологичных, то есть собственных, белков VEGF. Это стало возможным благодаря исследованиям генной терапии, методология которой заключается во внесении в клетку определенных генов, обеспечивающих синтез недостающих или экспрессирующихся белковых продуктов [24]. В качестве носителя гена VEGF в клетку на начальных этапах исследований генной терапии применялись вирусные носители: аденовирусы, лентивирусы, ретровирусы, вирус простого герпеса человека, аденоассоциированные вирусы [96, 111, 151, 158, 171]. Установлена как высокая их способность в трансфекции и стойкой экспрессии гена, так и существенные недостатки, связанные с их вирусным происхождением. Основной причиной

ограничения применения вирусных носителей стало их неконтролируемое встраивание в геном клетки реципиента, протоонкогенные и иммуногенные свойства [155, 198, 201].

Наиболее приемлемыми для клинического использования в настоящее время являются невирусные, в частности – плазмидные способы введения фрагментов нуклеиновых кислот [24, 110]. На основе данной плазмидного носителя гена VEGF созданы и проходят клинические испытания несколько препаратов, в том числе и в России [8, 29]. В настоящее время на основе плазмидной ДНК имеется препарат, разрешенный для клинического применения при терапии ЗПА – Неоваскулген®. Исследована эффективность и безопасность данного препарата [42].

Существенным фактором, ограничивающим развитие направления прямой генной терапии, является её низкая эффективность. Однако, на сегодняшний день разработаны технические подходы для доставки плазмидой ДНК в клетку: электропорация, микропорация и др., позволяющие достичь 80-90% клеток [148, 177]. Обсуждаются возможности липосомального введения терапевтического генетического материала. Таким образом, не до конца решенные проблемы доставки плазмидой ДНК в клетку, высокая стоимость разработки и получения плазмиды, не полное представление о системных эффектах для организма, а также отсутствие данных об отдаленных результатах лечения ограничивают его широкое применение. Изучение проангиогенных свойств аутологичных прогениторных (собственных стволовых) клеток, таким образом, представляется одним из перспективных.

Прогениторные клетки непосредственно участвуют в регенерации тканей за счет прямой дифференцировки в клетки регенерирующей ткани, слиянием с клетками-резидентами данной ткани и стимуляции их регенерации путем паракринной секреции ростовых и трофических факторов [40, 109]. На основании экспрессии антигенов донора в тканях реципиента на моделях хронической ишемии скелетных мышц показана способность прогениторных клеток к дифференцировке в эндотелий и гладкомышечные клетки [117, 187].

Некоторые авторы описывают секрецию ростовых факторов и цитокинов трансплантированными стволовыми клетками человека, которые группируются вокруг сосудов, без дифференцировки в ангиогенном направлении [54].

Эффект индукции ангиогенеза в ответ на введение прогениторных клеток был продемонстрированы в большом количестве экспериментальных работ на животных [45, 49, 50, 52, 54, 58, 63, 66, 72, 83, 85, 86, 99, 104, 113, 115, 125, 131, 133, 183, 186]. На моделях ишемии, созданных при помощи перевязки или коагуляции бедренных артерий у крыс, кроликов и мышей, выявлено существенное увеличение плотности капиллярной сети, рост напряженности кислорода в тканях, уменьшение числа ампутаций в ответ на введение прогениторных клеток различных типов. Эксперименты также продемонстрировали увеличение числа циркулирующих ЭПК в ответ на ишемию и накопление их в капиллярах и артериолах [123, 128].

Накопленные экспериментальные данные позволили Е. Tateishi-Yuуama в 2002 году впервые применить трансплантацию ядросодержащих клеток костного мозга у пациентов с ишемией конечностей [185]. В этом исследовании все пациенты были разделены на 2 группы: первая с унилатеральной ишемией (n=25) - получала трансплантацию моноклеарных клеток костного мозга с одной стороны и физиологического раствора с другой (контроль 1); вторая - билатеральная ишемия (n=22), получала трансплантацию моноклеарных клеток костного мозга с одной стороны и периферической крови (без цитокиновой мобилизации - контроль 2) с другой. Аутогенные клетки выделяли из аспириатов костного мозга (объём 500 мл) и через 3 часа вводили в ишемизированные мышцы (общий объём суспензии 30 мл x 40 инъекций). Среднее количество вводимых клеток – 1-2 миллиарда. Время динамического наблюдения 24 недели после трансплантации. 2 пациента в 1-ой группе умерли от инфаркта миокарда в течение 2 лет (один до трансплантации, второй через 3 месяца после, и были исключены из наблюдения), а два пациента из 2-й группы отметили ухудшение состояния до 4 недель после трансплантации. Основные критерии оценки эффективности терапии – пер-

фузионный индекс, чрескожное давление кислорода и боли в состоянии покоя. Показатели кровоснабжения улучшились в той или иной степени у всех пациентов, получавших трансплантацию клеток костного мозга, в отличие от «контрольных конечностей», где сохранялись исходные цифры. Боли в покое уменьшились у 80% пациентов после трансплантации клеток костного мозга и остались у 85% пациентов после трансплантации клеток крови. Ангиографически отмечали развитие коллатерального кровообращения в 27 конечностях из 45 после трансплантации клеток костного мозга. Эти результаты сохранялись и при дальнейшем наблюдении в течение 24 недель. В единичном исследовании биопсийного материала умершего от инфаркта пациента было выявлено, что введённые клетки активно пролиферируют и образуют новые сосуды и эндотелий, чего не наблюдалось на контрольной конечности.

Аналогичное (по методологии) исследование было опубликовано К. Esato и др., но выполненное уже на пациентах (n=8) с хроническими заболеваниями периферических артерий, сопровождающимися трофическими расстройствами в виде язв. Было зафиксировано улучшение состояния у семи пациентов, у трех пациентов полное заживления ишемических язв [147].

Последующие клинические исследования аутотрансплантации мононуклеаров КМ в большинстве своем носили характер «пилотных», однако все они констатировали улучшение параметров кровоснабжения конечности независимо от стадии ишемии и этиологии ЗПА [39, 56, 70, 92, 157].

Таким образом, костной мозг стал резервуаром стволовых клеток для аутотрансплантации, что обусловлено сравнительной легкостью и повторимостью процедуры забора клеточной массы при помощи пункции крыла подвздошной кости. Однако получаемый трансплантат отличался большой гетерогенностью за счет содержания в нем зрелых, созревающих и незрелых клеток, а также, костно-мозгового матрикса. Это подвигло к изучению и выявлению фракции мононуклеаров, ответственных за неоваскуляризацию.

Пристальное внимание уделено мононуклеарам с маркером CD34+. Данный маркер клеток определяет их принадлежность к гемопоэтическому

ростку, который участвует, в том числе и в эмбриональном ангиогенезе [44]. Благодаря выявлению гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в дальнейшем исследователи старались получить для аутотрансплантации фракцию мононуклеаров, обогащенную ГСК. С этой целью применялись различные способы сепарации пунктата костного мозга при помощи систем Ficoll, COBE, CS 3000-Plus, SmartPrep. Это позволило получить от 1,5 до 10 миллиардов мононуклеаров для трансплантации [59, 89, 169, 185].

Использовать мононуклеары периферической крови (МПК) как клеточный материал для терапии ЗПА позволило исследование К. Matsui (2003) [137]. В нем выяснено, что МПК по эффективности могут быть сравнимы с мононуклеарами КМ. Казалось бы, эти данные идут вразрез с результатами пилотного исследования, выполненного Tateishi Yuuama E. Однако, данный результат был достигнут после суточной инкубации МПК для достижения секреции ими VEGF. Уровень VEGF повышался в сыворотке крови после «двойной» трансплантации инкубированных МПК и клеток КМ, чего не наблюдалось после введения только ядродержащих клеток костного мозга.

Впервые результаты применения аутологичной трансплантации мононуклеаров периферической крови, после цитокиновой стимуляции и мобилизации из костного мозга, сообщили F.A. Kudo (2003), а затем P.P. Huang (2004) [64, 65]. Теоретической предпосылкой для их клинического опыта стало выявление процесса ре-эндотелизации повреждённых сосудов на модели животного после введения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (G-CSF), вследствие которого повышалось количество мононуклеаров в периферической крови [142]. В клинических исследованиях применение G-CSF позволило увеличить количество CD34+ (ГСК) в периферической крови в 100 раз. Внутримышечное введение мононуклеаров периферической крови, после цитокиновой стимуляции, пациентам с КИНК привело к уменьшению или исчезновению болей, повышению кожной температуры, стимуляции заживления язв и постепенному предотвращению гангрены. Было выявлен эффект улучшения

показателей перфузии конечностей на основании доплерографии, перфузионного индекса и напряжения кислорода, сохраняющийся на протяжении 3 месяцев.

Дальнейшие исследования аутотрансплантации мононуклеаров периферической крови установили их клиническую эффективность при лечении ЗПА не только атеросклеротического генеза, но и на фоне облитерирующего тромбангиита и сахарного диабета, позволившие добиться сохранения конечности при КИНК более чем у 80% пациентов [60, 73, 80, 174].

При сравнительной оценке отдаленных результатов трансплантации мононуклеаров КМ и мононуклеаров периферической крови, после цитокиновой мобилизации, очевидного преимущества их друг перед другом не выявлено, однако, большее количество клеток CD34+ (ГСК) в трансплантате снижало риск ампутации и смерти у пациентов в отдаленном периоде [71, 156].

Таким образом, мононуклеары костного мозга и периферической крови являются основным источником аутотрансплантации для лечения ЗПА, но способы их получения имеет ряд недостатков. При заборе КМ из крыла подвздошной кости описаны случаи перфорации кишки, анемии при заборе более 500 мл [59]. Получение мононуклеаров, после их цитокиновой стимуляции и мобилизации, при помощи лейкофереза исключает подобные осложнения. Однако, есть сообщения, что введение гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора и развитие индуцированной им полицитемии может спровоцировать стенокардию и острые артериальные тромбозы [75].

Практически во всех вышеперечисленных клинических исследованиях способом доставки клеточного материала к зоне ишемии явилось внутримышечное введение (инъекции равноразделенными дозами в приблизительно равноудаленных точках). Предпочтение данному виду трансплантации, по видимому, обусловлено имеющейся у клеток тенденцией к «хоумингу». Это свойство клеток отчетливо проявляется при внутривенной трансплантации костного мозга: 85% введенных клеток возвращается в костный мозг, кото-

рый составляет всего 6 % массы тела, а оставшиеся 15% распределяются между печенью, легкими, селезёнкой и другими органами [5, 170]. Кроме того, при введении в системный кровоток существует вероятность потенцирования патологического ангиогенеза (канцерогенез, обострение системных заболеваний) [106]. Также, как эффективные и безопасные, описаны способы параартериального и внутриартериального введения, а также комбинированное – внутриартериальное + внутримышечное [62, 122]. Однако, судьба введенных таким образом клеток не до конца известна.

Предполагается, что общее количество гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и их способность к дифференцировке снижается с возрастом, что может ограничить их применение для аутотрансплантации [32]. В пожилом возрасте (старше 60 лет) наблюдается редукция паренхимы костного мозга, переходящая у стариков в жировую атрофию, истощение депо клеток-предшественников [5].

Использование аллогенных стволовых клеток имеет ряд преимуществ над методикой применений аутологичных клеток. Наличие банка здоровых клеток создаст возможность лечения пациентов любого возраста, с инфекционными и генетическими заболеваниями. Однако, применение их ограничено необходимостью предварительной иммуносупрессивной терапии и отсутствием правовой базы.

Таким образом, новая стратегия лечения ишемии, обозначенная S. Takekshita в 1994 году как «терапевтический ангиогенез», подтверждена во многих исследованиях на моделях животных и клинических исследованиях. В большинстве исследований ему дана оценка как эффективному и безопасному методу лечения ЗПА. Однако, по-прежнему остаются неизученными многие аспекты воздействия клеточной терапии. В настоящее время отсутствуют данные о зависимости эффективности стимуляции ангиогенеза от количества трансплантированных моноклеаров и фракции CD34+ (ГСК). Сведения об морфологических изменениях скелетной мышцы под воздействием клеточной терапии носят единичный характер и не подлежат статистическому ана-

лизу. Оптимальная методика получения клеточного материала, позволяющая добиться получения эффективного количества и качества аутотрансплатата без ущерба безопасности, также не определена. Эффективность клеточной терапии для лечения больных с ЗПА в настоящее время установлена, однако выявить причинно следственную связь клинического улучшения с морфологически подтвержденной картиной ангиогенеза в клинических условиях пока ни кому не удалось.

Эти и другие нерешенные проблемы обусловили актуальность данной темы, определили цели и задачи настоящего исследования.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика пациентов, критерии включения и исключения

Работа выполнена на кафедре кардиологии, рентгенэндоваскулярной и сердечно-сосудистой хирургии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на базе отделения сосудистой хирургии ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Республики Татарстан.

Клиническая часть исследования выполнена на базе отделения сосудистой хирургии ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Республики Татарстан. Морфологические исследования биопсийного материала скелетной мышцы проведены на кафедре нормальной анатомии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет». Протокол исследования и критерии отбора пациентов одобрены Республиканским комитетом по этическим вопросам (Протокол №10 от 23.11.2005 г).

Критерии включения:

- проходимость аорто-бедренного сегмента и глубокой артерии бедра;
- возраст до 60 лет (включительно)
- хроническая артериальная недостаточность IIБ степени (по А.В.Покровскому)
- длительность заболевания и\или время от последнего реконструктивного вмешательства более 6 месяцев при отсутствии эффекта от консервативной терапии
- окклюзия подколенной и\или берцовых артерий.

Критерии исключения.

- Наличие критической ишемии как состояния, требующего активной консервативной, реконструктивной или органоуносящей тактики;
- противопоказания к применению препарата Нейпоген (рекомбинантный G-CSF);
- тяжелая сердечно-сосудистая недостаточность;
- нарушение сознания;
- онкозаболевания;
- вирусные гепатиты и инфекция ВИЧ.

Таким образом, в исследование включались пациенты с инфраингвинальными поражениями, у которых прямая реваскуляризация была либо невозможна, либо имела сомнительный непосредственный или отдаленный прогноз хирургического лечения из-за окклюзии подколенно-берцового сегмента.

Исследование эффективности применения аутологичных МПК у пациентов с ЗПА, согласно Протоколу, носило характер неконтролируемого открытого одноцентрового, что не предусматривало наличие группы контроля. В связи с этим, вне рамок «Протокола исследования...», нами проведено изучение естественного течения ЗПА у пациентов со схожей топографией поражения инфраингвинального артериального русла и стадией заболевания на фоне стандартной терапии.

В исследовании приняли участие 56 пациентов, разделенных на 2 основные группы. I группу представили пациенты, которым выполнена стимуляция, мобилизация и аутологичная трансплантация фракции МПК в мышцы пораженной конечности. II группу – аналогичные по клиническому статусу пациенты, которые, по тем или иным причинам, воздержались от хирургического лечения или применения клеточной терапии.

Все 56 пациентов в обеих группах получали стандартную терапию основного заболевания согласно «Национальным рекомендациям...»: препараты АСК в дозе 100мг 1 раз в день, ингибиторы ГМГ-КоАредуктазы (статины)

с коррекцией дозы от уровня ЛПНП. Также рекомендована ежедневная тренировочная ходьба. К моменту включения в исследование пациентам проведена коррекция терапии сопутствующей патологии, что исключило бы её влияние на изучение течения основного заболевания. Клиническая характеристика пациентов, отобранных в исследование представлена в таблице 1.

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов.

	I группа	II группа
Количество, n	30	26
Возраст	51,2±1,5	56,4±1,4
Пол	Муж.-30\Жен.- 0	Муж.-26\Жен.- 0
Этиология ЗПА		
• Атеросклероз	27(90%)	24 (92%)
• Тромбангиит	3 (10%)	2 (8%)
Сопутствующая патология		
• Артериальная гипертензия	33,3%	46,2%
• Сахарный диабет	10%	7%
• Заболевания ЖКТ	20%	30,7%
• Заболевания органов дыхания	10%	15,4%
• Атеросклероз БЦА	33,3%	15,4%
• ИБС	33,3%	38,4%
• Мультифокальный атеросклероз	16,7%	8%
Медиана ЛПИ, исходная	0,57 (25-75 перцентиль: 0,43-0,73)	0,6 25 – 75 перцентиль: 0,53 – 0,67)

2.2. Методы обследования

Обследование пациентов включало в себя сбора анамнеза, физикальное обследование: общий осмотр, пальпация и аускультация периферических артерий, оценка соматического статуса пациента. В перечень клинических анализов включены: общий анализ крови, мочи, биохимический анализ крови, коагулограмма, анализ крови на сахар и свертываемость, холестерин крови, липопротеиды высокой и низкой плотности, выявление антител к ВИЧ, гепатитам и сифилису.

Оценка сопутствующей патологии проводилась при помощи ЭКГ, при необходимости ЭХО-КС, цветного дуплексного сканирования прецеребральных артерий, ультразвукового исследования органов брюшной полости и забрюшинного пространства, фиброгастродуоденоскопии, рентгенографии легких (флюорографии). Проводился осмотр терапевта или кардиолога с целью коррекции терапии сопутствующей патологии. Особое внимание было уделено онкологическому анамнезу.

Для объективизации локализации патологического процесса и степени ишемии применялись: ультразвуковая доплерография с измерением регионарного систолического давления на нижних конечностях и расчетом лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), рентгенконтрастная ангиография инфраренального отдела аорты и артерий нижних конечностей, тредмил-тест и измерение времени восстановления ЛПИ после дозированной физической нагрузки по методике И.И. Затевахина. Изменения клинического статуса оценивали при помощи схемы, предложенной R. Rutherford, принятой Российским консенсусом в 2001 году [33].

2.2.1. Лодыжечно плечевой индекс.

ЛПИ применялся для объективизации степени ишемии конечности. Измерения проводили на аппарате VasoGuard (Nicolet, США) с использова-

нием датчиков 4 и 8 мГц. ЛПИ рассчитывали как соотношение систолического АД в артерии голени на уровне лодыжки (САДл; в *a. tibialis anterior*, в *a. tibialis posterior* или в *a. peronea*) к систолическому АД (САД) в плечевой артерии: $ЛПИ = САДл / САДПА$ [20, 26, 38, 69]. При наличии гемодинамически значимого стеноза подключичных артерий для определения ЛПИ выбиралось значение систолического давления на не пораженной верхней конечности.

В норме САД на уровне лодыжек равно или несколько выше САД на уровне плечевой артерии. Значение ЛПИ менее 1, свидетельствует о наличии стенооокклюзирующего поражения проксимальных отделов артерий нижних конечностей [26]. В литературе представлен довольно широкий диапазон изменений показателей ЛПИ. Зарубежные исследователи принимают за нормальное значение величину ЛПИ больше или равную 0,95. По данным А.В.Покровского и Г.И. Кунцевич, и нормальные показатели ЛПИ составляют 1 (0,9-1,2). При ишемии нижних конечностей I степени, по классификации Фонтейна-Покровского, ЛПИ составляет 0,9 и более, при II степени – 0,8-0,6, при III стадии – 0,5-0,4, при IV степени – 0,3 и менее. По данным С.А. Дадвани, при I стадии показатели ЛПИ составляют 0,9-0,8, II стадии – 0,7-0,6, III стадии – 0,5-0,4, IV стадии – 0,3 и менее [26].

2.2.2. Тредмил тест.

Увеличение дистанции безболевого ходьбы является основным показателем успешности проводимого лечения перемежающейся хромоты. Пациенты со сходными показателями ЛПИ зачастую отличаются между собой по продолжительности ходьбы. Это связано как с приспособлением пациентов к привычному для себя темпу ходьбы, так и с пропускной способностью коллатеральной сети, позволяющей обеспечивать кровоснабжение конечности в условиях физической нагрузки. Кроме того, физическая нагрузка при окклюзии или стенозе магистральной артерии приводит к снижению ЛПИ дистальнее за счет ускорения кровотока.

Для оценки толерантности к физической нагрузке прибегают к нагрузочным пробам. Наиболее физиологичным является ходьба по движущейся дорожке – тредмил. Методика И.И.Затевахина с соавторами предлагает выполнять ходьбу на 200 метров с горизонтальным уровнем дорожки, скоростью 3,2 км\ч и измерением времени восстановления исходного ЛПИ после нагрузки [10].

Дистанция ходьбы до 200 метров соответствует ПБ степени ишемии по классификации А.В.Покровского. Если пациент не преодолевал данную дистанцию, из-за появления боли в икроножной мышце или стопе, дорожка останавливалась и фиксировалось время ходьбы. Пройденная дистанция вычислялась по формуле:

$$\text{ДБХ (м)} = \frac{\text{Время ходьбы до появления боли (сек)} \times 3200 \text{ (м\ч)}}{3600} \quad (1)$$

Время восстановления до исходного значения ЛПИ измерялось каждую минуту после выполнения тредмила в положении лежа.

Данная методика, предложенная И.И. Затевахиным, позволяет разделить пациентов по функциональным классам. Пациенты, прошедшие 200 метров, но имеющие время восстановления исходного ЛПИ менее 15,5 минут, относятся, согласно методике, в группу с ограниченным резервом ходьбы. Пациенты, которые не прошли 200 метров или имели время восстановления более 15,5 минут – в группу с критическим резервом ходьбы. Пациенты с критическим резервом ходьбы, по мнению И.И.Затевахина с соавторами, близки к развитию КИНК и нуждаются в активной лечебной тактике.

2.2.3. Ангиографические исследования

Ангиография основана на введении контрастного вещества непосредственно в артерию или вену. Затем производится фиксация пробега контрастного вещества по сосуду в виде изображения или серии изображений, что позволяет визуализировать магистральные и коллатеральные артерии диа-

метром более 200 мкм [185].

Ангиография выполнялась всем пациентам для верификации диагноза и определения соответствия критериям включения. Повторное исследование проводилось на сроке 3 месяца после аутотрансплантации фракции МПК с соблюдением условий протокола первичного исследования – доступ, диаметр и расположение катетера, объем и вид контрастного вещества. Исследование проводилось на ангиографическом оборудовании Philips integris allura (Голландия) по методике Сельдингера. В 7 случаях ангиография выполнена трансаксиллярным доступом в виду наличия в анамнезе у этих пациентов реконструкции аорто-бедренного сегмента, в остальных - трансфеморальным.

Анализ ангиограмм включал в себя оценку состояние путей оттока поражённой конечности при помощи схемы, предложенной R. Rutherford, рекомендованной Российским консенсусом [33].

Данная классификация позволяет учесть как вклад каждой из артерий оттока в общее периферическое сопротивление, так и степень поражения каждой из артерий. Полученные баллы позволяют разделить пациентов по группам: с хорошими путями оттока от 1 до 4,5 баллов, с удовлетворительными путями оттока от 5 до 7,5 баллов, с плохими путями оттока от 8 до 10 баллов. Сумма баллов от 1 (базовое сопротивление при отсутствии поражения артерий) до 10 (максимальное сопротивление - «слепой мешок») характеризует состояние артериального русла и потенциальный прогноз хирургического лечения. Расчет проводится на основании ниже представленных таблиц 2.1 и 2.2.

Оценка степени развития коллатералей поле аутотрансплантации проводилась сравнением первичных ангиограмм и на сроке спустя 3 месяца. В настоящее время нет общепринятого стандарта для определения интенсивности коллатерального ангиогенеза в нижних конечностях на основании ангиографии. Dong-Ik Kim с соавторами в 2008 году предложил методику балльной оценки развития коллатерального кровоснабжения по следующим критериям: 0 (отсутствие развития коллатералей), +1 (незначительное развитие

коллатералей), +2 (умеренное развитие коллатералей), +3 (богатое развитие коллатералей). Однако, предложенный метод, по нашему мнению, имеет весьма субъективный характер, то есть, основан на личном восприятии исследователя, без ссылки на какую-либо систему или эталон при выполнении оценки [55].

В нашем исследовании мы посчитали наиболее приемлемо использование адаптированного метода Vajanto I. и соавт. [57]. Методика предполагает подсчет всех видимых на ангиографических сериях коллатералей, пересекающих прямую, перпендикулярную длиннику окклюзированного сегмента артерии на границе его средней и дистальной трети [43]. При наличии нескольких участков окклюзии показатели усреднялись.

Таблица 2.1

Состояние артерий оттока по R. Rutherford - локализация

Локализация дистального анастомоза (артерия)	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	Дистальные отделы подколенной		Передняя берцовая
			Задняя берцовая
Подколенная ниже щели			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			

Состояние артерий оттока по R. Rutherford – окклюзия

Степень окклюзии	Количество баллов				
	3	2,5	2	1	0
Крупные артерии оттока	Окклюзия на всем протяжении	Окклюзия на протяжении менее чем 1/2 длины, видимые коллатерали	Стеноз от 50 до 99%	Стеноз от 20 до 49%	Стеноз меньше 20%
Пути оттока стопы	Нет проходимых 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 артерии стопы, не являющихся продолжением окклюзированной артерии, создающей основной блок	Полностью проходимая стопная дуга (стеноз <20%)

2.2.4. Изменения клинического статуса

Оценку изменения в клиническом статусе выполняли при помощи схемы, предложенной R. Rutherford.[159]. Основные критерии оценки и их значимость представлены в таблице 3.

Таблица 3

Рекомендуемая шкала изменения в клиническом статусе по R. Rutherford

+3	Значительное улучшение	Нет симптомов ишемии, все трофические язвы зажили, ЛПИ нормализовался (вырос больше 0.9)
+2	Умеренное улучшение	Пациент симптомный, но боли в конечности появляются при большей нагрузке, чем до операции; улучшение как минимум на одну степень ишемии; ЛПИ не нормализовался, но вырос больше, чем на 0.1
+1	Минимальное улучшение	Увеличение ЛПИ, более чем на 0.1, но нет клинического улучшения или, наоборот, клиническое улучшение без прироста ЛПИ, более чем на 0.1
0	Без изменений	Нет изменения в степени ишемии и нет увеличения ЛПИ
-1	Незначительное ухудшение	Нет изменения в степени ишемии, но ЛПИ уменьшилось больше, чем на 0.1, или, наоборот, ухудшение статуса без уменьшения ЛПИ на 0.1 и более
-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

В основу оценочной шкалы заложена необходимость объективного подтверждения гемодинамического улучшения. Для этого рекомендуется использовать оценку увеличения лодыжечно-плечевого индекса минимум на 0.1.

Определение уровня клинического улучшения позволяет избежать оценки результатов лечения только на основании симптоматического улучшения.

2.3. Методика стимуляции ангиогенеза с применением фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками

С целью стимуляции и мобилизации фракции мононуклеаров перифериче-

ской крови (МПК), обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК), в периферическую кровь пациенту назначался препарат рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Нейпоген®). Подкожные инъекции препарата производились в течение 5 дней в суточной дозе 1 млн. ед./кг. массы тела. Данная схема введения рекомендована производителем для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь для аллогенной трансплантации. Ежедневно проводился анализ периферической крови для мониторинга индуцированного Нейпогеном лейкоцитоза.

На 6-й день проводилась процедура лейкофереза. В условия гемодиализного зала по средствам пункции периферической вены производился забор крови и обработка её на многофункциональном клеточном сепараторе крови MCS+ (Haemonetics Corporation, USA). После лейкофилтрации кровь возвращалась пациенту. Выполнялось 3-4 цикла забора\возврата периферической крови. Продолжительность всей процедуры не превышала 3-х часов (рис. 1).

Забранный материал размещался в гемаконах. Около половины объема полученного от каждого пациента клеточного продукта отбиралась для замораживания и хранения. Остальное доставлялось с пациентом в операционную.

Подсчет абсолютного числа жизнеспособных ГСК с фенотипом $CD45^{dim}CD34^{+}SSC^{low}$ выполняли в лаборатории клинической иммунологии ГАУЗ РКБ МЗ РТ по протоколу ISHAGE в модификации на проточном цитометре Facs Calibur (BD, USA) с применением набора Stem-Kit® Reagents (# IM3630, Beckman Coulter, France) по инструкции производителя (Current Protocols in Cytometry (2003) 6.4.1 -6.4.23. Copyright © 2003 by John Wiley & Sons, Inc). Использовали комбинацию моноклональных антител CD45-FITC/CD34-PE и краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD) для идентификации нежизнеспособных клеток. Один из этапов процедуры электронного гейтинга ГСК, выполняемого в программном пакете Cell Quest®, переведен на рисунке 2.



Рис. 1. Процедура лейкофереза на аппарате MSC+.

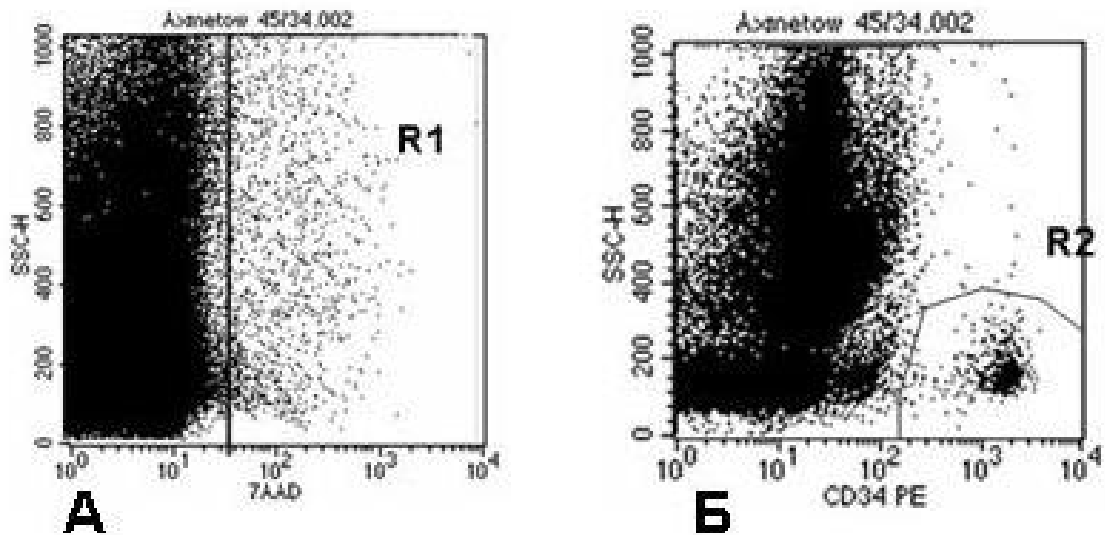


Рис. 2. Фрагмент алгоритма гейтинга ГСК по протоколу ISHAGE. А) выделение региона R1 нежизнеспособных клеток с поврежденной цитоплазматической мембраной, проницаемой для 7-AAD. по абсциссе: интенсивность флуоресценции 7-AAD. по ординате: интенсивность ортогонального светорассеяния (SSC), пропорциональная гранулярности клетки. Б) выделение региона R2 клеток с фенотипом $CD34^+SSC^{low}$ в субпопуляции клеток с интактной цитоплазматической мембраной (R1-клетки из анализа исключены). по абсциссе: экспрессия CD34. по ординате: интенсивность ортогонального светорассеяния.

В условиях операционной под спинномозговой анестезией, после выполнения биопсии икроножной мышцы, полученный при лейкоферезе клеточный концентрат МПК перемещался из резервуара в шприцы для инъекций объемом

20 мл. Для пункции использовались стандартные иглы для внутримышечных инъекций размером 8x40 мм. Пункционная инфильтрация передней и задней группы мышцы голени выполнялась в равноудаленных точках примерно одинаковыми объемами (рис. 3).



Рис. 3. Этап операции: введение фракции МПК в мышцы конечности.

Продолжительность операции от момента забора биопсии до завершения инфильтрации составляло не более 15 минут. Операция заканчивалась наложением асептической повязки. Пациент доставлялся в палату. Рекомендовался постельный режим в течение суток в связи с пункцией спинномозгового канала при анестезии.

2.4. Методика морфологического исследования скелетной мышцы

Операцию по забору биопсии производили под спинномозговой или местной анестезией. Кожный разрез выполняли на уровне середины голени по медиальной или заднемедиальной поверхности. После вскрытия поверхностной и глубокой фасций производили забор мышечной ткани размерами примерно 0,5x0,5x0,5см (Рис. 4).

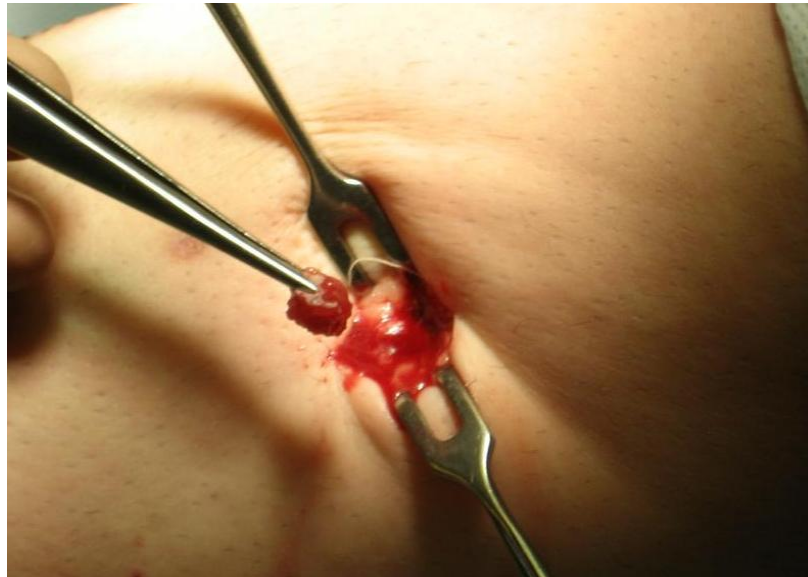


Рис. 4 . Этап операции: забор биопсии.

После фиксации в 10% нейтральном формалине биоптаты заливали по стандартной методике в парафин, полученные парафиновые срезы (4-6 μm) для визуализации капилляров подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с коммерческими моноклональными антителами к CD31 (клон 1A10, Novocastra, UK, разведение 1:10), CD34 (клон QBEnd/10, Novocastra, UK, разведение 1:75), vWF (клон F8/86, DAKO, Denmark, разведение 1:25) и системы визуализации Novolink (Novocastra, UK). Ядра клеток докрасивали гематоксилином (Рис. 5).

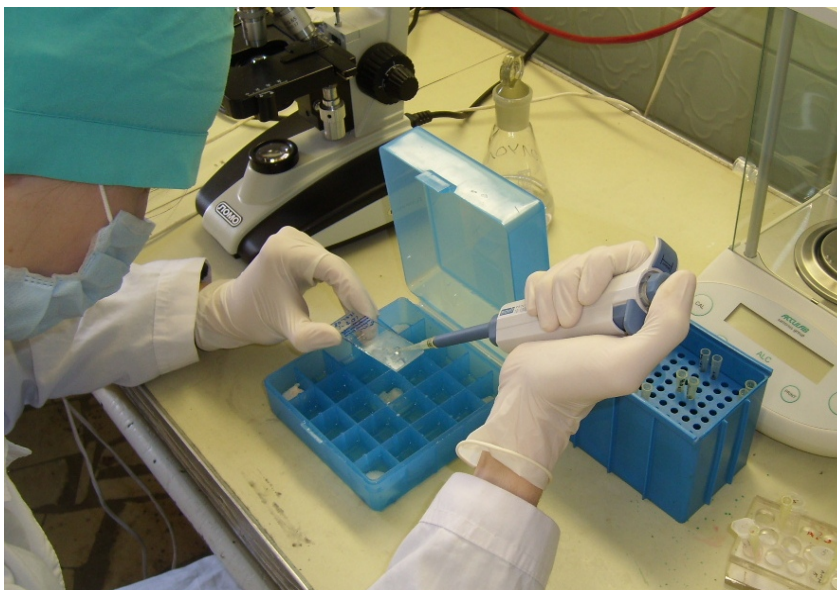


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание срезов биоптатов.

После визуализации капилляров на срезах биопсий выбирали по 3 случай-

ных поля зрения. Подсчитывали число капилляров в каждом поле ранее описанной методике [78]. Чтобы исключить влияние возможного интерстициального отека и мышечной гипертрофии или атрофии на плотность капиллярной сети, определяли относительное количество капилляров на одно мышечное волокно. Полученный результат определяли как индекс К/М.

После проведения аутотрансплантации фракции МПК пациент выписывался из стационара на 3-5 сутки. На сроке 3 месяца пациент госпитализировался. Выполнялась ангиография по вышеуказанной методике и биопсия икроножной мышцы под местной инфильтрационной анестезией 1% раствора лидокаина в отдалении от первичной биопсии для исключения влияния перенесенного ранее местного репаративного процесса.

2.5. Алгоритм исследования у пациентов, после аутологичной трансплантации мононуклеаров периферической крови

Алгоритм наблюдения за пациентами после аутотрансплантации МПК представлен в таблице 4. Функциональные исследования (измерение ЛПИ, тредмил тест, определение времени восстановления исходного ЛПИ после нагрузки) проводились на всех контрольных сроках исследования.

Изучение отдаленных результатов на сроке 5 лет (60 месяцев) выполнено на основании анкетирования (почтовая рассылка) и очных осмотров с проведением функциональных исследований.

Таблица 4

Алгоритм наблюдения за пациентами после аутотрансплантации МПК

Исследование	Сроки наблюдения (месяцы)				
	0	3	6	12	60
Ангиография	+	+			
Биопсия икроножной мышцы	+	+			
Определение ЛПИ	+	+	+	+	+
Тредмил-тест	+	+	+	+	+
Время восстановления ЛПИ	+	+	+	+	+

2.5. Методы статистической обработки результатов

Использовали статистические пакеты STATGRAPHICS Centurion XVI и STATISTICA 6. Распределение значений переменных проверяли на нормальность в тесте Колмогорова-Смирнова-Лиллиефорса. Достоверность отличий вычисляли в непараметрическом тесте Вилкоксона для двух зависимых переменных. Наличие корреляций между переменными тестировали при помощи регрессионного анализа и коэффициента Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3

ИЗУЧЕНИЕ ТЕЧЕНИЯ ЗПА В ГРУППЕ ПАЦИЕНТОВ СО СТАНДАРТНОЙ ТЕРАПИЕЙ

Отбор пациентов и динамическое наблюдение за ними проводилось в амбулаторных условиях. У всех пациентов установлено стеноокклюзирующее поражение инфраингвинального сегмента без гемодинамически значимых стенозов аорто-подвздошного сегмента и глубокой артерии бедра. Верификация диагноза произведена при помощи ультразвукового дуплексного сканирования артерий, либо на основании ангиографического исследования, проведенного ранее. Длительность заболевания у всех пациентов составляла больше одного года.

В данную группу отобрано 26 пациентов, соответствующих определенным ранее критериям. Все пациенты мужчины в возрасте от 42 до 60 лет (средний возраст $56,4 \pm 1,4$). Структура заболеваний: атеросклероз - 24, облитерирующий тромбангиит (болезнь Винивартера-Бюргера) – 2 пациента (рис.6)

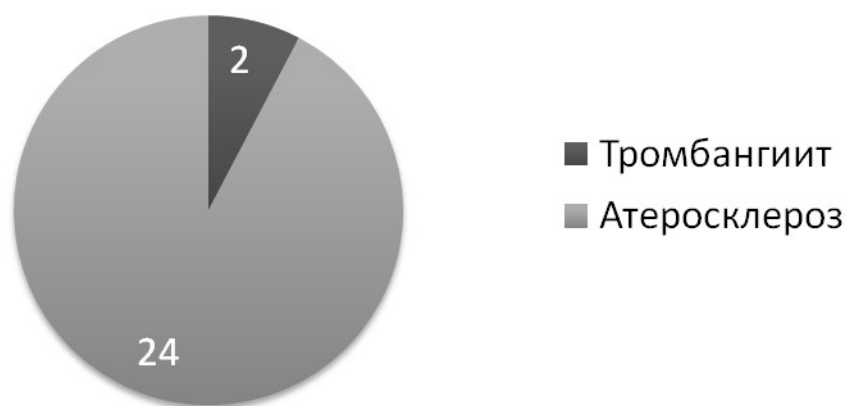


Рис. 6. Структура заболеваний в группе пациентов в группе пациентов со стандартной терапией

10 из 26 пациентов ранее перенесли операции прямой и (или) непрямой реваскуляризации. На момент включения в исследование срок после последнего перенесенного вмешательства на артериях нижних конечностей составлял от 12 до 65 месяцев. Виды перенесенных вмешательств и их исходы представлены в таблице 5.

Таблица 5

Виды перенесенных вмешательств
в группе пациентов со стандартной терапией

Количество пациентов	Аорто-бедренный сегмент	Бедренно-подколенный сегмент	Непрямая реваскуляризация
2	Резекция аневризмы аорты, АББП		
4		БПШ	
2			Поясничная симпатэктомия
2		Тромбэктомия	

На момент включения в исследование проходимость аорто-бедренного сегмента, в том числе аорто-бедренных шунтов, и глубокой артерии бедра была сохранена. Бедренно-подколенные шунты окклюзированы. Гемодинамически значимое поражение артерий обеих конечностей имелось у 6 из 26 пациентов. Степень хронической артериальной недостаточности у данных пациентов соответствовала IIБ степени по А.В.Покровскому.

В данной группе пациентов выявлена следующая сопутствующая патология: ишемическая болезнь сердца - 10 пациентов (38,4%), поражение прецеребральных артерий - 4 (15,4%), артериальная гипертензия - 12 (46,2%), сахарный диабет - 2 (7%), хронические заболевания желудочно-кишечного тракта вне обострения - 8 (30,7%), хронические заболевания дыхательной системы - 4 пациентов (15,4%) (Рис. 7).

В данной группе пациентов, так же как и в группе изучения аутотрансплантации ГСК, выполнялись измерения значений ЛПИ, тердмил тест и определение времени восстановления исходного ЛПИ после нагрузки. Проведение гистологического исследования скелетной мышцы не выполнялось, так как данная

группа была набрана вне рамок запланированного клинического исследования. Отдаленные результаты изучались на сроках 3, 6 и 12 месяцев (таблица 6). Неявка пациентов на контрольных точках исследования не связана с течением основного или сопутствующего заболевания, а обусловлена прочими причинами.

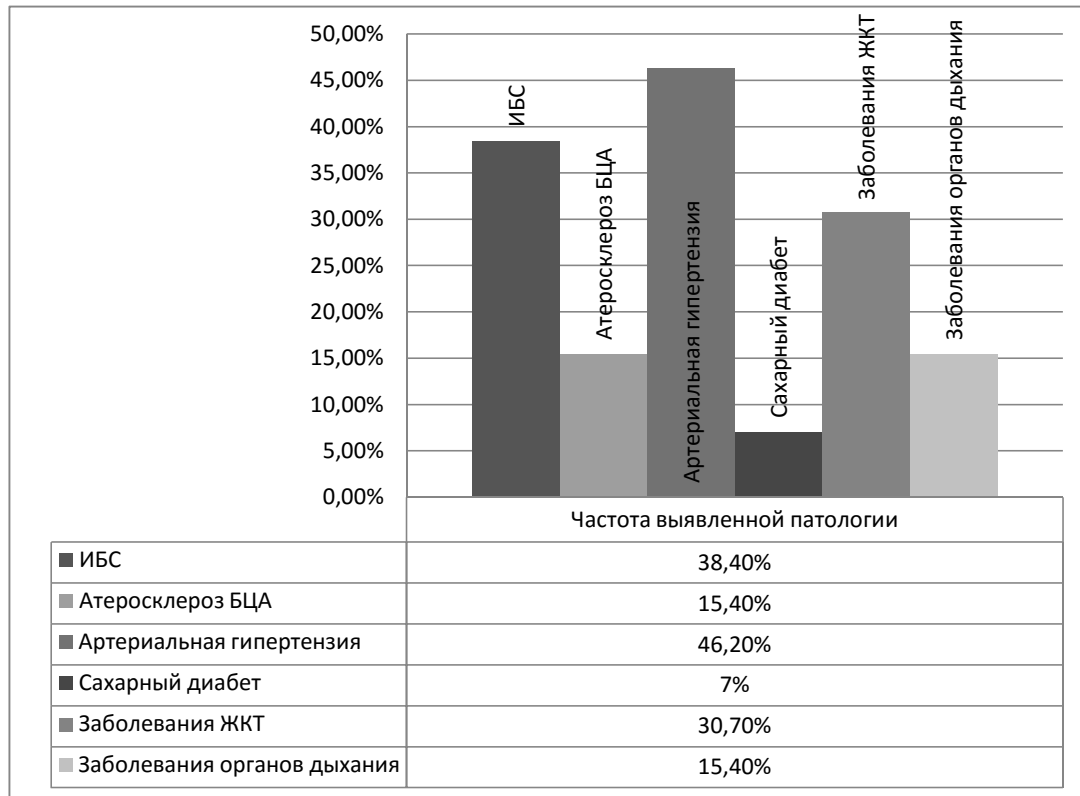


Рис. 7. Частота выявленной сопутствующей патологии в группе пациентов со стандартной терапией.

Таблица 6

Количество наблюдений при изучении естественного течения ЗПА в группе пациентов со стандартной терапией

	Срок наблюдения, мес.			
	0	3	6	12
Количество очных наблюдений	26	26	25	22

В ходе наблюдения за данной группой пациентов в течение года значительного изменения показателя ЛПИ нами не выявлено. Значения на сроке 3 месяца - 0,6 (25 – 75 перцентиль: 0,53 – 0,67, $p=0,4$ и 6 месяцев 0,58 (25 – 75 перцентиль: 0,53 – 0,69, $p=0,198$) были статистически не достоверны. Через год наблюдения зафиксированное статистически достоверное снижение ЛПИ на 0,02: с

исходного 0,6 (25 – 75 перцентиль: 0,53 – 0,67) до 0,58 (25 – 75 перцентиль: 0,48 – 0,62) ($p=0,00009$) (таблица 7, рис.8).

Таблица 7

Медиана значений ЛПИ в динамике
в группе пациентов со стандартной терапией

Срок наблюдения, мес.	Количество наблюдений	Медиана	25 перцентиль	75 перцентиль	p
0	13	0,60	0,53	0,675	
3	13	0,60	0,53	0,69	0,4
6	12	0,58	0,50	0,61	0,198
12	11	0,58	0,48	0,62	0,00009

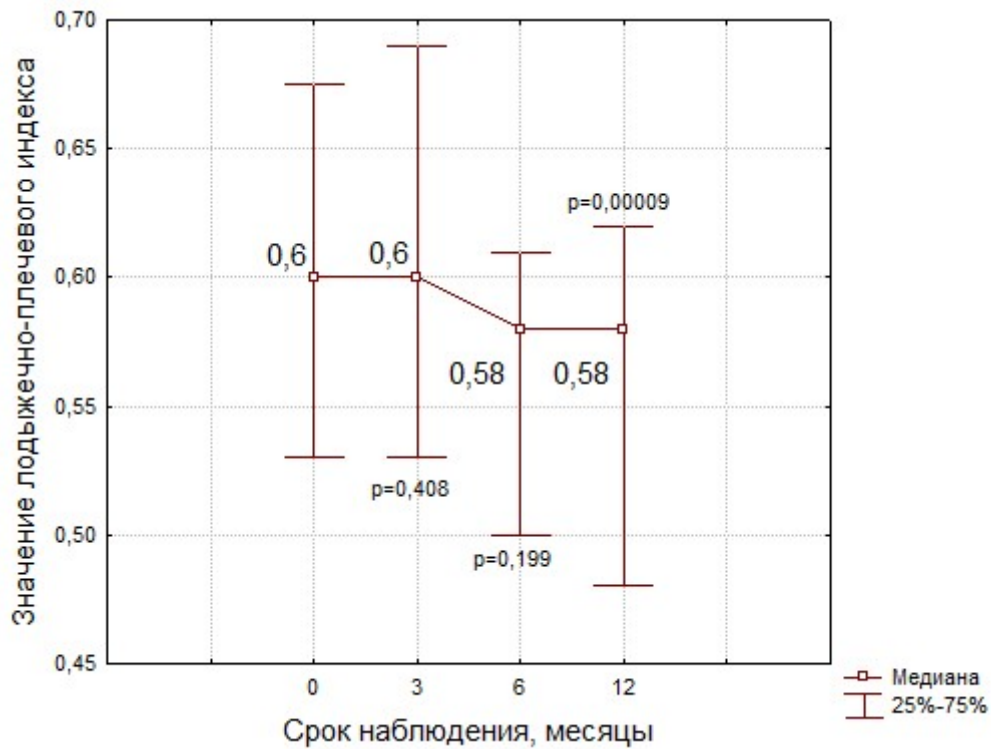


Рис. 8. График значения ЛПИ в группе пациентов со стандартной терапией.

Тредмил-тест за период наблюдения выявил тенденцию к снижению дистанции безболевого ходьбы. Если промежуточные значения на сроке 3 и 6 месяцев были статистически недостоверны, то к 12 месяцам наблюдения дистанция достоверно сократилась на 19,5% с 149,33 (25-75 перцентиль: 102,22 – 177,78) метров до 120 (25 – 75 перцентиль: 80-150) метров ($p=0,0013$). Основные параметры изменения ДБХ представлены в таблице 8 и на рис. 9.

Дистанция безболевого ходьбы
по результатам тредмил-теста в группе пациентов со стандартной терапией

Срок наблюдения, мес.	Количество наблюдений	Медиана, метры	25 перцентиль	75 перцентиль	p
0	13	149,33	102,22	177,78	
3	13	152,00	110,00	168,89	0,423
6	12	138,00	96,00	146,00	0,097
12	11	120,00	80,00	150,00	0,0013

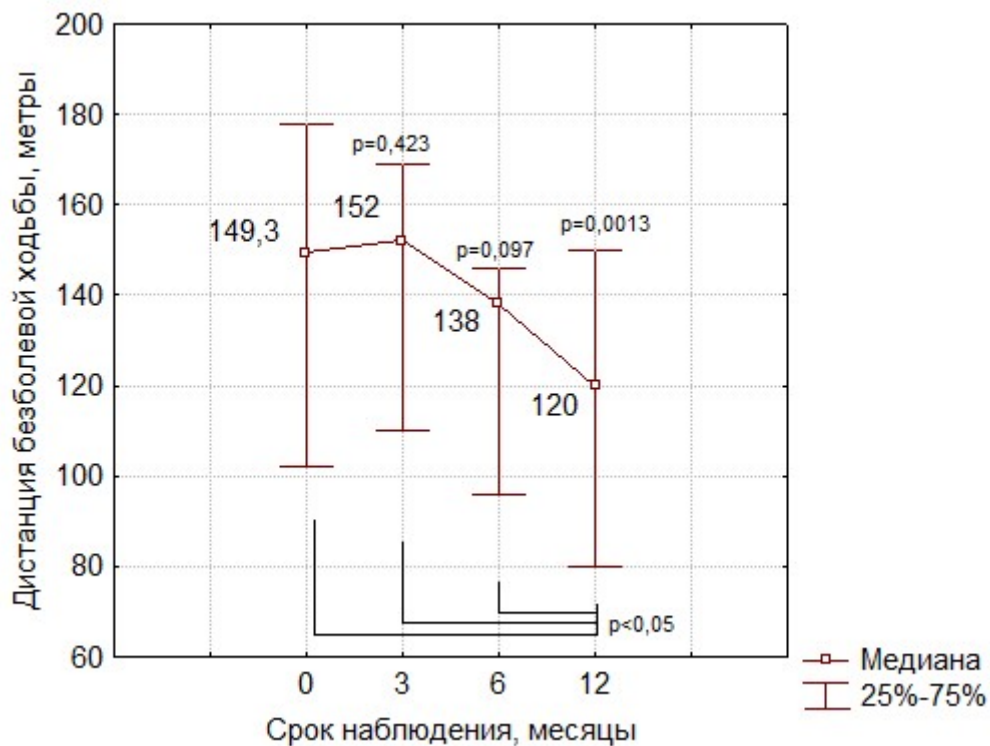


Рис. 9. График измерения дистанции безболевого ходьбы по результатам тредмил-теста в группе пациентов со стандартной терапией.

На всех сроках наблюдения выявлено поступательное увеличение времени восстановления ЛПИ, свидетельствующее об ухудшении функционального состояния конечности и резерва коллатерального кровоснабжения. К 12 месяцам регресс составил 53,3% с 574 (25–75 перцентиль: 461-1206) сек. до 880 (25-75 перцентиль: 560-1340) сек. ($p=0,04$). Основные параметры изменения ДБХ представлены в таблице 9 и на рисунке 10.

Таблица 9

Время восстановления исходного ЛПИ после нагрузочного теста в группе пациентов со стандартной терапией

Срок наблюдения, мес.	Количество наблюдений	Медиана, сек.	25 перцентиль	75 перцентиль	p
0	13	574,0	461,0	1206,0	
3	13	655,0	450,0	1109,0	0,91
6	12	735,0	550,0	1250,0	0,48
12	11	880,0	560,0	1340,0	0,4

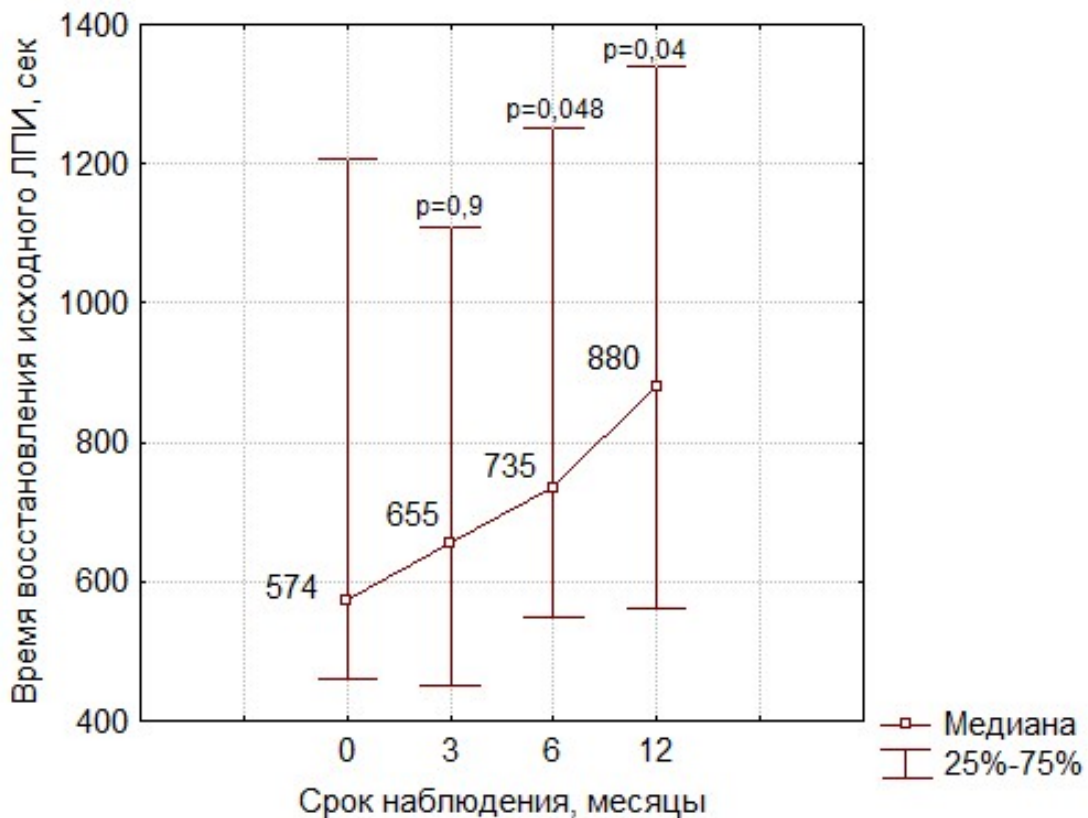


Рис. 10. График измерения времени восстановления исходного ЛПИ после нагрузочного теста в группе пациентов со стандартной терапией.

Оценка изменений в клиническом статусе по R. Rutherford представлена в таблице и на рисунке 10. На сроке 3 месяца установлено отсутствие улучшения у 24 пациентов (+0 по R. Rutherford), минимальное улучшение (+1 по R. Rutherford) у 2 пациентов. К шести месяцам группа с минимальным улучшением (+1 по R. Rutherford) возросла до 6 пациентов. Однако, уже на сроке 12 месяцев в группе минимальным улучшением (+1 по R. Rutherford) осталось лишь два пациента и выявлено 2 пациента с незначительным ухудшением (-1 по R. Rutherford).

Несмотря на выявленное, на основании функциональных исследований, ухудшение клинического статуса данные пациенты субъективно оценивали свое состояние как без изменений.

Таблица 10

Изменение клинического статуса согласно шкале R. Rutherford
в группе пациентов со стандартной терапией

Клинический статус R. Rutherford	Срок наблюдения, месяцы		
	3	6	12
Значительное ухудшение (-3)	-	-	-
Умеренное ухудшение (-2)	-	-	-
Незначительное ухудшение (-1)	-	-	2
Отсутствуют (+0)	24	19	18
Минимальное улучшение (+1)	2	6	2
Умеренное улучшение (+2)	-	-	-
Значительное улучшение (+3)	-	-	-
Всего	26	25	22

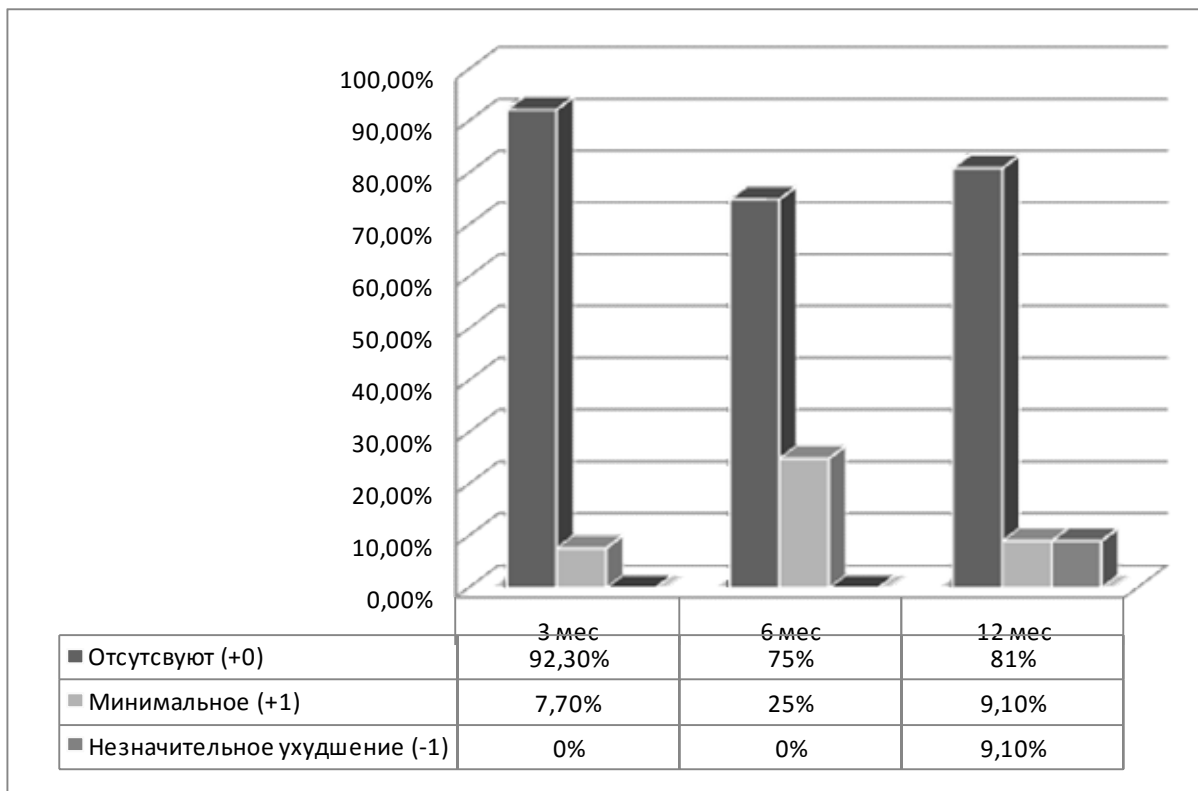


Рис. 11. График изменения клинического статуса согласно шкале R. Rutherford в группе пациентов со стандартной терапией.

Таким образом, естественное течение ЗПА у пациентов в стадии перемежающейся хромоты в целом можно охарактеризовать как благоприятное. Одна-

ко, несмотря на стабильные значения ЛПИ (показатель макрогемодинамики), в течение года отмечается прогрессивное ухудшение ДБХ и времени восстановления ЛПИ после нагрузки, характеризующие резерв коллатерального кровообращения.

ГЛАВА 4

**РЕЗУЛЬТАТЫ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ
С ЗПА**

4.1. Непосредственные результаты аутологичной трансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, у пациентов с ЗПА.

Согласно программе Исследования для проведения операции по аутологичной трансплантации МПК в мышцы пораженной конечности проведен отбор 30 пациентов, соответствующих установленным критериям. Все пациенты мужчины в возрасте 27-60 лет (средний возраст $51,2 \pm 1,5$). Структура заболеваний: атеросклероз - 27, облитерирующий тромбангиит (болезнь Винивартера-Бюргера) – 3 пациента (Рис. 12.).

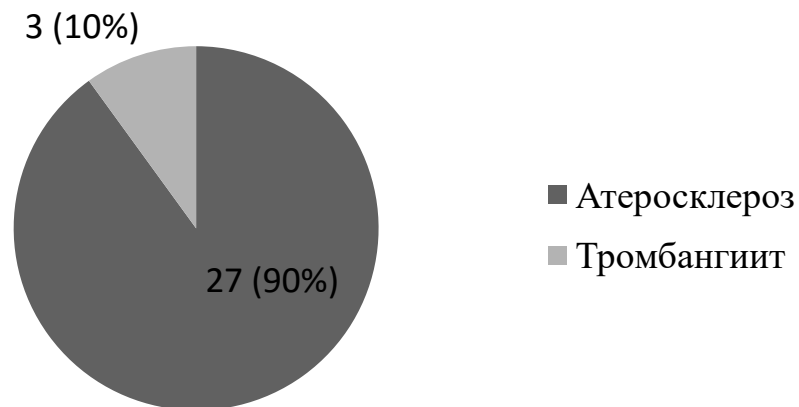


Рис. 12. Структура заболеваний в группе пациентов, перенесших аутологичную трансплантацию МПК

16 из 30 пациентов ранее перенесли операции прямой и (или) непрямой реваскуляризации. Срок после последнего перенесенного вмешательства составлял от 7 до 101 месяца. Виды перенесенных вмешательств и их исходы представлены в таблице 11.

Виды перенесенных вмешательств

Количество пациентов	Аорто-бедренный сегмент	Бедренно-подколенный сегмент	Непрямая реваскуляризация
4	АББШ*		
3	АББШ*	БПШ (1 – реБПШ)	
5		БПШ (2 – реБПШ)	
1	Профундо-пластика		Поясничная симпатэктомия
1		Тромбэктомия	
1			Поясничная симпатэктомия
1			Реваскуляризирующая остеоперфорация

На момент включения в исследование проходимость аорто-бедренного сегмента (в том числе аорто-бедренных шунтов) и глубокой артерии бедра была сохранена, все бедренно-подколенные шунты - окклюзированы. Пациенты включались в исследование не менее 6 месяцев спустя после ухудшения ДБХ, наступившей, например, на фоне развившейся окклюзии бедренно-подколенного шунта. Это позволило исключить компенсаторный механизм коллатерального кровоснабжения на увеличение ДБХ после аутооттрансплантации ГСК, то есть пациенты находились в стадии «стабильной» перемежающейся хромоты

Стеноокклюзирующее поражение артерий обеих конечностей имелось у 7 из 30 пациентов. Медиана значения ЛПИ на контралатеральной конечности составила 1,1 (25 – 75 перцентиль: 0,96 – 1,23). Пациенты, имеющие одинаковую степень ишемии обеих конечностей не включались в исследование, так как это не позволило бы оценить динамику их ДБХ.

В данной группе пациентов выявлена следующая сопутствующая патология: ишемическая болезнь сердца - 10 (33,3%) пациентов, поражение прецеребральных артерий - 10 (33,3%), артериальная гипертензия - 10 (33,3%), сахарный диабет - 3 (10%), хронические заболевания желудочно-кишечного тракта вне обострения - 6 (20%), хронические заболевания дыхательной системы - 3 (10%) пациента (Рис.13). Мультифокальный атеросклероз установлен у 5 пациентов.

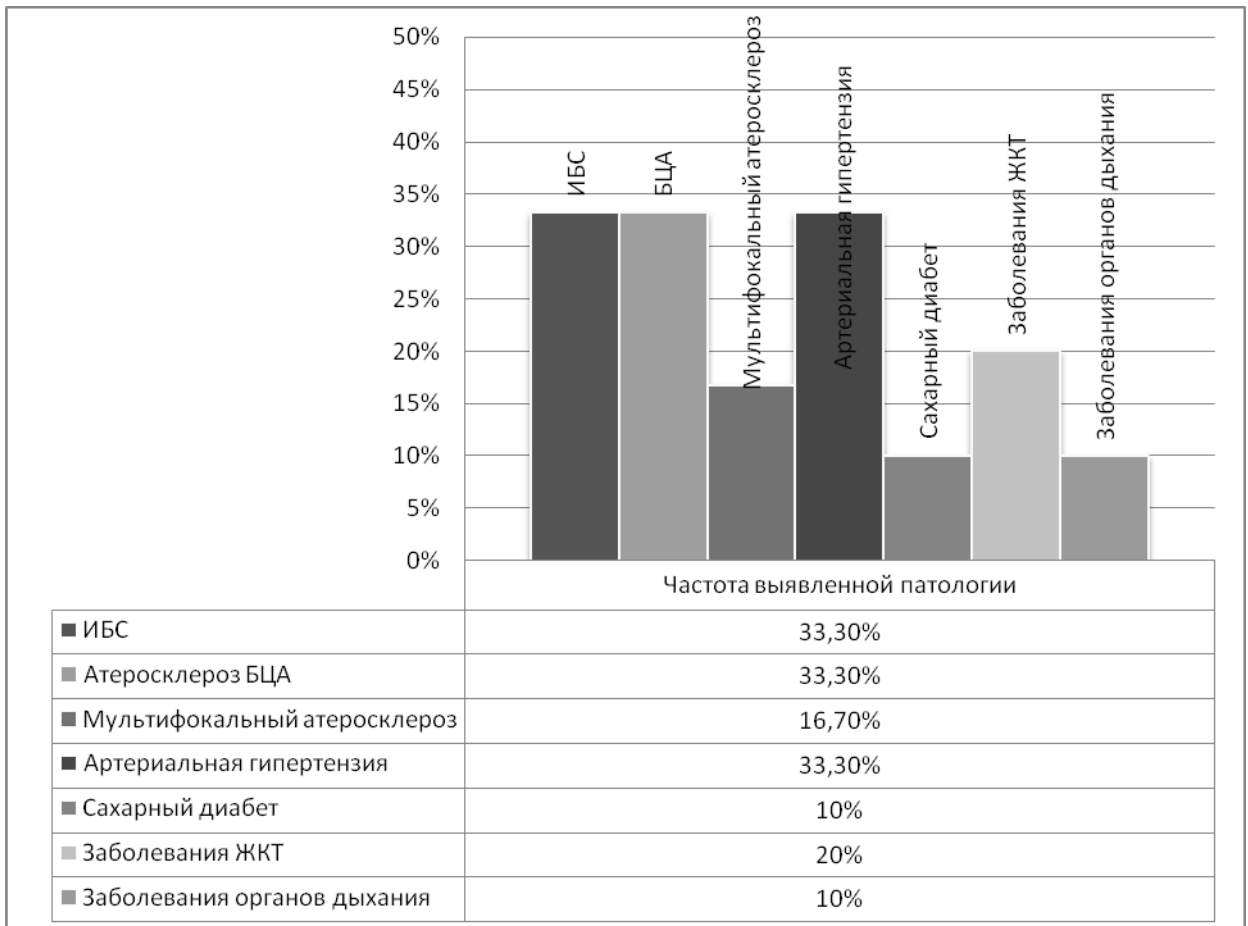


Рис. 13. Частота выявленной сопутствующей патологии в группе пациентов, перенесших аутологичную трансплантацию ГСК

К моменту включения в исследование пациентам проведена коррекция терапии сопутствующей патологии, что исключало её влияние на изучение течения ЗПА, а лабораторные исследования не выявили значимых клинических отклонений.

Все пациенты, включенные в исследование имели ограничения для применения методов прямой реваскуляризации. Ограничения были связаны либо с отказом пациента от хирургического лечения, либо с состоянием дистального русла. У всех пациентов, по данным ангиографии, дистальный анастомоз при возможной инфраингвинальной реконструкции, располагался бы на уровне дистального сегмента подколенной артерии или берцовых артерии, что значительно ухудшает прогноз хирургического лечения. Анализ ангиограмм, включающих в себя оценку состояние путей оттока поражённой конечности по схеме R. Rutherford, установил хорошие пути оттока у 9 пациентов, удовлетворительные у 7 па-

циентов, плохие у 14. Стоит отметить, что все 9 пациентов с «хорошими путями оттока» получили данную оценку при условии локализации анастомоза на уровне берцовых артерий, что обусловлено спецификой классификации R. Rutherford (рис. 14).

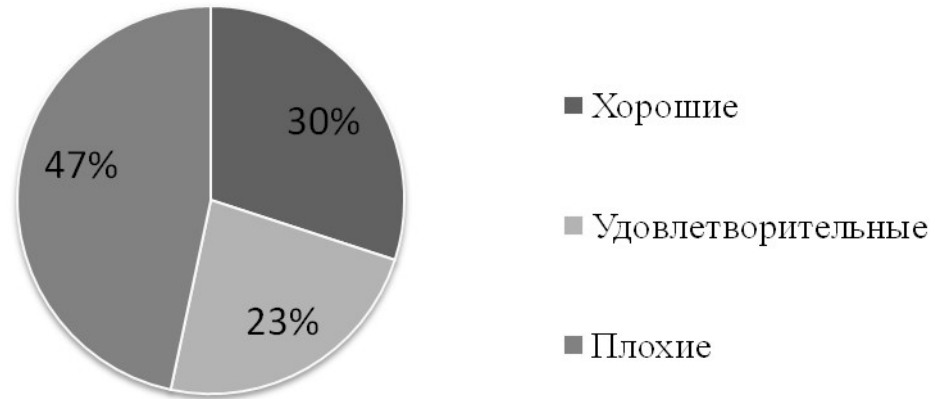


Рис. 14. Распределение пациентов на основании оценки состояния путей оттока по схеме R. Rutherford,

Одним из основных критериев отбора пациентов в исследование являлось наличие у пациента ИБ степени по классификации А.В. Покровского. Стандартными методами объективизации ишемии для определения данной клинической группы являются тредмил-тест и значение ЛПИ. Таким образом, были отобраны пациенты, дистанция безболевого ходьбы которых, по результатам тредмил теста по горизонтальной дорожке со скоростью 3,2 км\ч, составила менее 200 метров. В исследуемой группе из 30 пациентов медиана ДБХ при включении в исследование составила 86,9 (5 – 95 перцентиль: 35,6 – 178,7) метра.

Значение ЛПИ, соответствующее искомой группе ишемии, по данным литературы колеблется от 0,8 до 0,6. При оценке ЛПИ медиана данного значения составила 0,57 (25-75 перцентиль: 0,43-0,73). Однако, выявленные пациенты с ЛПИ в диапазоне от 0,4 до 0,5 клинически не соответствовали III степени ишемии – их ДБХ была более 25 метров, отсутствовали боли покоя или трофические нарушения.

Для стимуляции и мобилизации фракции МПК, обогащенной ГСК, в периферическую кровь нами использован препарат рекомбинантного гранулоцитар-

ного колониестимулирующего фактора Нейпоген®. Применен режим дозирования препарата по схеме производителя, предназначенной для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток крови для аллогенной трансплантации. Исходный уровень лейкоцитоза в периферической крови (медиана) у пациентов был 7940 в мкл. На 5-й сутки стимуляции Нейпогеном медиана лейкоцитов в периферической крови составила 43250 в мкл. Таким образом, в ответ на применение рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в дозе 1 млн.ед./кг./сутки, достигнуто пятикратное увеличение количества лейкоцитов в периферической крови (Рис. 15). При этом с третьих суток и последующее время стимуляции уровень лейкоцитоза значительно не менялся.

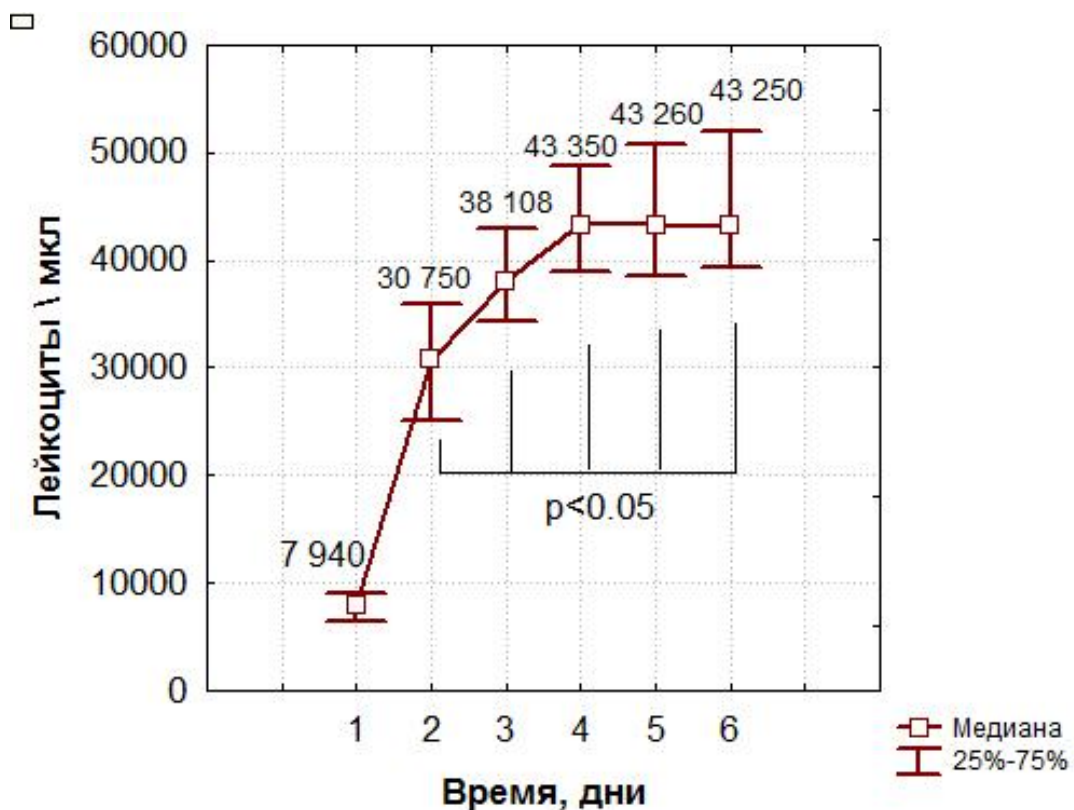


Рис. 15. Индукция лейкоцитоза в периферической крови при стимуляции Нейпогеном®

У трех пациентов с четвертых суток применения препарата Нейпоген® и у четырех на пятые сутки выявлено снижение количества тромбоцитов менее $100 \times 10^9/\text{л}$ с восстановлением нормальных значений при выписке. Один из 30 пациентов отмечал появление болевого синдрома в левом верхнем квадранте живота, 2 пациента миалгию и головную боль – во всех случаях симптомы носили умерен-

ный характер, не требовали применения анальгетиков и купировались самостоятельно после прекращения стимуляции ГСК (таблица 12). Осложнений местного и системного характера на применение препарата нами не зафиксировано. Спустя 2-3 дня после стимуляции количество лейкоцитов в периферической крови у пациентов регрессировало к клинической норме.

Таблица 12

Частота побочных явлений после применения препарата Нейпоген®

Побочное действие		Частота	
		по данным производителя	выявленная в исследовании
Со стороны организма в целом	обострение ревматоидного артрита	<0,01%	0%
Со стороны костно-мышечной системы	слабые или умеренные боли в костях и мышцах	>10%	6,7%
Со стороны дыхательной системы	кровохарканье, инфильтраты в легких	<0,01%	0%
Со стороны нервной системы:	головная боль.	>10%	26,7%
Со стороны иммунной системы	тяжелые аллергические реакции.	<1%	0%
Со стороны системы кроветворения	лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$)	у 41% здоровых доноров,	26,7%
	преходящая тромбоцитопения (менее $100 \times 10^9/\text{л}$)	у 35% здоровых доноров	13,3%
	спленомегалия без клинических проявлений	1-10%	3,3%
	расстройства функции селезенки.	<1%	0%
Со стороны лабораторных показателей	преходящее незначительное повышение активности ЛДГ, ЩФ	1-10%	0%
	незначительное повышение активности АСТ (без клинических последствий), гиперурикемия.	<1%	0%

Выделение фракции МПК, обогащенной ГСК, из периферической крови выполнялась при помощи процедуры лейкафереза на аппарата MSC+ на 6-й день после начала стимуляции Нейпогеном®, на пике лейкоцитоза. Средний объем полученной при лейкаферезе лейкоцитарной массы составил $85,86 \pm 3,49$ мл, ме-

диана мононуклерных клеток в нем $13,7 \times 10^9$ (5-95 перцентиль: $5,07 \times 10^9 - 19,75 \times 10^9$), а жизнеспособных ГСК $47,36 \times 10^6$ (5-95 перцентиль: $19,5 \times 10^6 - 19,4 \times 10^7$). После процедуры лейкафереза половина полученной лейкоцитарной массы подвергалась криоконсервации. Вторая половина вводилась в мышцы пораженной конечности по описанной ранее методике. Подробная характеристика клеточного продукта использованного для аутотрансплантации представлена в таблице 13.

Таблица 13

Состав аутотрансплантата

Параметр	Количество
Средний объем вводимой лейкоцитарной массы	$43,5 \pm 1,6$ мл
Медиана имплантированных мононуклеаров	$6,95 \times 10^9$ (5-95 перцентиль: $3,89 \times 10^9 - 9,87 \times 10^9$)
- из них жизнеспособных имплантированных ГСК	$23,7 \times 10^6$ (5-95 перцентиль: $9,75 \times 10^6 - 97,0 \times 10^6$)
Жизнеспособных клеток в аутотрансплантате (по критерию непроницаемости клеточной мембраны для 7-AAD)	> 98%

Трехчасовую процедуру лейкафереза пациенты переносили хорошо. Осложнений, связанных с пункцией периферических вен и возвратом компонентов крови во время процедуры лейкафереза, нами не зафиксировано.

Сразу поле забора трансплантационного материала пациенты доставлялись в операционную, где выполнялась спинномозговая анестезия, забор биопсии и аутотрансплантация. Инфильтрация задней группы мышц выполнялась в среднем из 8-10 точек, передней из 4-5. Средний объем вводимой фракции МПК составил около 3мл. Осложнений, связанных с анестезиологическим пособием, аутотрансплантацией лейкоцитарной массы и забором биопсии, не было. Инфильтрация передней и задней групп мышц приводила к незначительному болевому синдрому, купирующемуся на 2-3 день. Прочих осложнений при инфильтрации мышц конечности аутотрансплантатом не выявлено.

Все пациенты выписаны из стационара на 3-е сутки после операции. При

выписке рекомендована стандартная терапия основного заболевания согласно Национальным рекомендациям: препараты АСК в дозе 100 мг 1 раз в день, ингибиторы ГМГ-КоАредуктазы (статины) с коррекцией дозы от уровня ЛПНП.

4.2. Отдаленные результаты аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, у пациентов с ЗПА

Число наблюдений за пациентами на разных сроках варьировало (Таблица 14). У одного пациента спустя 3 месяца от начала исследования развилось не фатальное ОНМК, а в одном случае на сроке 6 месяцев на фоне ИБС развилась постоянная форма нарушения ритма сердца и декомпенсация сердечной недостаточности. В том и другом случае развившиеся события не позволили проводить оценку функционального состояния конечности. Ещё у одного пациента на сроке 6 месяцев констатировано ухудшение течения основного заболевания, связанное со стенозированием дистального анастомоза аорто-бедренного шунта. Выполнена реконструкция дистального анастомоза аорто-бифemorального шунта, после чего пациент продолжил участие в исследовании.

В остальных случаях неявка пациентов на определенных исследовании сроках 3, 6 и 12 месяцев обусловлена прочими причинами, не связанными с течением заболевания или проведенной аутотрансплантацией.

Таблица 14

Количество наблюдений после аутотрансплантации МПК

	Срок наблюдения, мес.				
	0	3	6	12	60
Количество очных наблюдений, n	30	28	26	24	12
Количество заочных наблюдений, n	-	-	-	-	12
Всего	30	28	26	24	24

На сроке 5 лет катамнез заболевания изучен у 24 пациентов. Из них двенадцати пациентам проведены очные осмотры и функциональные исследования, а

сведения о других получены заочно.

Из 12-ти исследованных заочно пациентов 5 умерло, остальные 7 ответили на вопросы по телефону или по почте при помощи анкеты. Установлено, что два пациента перенесли ампутацию контралатеральной конечности по поводу развившейся критической ишемии. Причиной смерти у пяти пациентов явились: ОНМК - 2 пациента (36 мес., 42 мес. наблюдения соответственно), сердечная патология – 2 (48 мес., 56 мес. соответственно), рак легкого - 1 случай (50 мес.). Таким образом, выживаемость пациентов на сроке 3 года составила 95,8%, на сроке 5 лет – 79,2% (Рис. 16). У всех обследованных и респондированных пациентов конечности, в которые производилась аутотрансплантация фракции МПК, обогащенной ГСК, были сохранены.

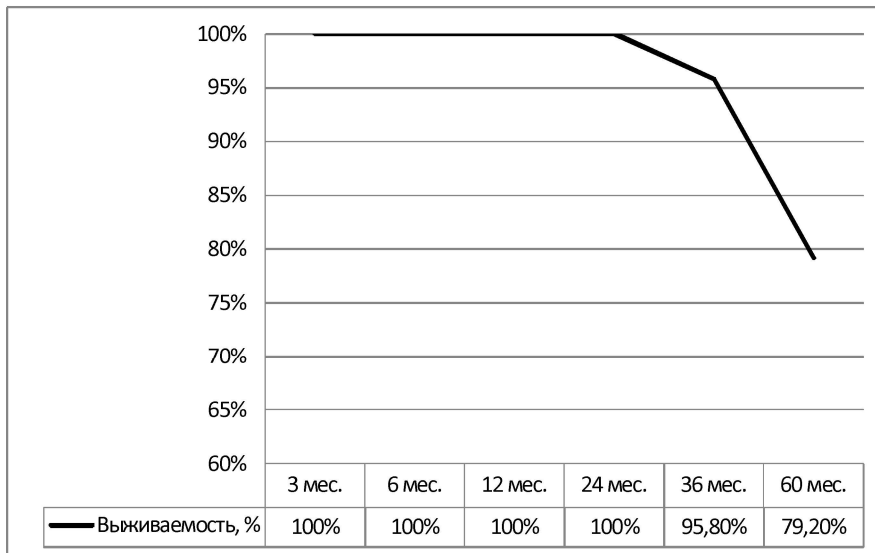


Рис. 16. Выживаемость в группе пациентов после аутотрансплантации МПК.

Двадцать семь из тридцати пациентов уже через 2-3 недели корреспондировали о субъективном улучшении, выражающемся в увеличении дистанции или исчезновении ограничения безболевого ходьбы в привычном для себя темпе. Положительные изменения, отмеченные пациентами, были зафиксированы при помощи функциональных проб. При этом у подавляюще части обследованных положительные изменения за весь период наблюдения имели стабильный и прогрессирующий характер.

Измерение ЛПИ в покое зафиксировало достоверный рост значений данно-

го показателя за первый год наблюдения после аутотрансплантации МПК (таблица 15). Медиана значений ЛПИ на сроке 3 месяца ставила 0,67 (25 – 75 перцентиль: 0,445 – 0,786, $p=0,0001$) при исходном значении 0,57 (25 – 75 перцентиль: 0,435– 0,725). Максимальное значение медиана ЛПИ достигла 6 месяцев 0,7 (25 – 75 перцентиль: 0,57– 0,81, $p=0,0002$) с последующей тенденцией к снижению на сроке 12 месяцев до 0,67 (25 – 75 перцентиль: 0,585– 0,79, $p=0,0003$) и регрессом практически до исходного к 5 годам наблюдения - 0,59 (25 – 75 перцентиль: 0,51– 0,79, $p=0,334$). Таким образом, на сроке 3 месяца выявлен прирост значения ЛПИ на 17,5% и на 22,8% через полгода наблюдения (рис. 17).

Таблица 15

Медиана значений ЛПИ на различных сроках наблюдения

Срок наблюдения, мес.	Медиана	25 перцентиль	75 перцентиль	p
0	0,57	0,435	0,725	
3	0,67	0,445	0,786	0,0001
6	0,70	0,570	0,810	0,0002
12	0,67	0,585	0,790	0,0003
60	0,59	0,510	0,790	0,334

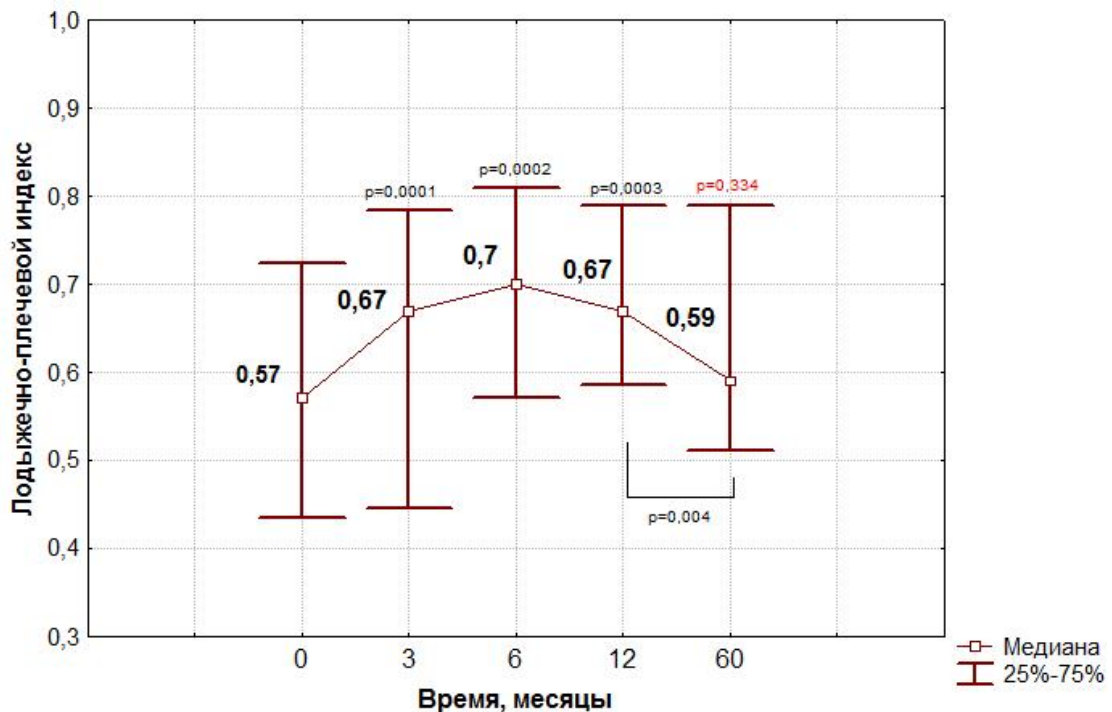


Рис.17. Динамика изменения лодыжечно-плечевого индекса.

При оценке динамики ЛПИ на «здоровой» контралатеральной конечности существенной динамики в течение 12 месяцев наблюдения не выявлено (таблица

16, рис. 18). Однако на сроке 60 месяцев отмечено достоверное ухудшение данного показателя на 15,2% с 1,105 (25 – 75 перцентиль: 0,96– 1,225) до 0,9375 (25 – 75 перцентиль: 0,69– 1,15), $p < 0,05$.

Таблица 16

Медиана значений ЛПИ на контралатеральной конечности

Срок наблюдения, мес.	Медиана	25 перцентиль	75 перцентиль	p
0	1,1050	0,9600	1,2250	
3	1,0600	0,9750	1,1850	<0,05
6	1,0550	0,9800	1,1950	<0,05
12	1,1350	1,0350	1,2450	<0,05
60	0,9375	0,6900	1,1500	<0,05

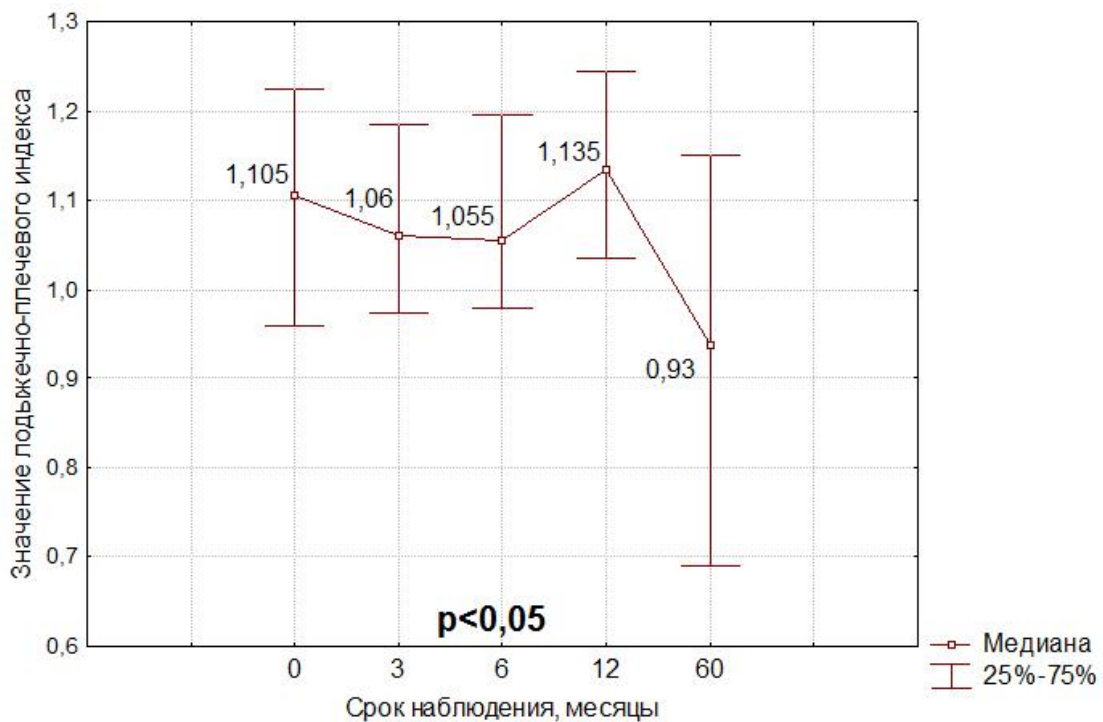


Рис. 18. Динамика значений ЛПИ на контралатеральной конечности.

Дистанция безболевого ходьбы достоверно увеличивалась весь срок исследования, несмотря на прогрессивное ухудшение значения ЛПИ с 12-го месяца наблюдения. ДБХ на сроке 3 месяца возросла на 42,2% с 86,9 до 123,6 метров ($p=0,0007$), на сроке 6 месяцев на 56,3% от исходной - 135,6 метров ($p=0,003$). Через год наблюдения ДБХ значительно не отличалась от полугодового показателя и составила 137,8 метров (плюс 58,6% от исходной) ($p=0,028$). Однако, уже на сроке 3 месяца и в дальнейшем выявлены пациенты, которые полностью вы-

полняли тредмил-тест, т.е. проходили дистанцию более 200 метров и, таким образом, переходили во IIА степень ишемии (по классификации Покровского А.В.). На сроке наблюдения 5 лет тредмил-тест проведен 12 пациентам. Все пациенты, кроме одного, полностью выполнили тест. Медина значений представлена в таблице 17 и на рис.19.

Таблица 17

Медина значений дистанции безболевого ходьбы
по результатам тредмил-теста

Срок наблюдения, мес.	Медина, Метры	5 перцентиль	95 перцентиль	p
0	86,8889	35,5556	178,6667	
3	123,5556	69,3333	200,0000	0,0007
6	135,5556	66,6667	200,0000	0,003
12	137,7778	48,8889	200,0000	0,028
60	200,0000	123,5556	200,0000	0,01

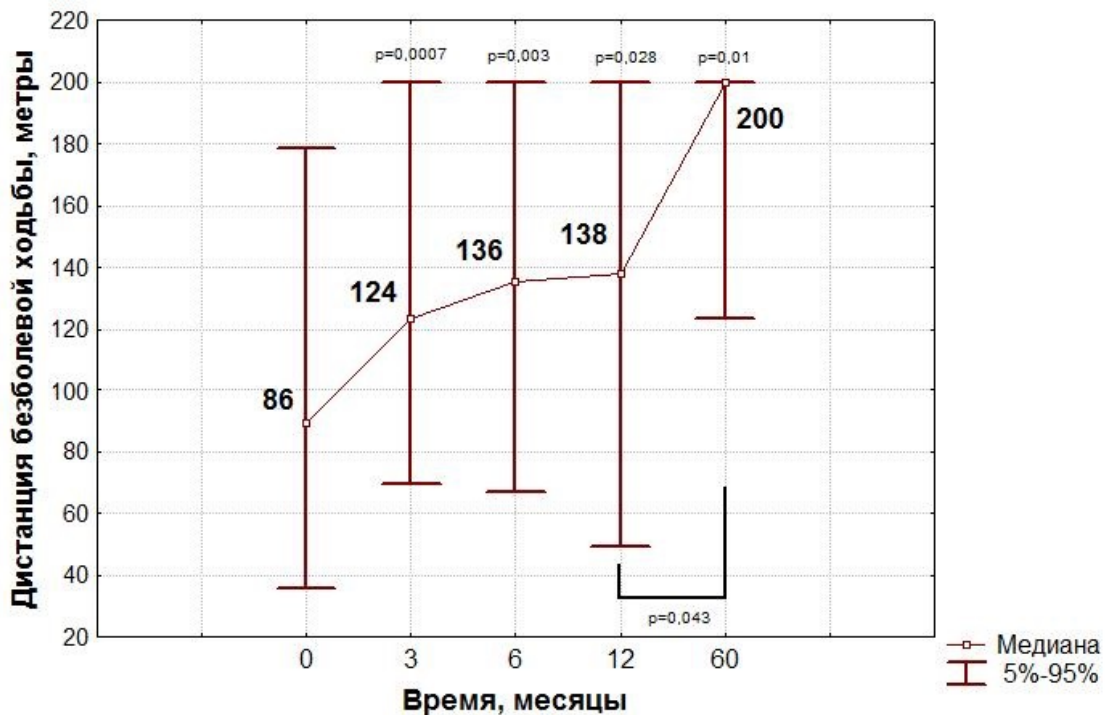


Рис.19. Динамика дистанции безболевого ходьбы по результатам тредмил-теста.

При опросе большинство пациентов корреспондировали прогрессивное увеличение дистанции ходьбы в привычном для себя темпе, что согласуется с данными тредмил-теста. Если к 12 месяцам наблюдения около трети пациентов

не испытывали проблем в преодолении дистанции 200 метров, то к 5 годам 14 из 19 пациентов констатировали отсутствие ограничения дистанции ходьбы (Рис. 20).

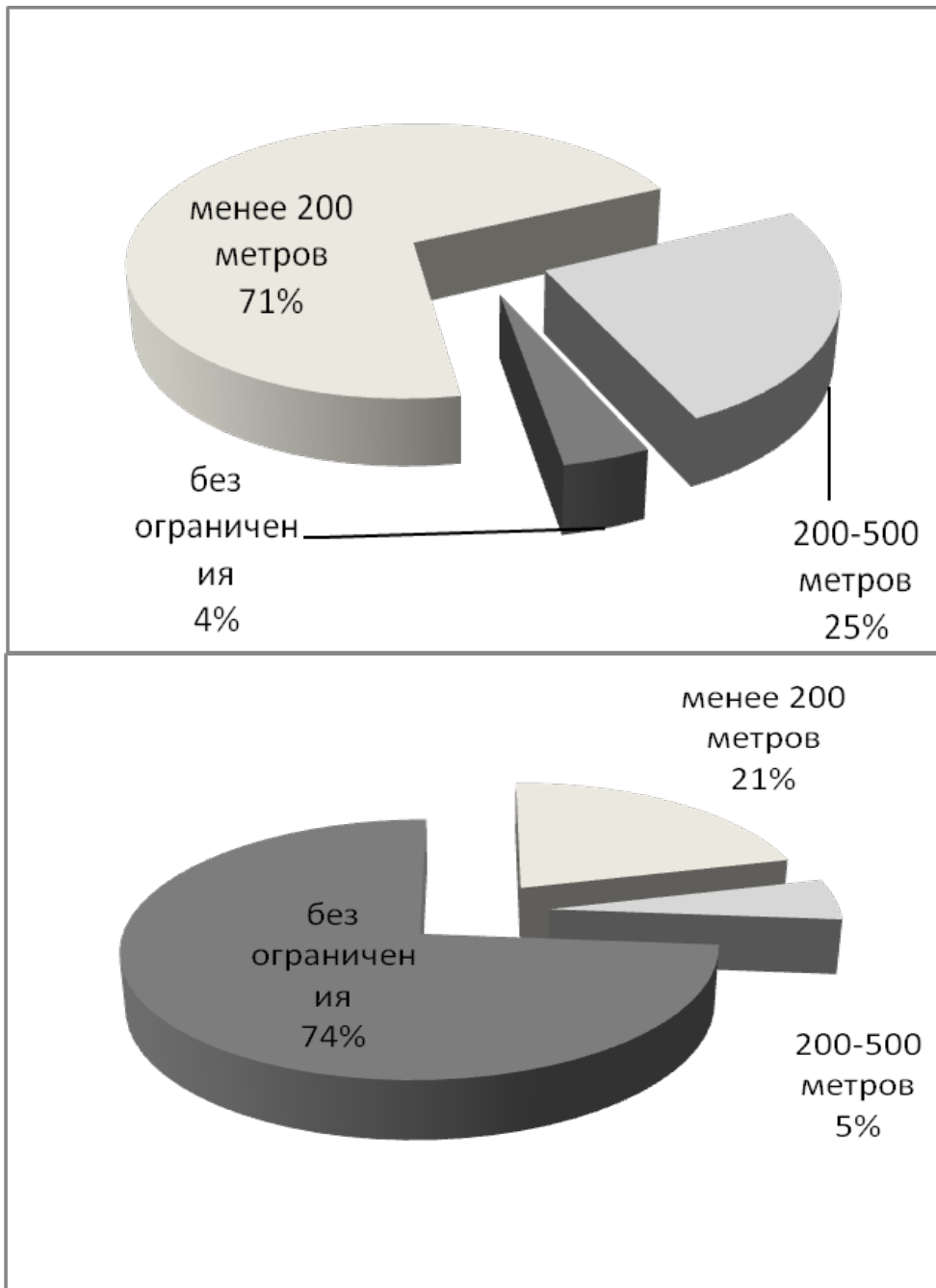


Рис. 20. Дистанция безболевого ходьбы по результатам опроса пациентов на сроке 12 месяцев (верхний) и 5 лет (нижний).

Измерение времени восстановления исходного ЛПИ после выполнения нагрузочного теста также отражает некоторую положительную динамику функционального состояния конечности в течение первого года наблюдения (таблица 18).

Таблица 18

Медиана значений времени восстановления исходного ЛПИ
после выполнения тредмил-теста

Срок наблюдения, мес.	Медиана, сек.	25 перцентиль	75 перцентиль	p
0	540,0000	450,0000	800,0000	
3	480,0000	360,0000	570,0000	0,01
6	540,0000	424,0000	600,0000	0,235
12	540,0000	410,33333	690,0000	0,379
60	231,0000	0,0000	312,0000	0,007

На сроке 5 лет значения этого показателя значительно улучшились и составили чуть более 6 минут (Рис. 21).

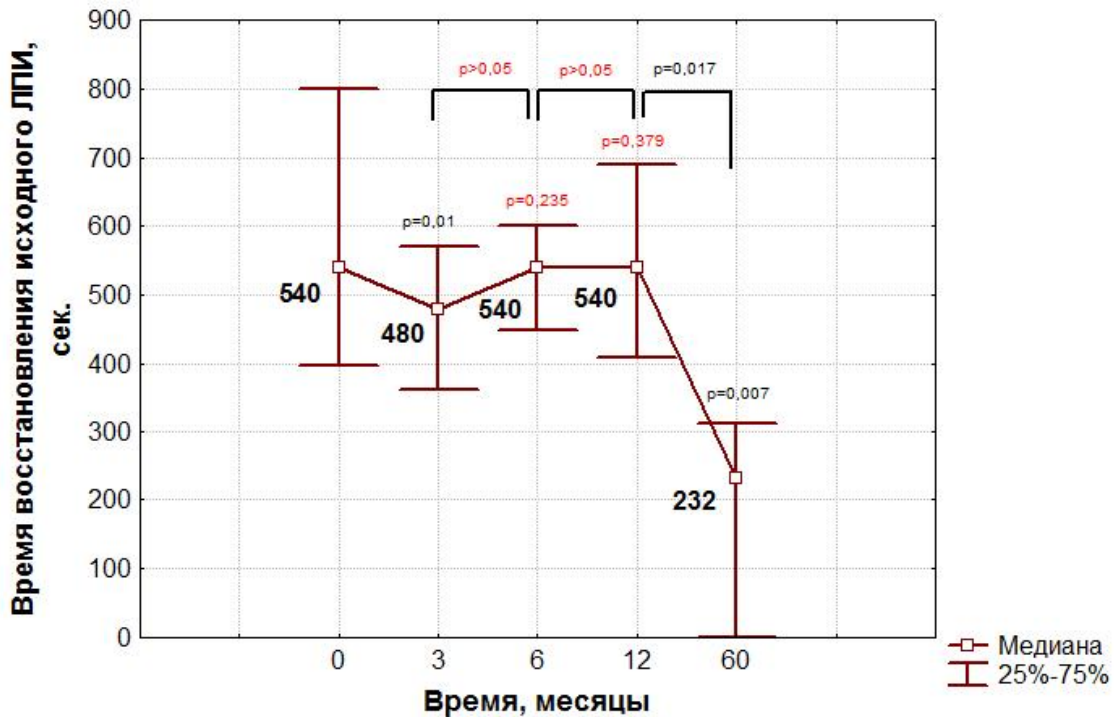


Рис. 21. Динамика показателя «время восстановления ЛПИ» после выполнения тредмил-теста.

При анализе времени восстановления по методике И.И.Затевахина исходно все пациенты составляли так называемую группу «критического резерва», то есть их дистанция ходьбы была менее 200 метров, и время восстановления исходного ЛПИ не превышало 15,5 минут. В дальнейшем, на сроке 3, 6 и 12 месяцев отмечено поступательное перераспределение пациентов из группы с «крити-

ческим» в группу с «ограниченным резервом» ходьбы. На сроке 5 лет пациенты, как уже было описано ранее, не испытывали проблем в выполнении тредмил-теста, а значения восстановления исходного ЛПИ свидетельствовали об отсутствии функционального затруднения в его выполнении. Распределение пациентов по группам резерва ходьбы представлено на рис. 22.

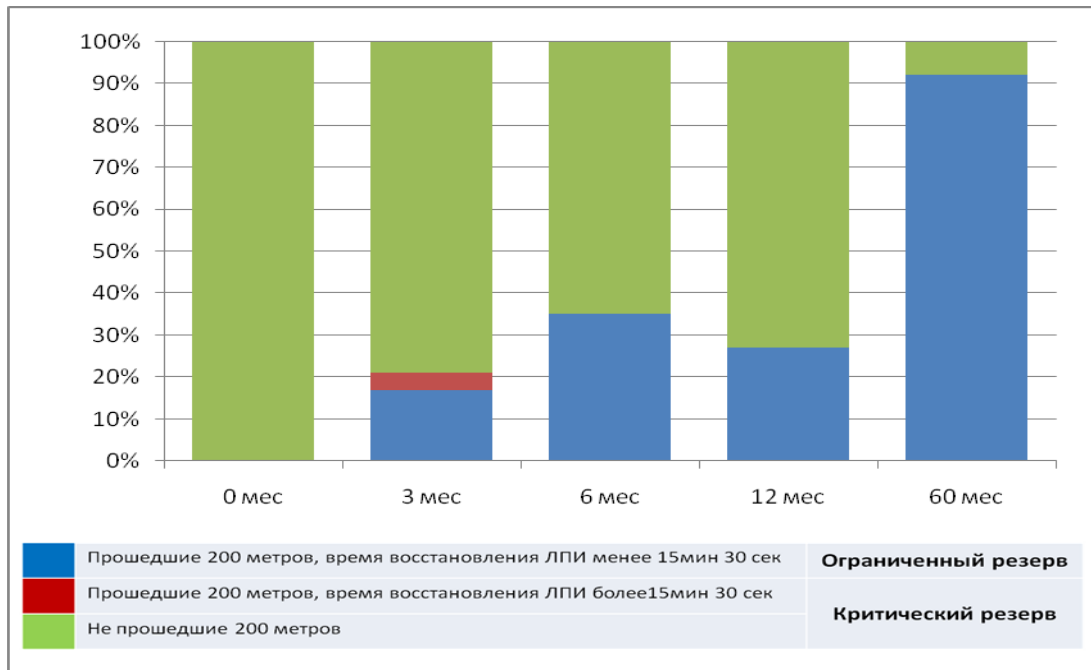


Рис. 22. Распределение пациентов по группам резерва ходьбы.

Оценка изменений в клиническом статусе по R. Rutherford на сроке 3 месяца выявила отсутствие улучшения у 1 пациента (+0 по R. Rutherford), минимальное улучшение (+1 по R. Rutherford) у 14 пациентов (50% от исследуемых), умеренное улучшение (+2 по R. Rutherford) – 12 пациентов (42,8%), значительное улучшение (+3 по R. Rutherford) у одного пациента (3,5%). На сроке 6 и 12 месяцев группа с умеренным улучшением (+2 по R. Rutherford) возросла до 53,8% и 70,8% соответственно. Количество пациентов со значительным улучшением (+3 по R. Rutherford) с 6 месяцев наблюдения не увеличивалось - 2 пациента. У двух пациентов не отмечено улучшения, в связи с чем, им была выполнена повторная имплантация МПК, восстановленных из криохраниения. У одного пациента на сроке 60 месяцев отмечен регресс положительного эффекта аутотрансплантации до исходной симптоматики. Ухудшения клинического статуса после аутотрансплантации МПК нами не зафиксировано (таблица 19 и рис.23). В единичном слу-

чае хирургической коррекции аорто-бедренного шунта, по поводу развившегося стеноза дистального анастомоза, пациент продолжил наблюдение и не имел в последующем отрицательной динамики.

Таблица 19

Изменение клинического статуса согласно шкале R. Rutherford

Клинический статус R. Rutherford	Срок наблюдения, месяцы			
	3	6	12	60
Отсутствуют (+0)	1	2	2	1
Минимальное (+1)	14	8	3	-
Умеренное (+2)	12	14	17	10
Значительное (+3)	1	2	2	1
Всего	28	26	24	12

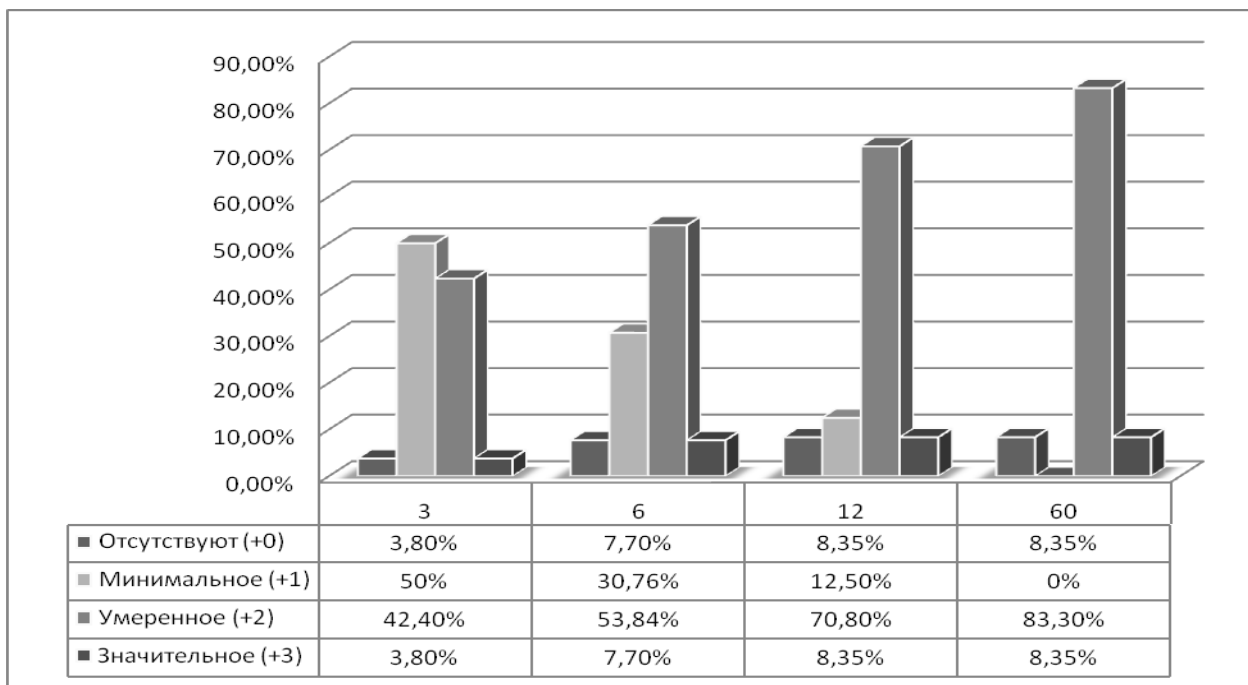


Рис. 23. График изменения клинического статуса согласно шкале R. Rutherford.

Дистальная ангиография выполнена всем 28 пациентам, исследованным на сроке 3 месяца. Осложнений местного или системного характера при выполнении ангиографии нами не зафиксировано. При оценке по методике Vajanto I. медиана количества коллатералей достоверно увеличилась на 44,8% с 7,25 (25 – 75 перцентиль: 4,125– 8,725) до 10,5 (25 – 75 перцентиль: 8,175– 13,125) ($p < 0,05$) (Рис.24).

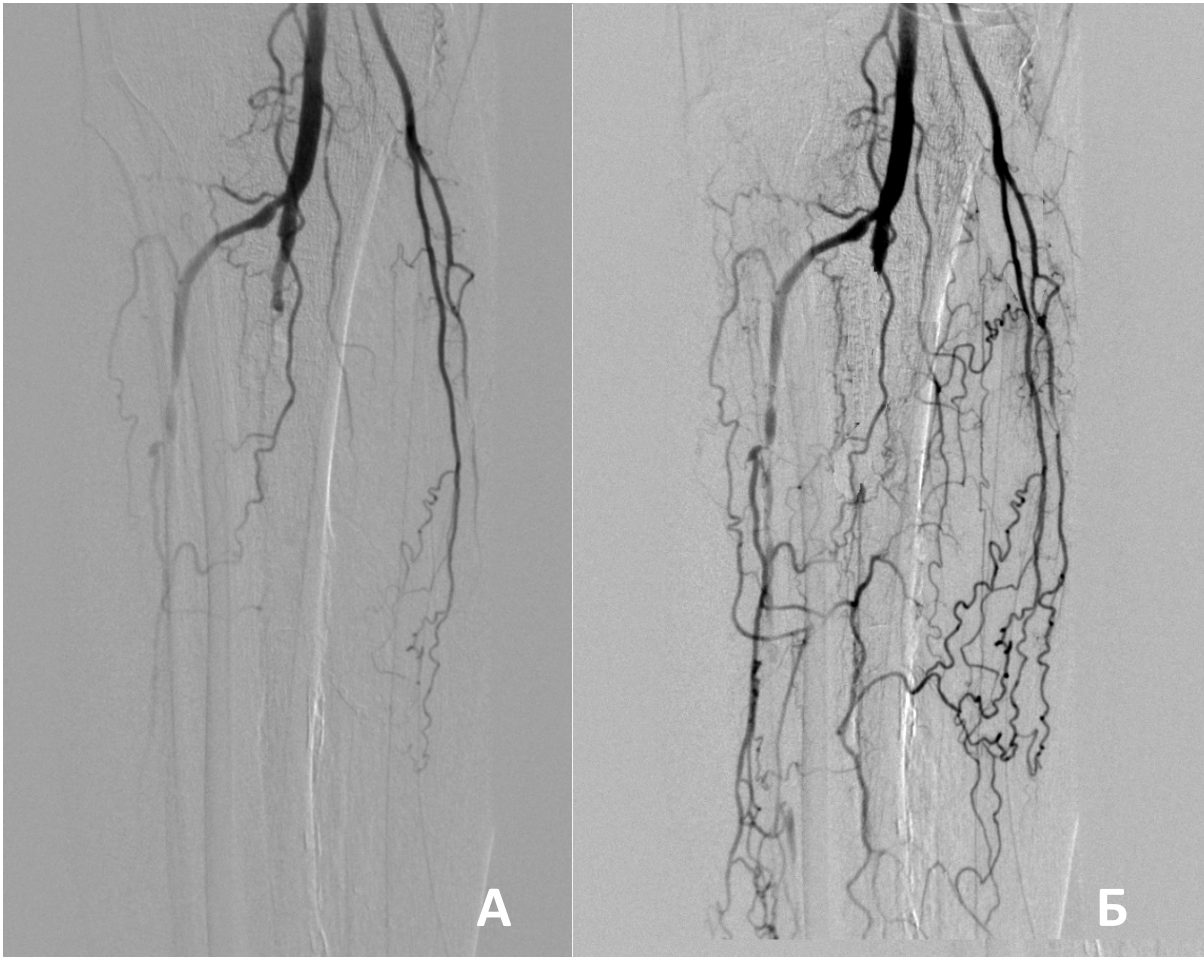


Рис. 24. Ангиография артерий голени пациента до аутотрансплантации фракции МПК, обогащенной ГСК (А) и спустя 12 недель (Б).

Кроме того примерно у трети пациентов отмечено появления контрастирования дистальных сегментов берцовых артерий, имеющие в том числе сообщение с артериальной дугой стопы, отсутствующие на первичных снимках (Рис.25). По всей видимости, это связано с ростом коллатерального кровоснабжения. При оценке повторных ангиографий хорошие пути оттока установлены 14 (было 9) пациентов, удовлетворительные у 5 (было 7) пациентов, плохие у 9 (было 14) (Рис 26). Однако, как уже отмечалось ранее, данный факт обусловлен спецификой классификации R. Rutherford, где «хорошие пути оттока» получают пациенты при условии локализации анастомоза на уровне берцовых артерий. Таким образом, производить оценку результатов по стимуляции ангиогенеза на основании оценки состояния путей оттока (R. Rutherford) считаем некорректной.

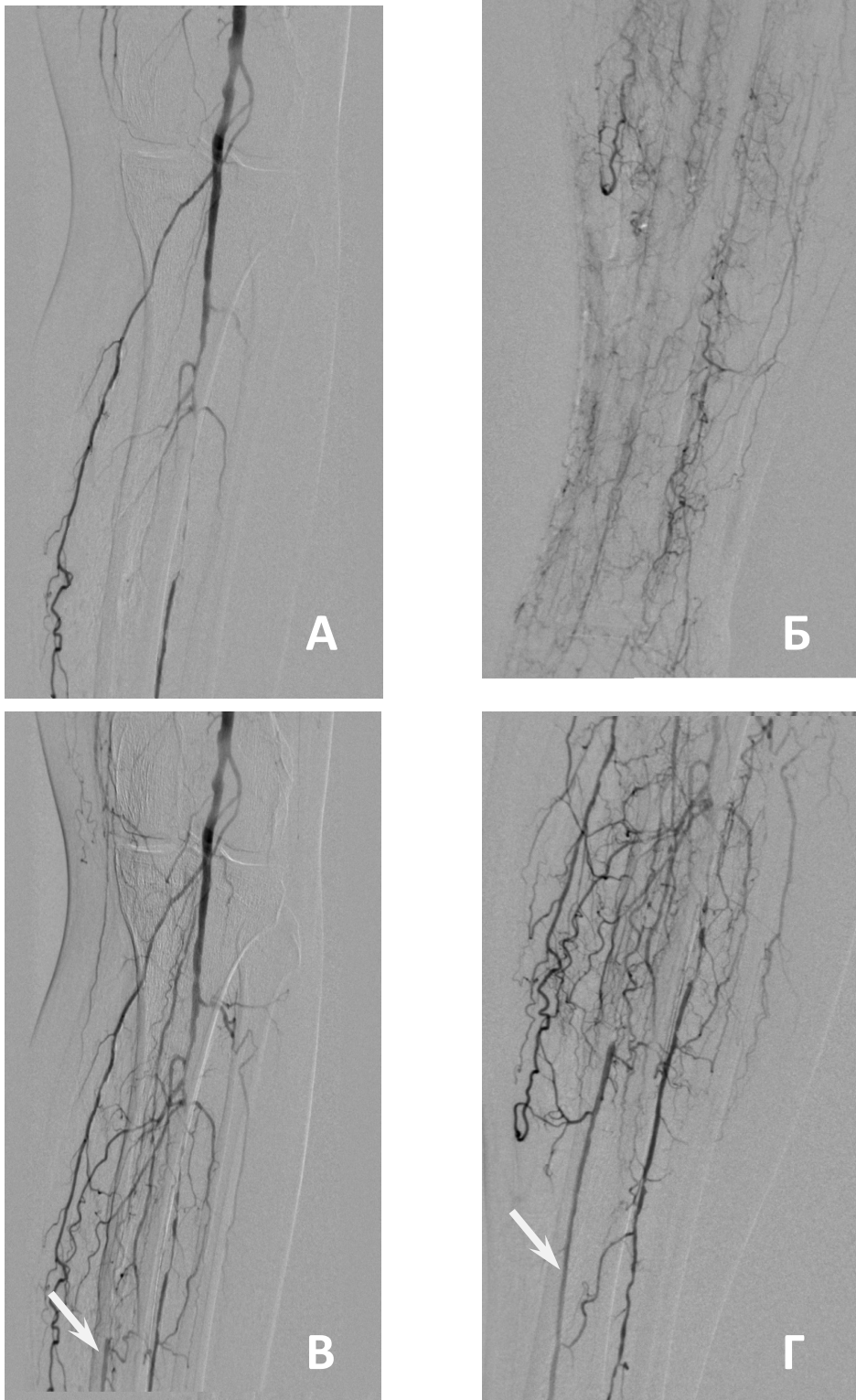


Рис.25. Ангиография артерий голени пациента до аутотрансплантации фракции МПК (А и Б) и спустя 12 недель (Б и В). Стрелкой отмечена задняя большеберцовая артерия, отсутствовавшая на снимках до аутотрансплантации ГСК.

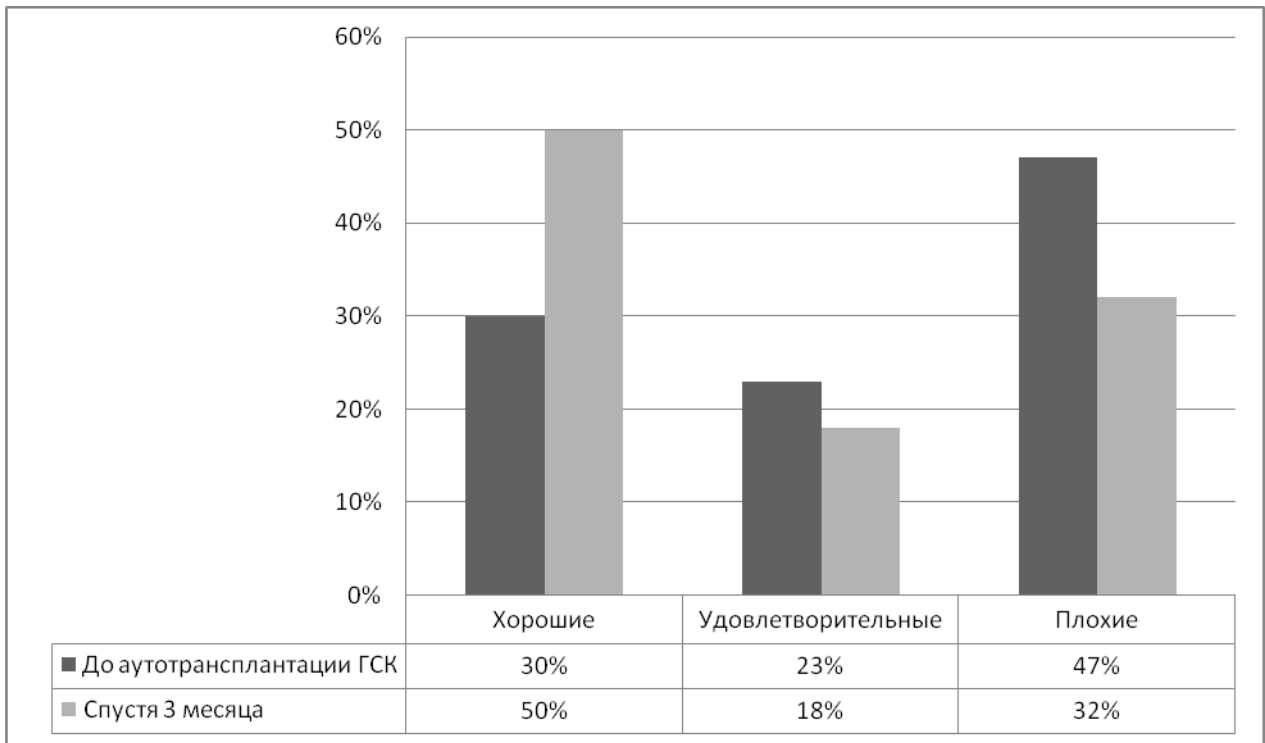


Рис.26. Динамика распределение пациентов на основании оценки состояния путей оттока по схеме R. Rutherford

По результатам иммуногистохимического окрашивания на предварительном этапе работы нами был выбран маркер эндотелия, наиболее подходящий для визуализации капилляров на парафиновых срезах мышечной ткани. По данным окрашивания срезов биопсий на эндотелиальные маркеры (CD31, CD34, vWF) было установлено, что экспрессия CD31 и vWF представлена в эндотелии крупных сосудов и отдельных капилляров и, в целом, очень вариабельна. Окрашивание антителами к CD34 было стабильным и позволяло выявить как все капилляры, так и крупные сосуды. Поэтому плотность капиллярной сети оценивали по экспрессии CD34 (рис. 27).

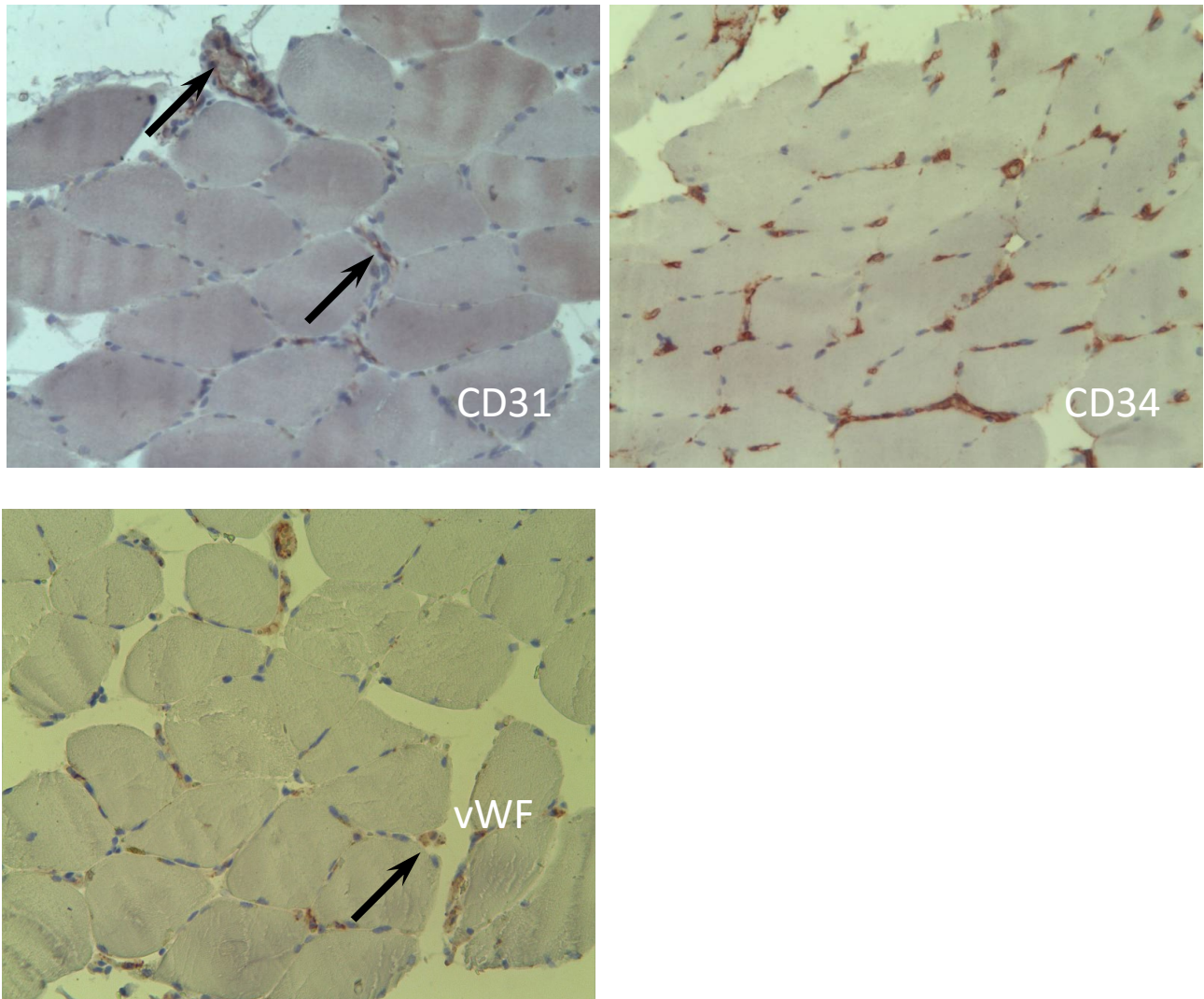


Рис. 27. Иммуногистохимическое окрашивание биопсии больного М. на эндотелиальные маркеры (CD31, CD34, vWF), увеличение $\times 200$. CD31-позитивное окрашивание выявляется в крупных сосудах (указаны стрелками), vWF – в крупных сосудах и единичных капиллярах, CD34 – в сосудах и капиллярах. Эндотелий капилляров и сосудов – красное окрашивание, ядра – синее.

Иммуногистохимический анализ биоптатов выявил увеличение плотности капиллярной сети на сроке 3 месяца на 22,4% (индекс К/М - соотношение «капилляры/мышечное волокно» возрастает после аутотрансплантации МПК с 1,52 до 1,86; $p = 0,0005$) (рис. 28 и 29).

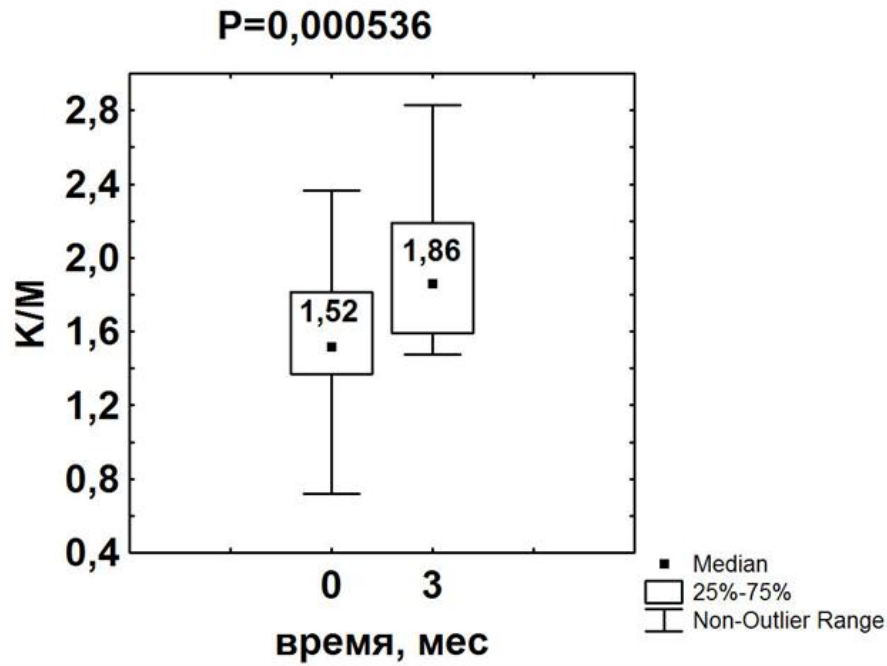


Рис. 28. Подсчет количества капилляров и мышечных волокон на срезах биопсий до и через 3 месяца после введения фракции МПК, окрашенных с антителами к CD34.

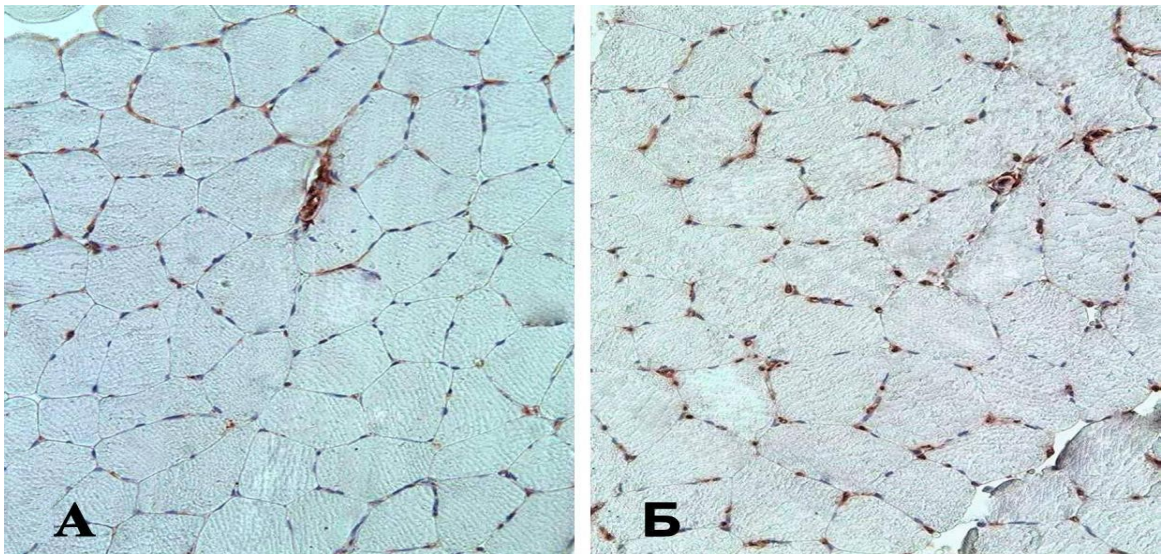


Рис. 29. Биопсия пациента до (А) и через 12 недель после (Б) аутотрансплантации фракции МПК увеличение x200.

При регрессионном анализе переменных обнаружена положительная достоверная корреляция средней силы между числом трансплантированных ГСК, содержащихся во фракции трансплантированных МПК, и индексом К/М, и получена модель, задаваемая следующим уравнением: $K/M = 1 / (2,20363 - 0,0973314 * \ln(\text{ГСК}))$ (Рис. 30).

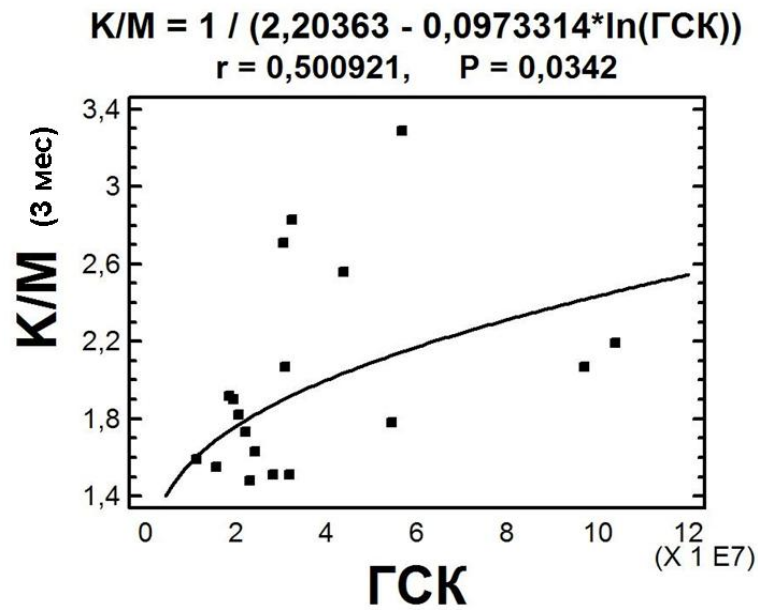


Рис. 30. Статистическая модель зависимости плотности капиллярной сети мышечной ткани от абсолютного числа трансплантированных ГСК.

Корреляционный анализ, выполненный методами непараметрической статистики (вычисление коэффициента Спирмена), установил ряд значимых корреляций между переменными (таблица 20). Как уже указано выше, установлена положительная достоверная корреляция средней силы между числом ГСК в ауто-трансплантате и количеством вновь образованных сосудов, выявленных в биоптатах мышцы через 3 месяца. Также обращает на себя внимание менее удовлетворительный результат стимуляции лейкопоэза у пациентов с худшим состоянием коллатерального кровоснабжения.

Таблица 20

Результаты непараметрического корреляционного анализа

Переменные	Коэффициент Спирмена	p
$K/M_{(3 \text{ мес})}$ vs $\text{ГСК}_{(\text{абс. число в трансплантате})}$	0,524523	0,025434
$\text{ЛПИ}_{(3 \text{ мес})}$ vs $\text{время восстановления}_{(3 \text{ мес})}$	-0,518615	0,009419
$\text{Лейкоцитарный индекс стимуляции}_{(0 \text{ мес})}^*$ vs $\text{время восстановления}_{(0 \text{ мес})}$	-0,484758	0,030294

* отношение числа лейкоцитов/мкл крови после курса Нейпогена к исходному уровню.

Приводим клинические примеры.

Пример 1. Пациент Н., 55 лет, поступил в отделение сосудистой хирургии 16.02.2009 г. с диагнозом: Атеросклероз. Стеноз подключичных артерий с обеих сторон до 40%, внутренней сонной артерии слева 35%, устьев позвоночных артерий до 50%. Хроническая недостаточность мозгового кровообращения 1 степени. С-м Лериша. Окклюзия подвздошной артерии справа, критический стеноз слева. Окклюзия поверхностных бедренных артерий с обеих сторон, подколенной и берцовых артерий слева. Бифуркационное аорто-бедренное аллошунтирование, бедренно-проксимально-подколенное шунтирования слева от 25.02.2008 г. Окклюзия бедренно-подколенного шунта слева. ХАН левой нижней конечности 2Б ст.

При поступлении жалобы на боли в икроножной мышце левой нижней конечности при ходьбе через 30-50 метров, на зябкость и парестезии в левой стопе и голени. В анамнезе бифуркационное аорто-бедренное аллошунтирование и, в виду наличия трофических нарушений в виде ишемической язвы 1 пальца левой стопы, бедренно-проксимально-подколенное аллошунтирование. Достигнуто купирование КИНК, заживление трофического дефекта. Спустя 9 месяцев после операции отметил значительное снижение ДБХ в левой нижней конечности. 9.02.2009 г. госпитализирован, проведена ангиография: окклюзия бедренно-подколенного шунта, подколенной артерии и артерий голени. Стоит отметить, что подколенная артерия и артерии голени до реконструктивных операций были проходимы.

В виду дистального характера поражения артериального русла повторная реконструктивная операция была невозможна. Пациенту предложено применение методики аутологичной трансплантации фракции МПК, обогащенной ГСК, в мышцы левой нижней конечности. Согласие пациента получено.

При поступлении в отделение: ОАК от 10.02.2009 г: $E_r 3,85 \times 10^{12} \text{ \textbackslash л}$, $H_b 132 \text{ г\textbackslash л}$, $Tr 210 \times 10^9 \text{ \textbackslash л}$, $Le 8,1 \times 10^9 \text{ \textbackslash л}$ (лекоформула: б-2%, э-1%, с\я-42%, лимфоциты 38% моноциты-4%) СОЭ 6 мм\ч, сахар крови 4,3 ммоль\л. Коагулограмма: от 10.02.2009 г: ПТИ 94%, Фибриноген А 2,1 г\л, АПТВ 45 сек. Биохимический

анализ крови от 10.02.2009г: общий белок 72 г\л, мочевины 5,6 ммоль\л, креатинин 98 ммоль\л, билирубин общий 4,2 мкмоль\л, АЛТ бед\л, АСТ 11 ед\л. Общий анализ мочи от 10.02.2009 г: цвет соломенно-желтый, удельный вес 1012, прозрачная, белок и сахар отрицательны, эпителий плоский 0-1 в п\з, лейкоциты 1-2 в п\з. Группа крови А2(II) Rh+(положительная). ЭКГ: Синусовый ритм 85 в 1; вертикальное положение ЭОС; СП в норме. Флюорография от 24.10.2008 г: в легких без патологии. ФГДС от 11.02.2009 г.: Эрозивный рефлюкс-эзофагит. ГПОД 1-2 ст. Состояние после резекции желудка по Б-2. Анастомозит. УЗИ органов брюшной полости: патологии не выявлено.

11.02.2009 г. пациенту начаты инъекции Нейпогена в дозе 1 млн.ед. на килограмм массы тела (вес пациента 62 кг, 60 млн. Ед. в сутки). Ежесуточный мониторинг лейкоцитоза: второй день стимуляции - $40,7 \times 10^9$ \л, на третий - $47,0 \times 10^9$ \л, четвертый - $56,6 \times 10^9$ \л, пятый - $59,0 \times 10^9$ \л, в день аутотрансплантации - $55,3 \times 10^9$ \л. На третьи сутки пациент отметил боли в мышцах поясничной области, конечностях, слабой интенсивности. От применения анальгетиков воздержался.

16.02.2009 г. пациенту проведен 3-х часовой сеанс лейкофереза, получено 88 мл аутотрансплантата. Половина трансплантата отобрана для криоконсервирования и анализа клеточного состава. Количество МПК в аутотрансплантате составило $8,79 \times 10^9$, из них жизнеспособных ГСК $54,38 \times 10^6$. В операционной под спинномозговой анестезией выполнен забор фрагмента икроножной мышцы и инфильтрация передней (4 точки) и задней (10 точек) групп мышц левой голени аутотрансплантатом в количестве 44 мл в равноудаленных точках примерно по 3мл. 19.02.2009 г. - пациент в удовлетворительном состоянии был выписан. Лейкоцитоз при выписке составляло $10,7 \times 10^9$ \л.

Результаты функциональных проб пациента Н.: Тредмил тест ДБХ исходно 41 м, на сроке 3 месяца 76 метров, 6 месяцев - 124 метра, 12 месяцев - 150 метров. Время восстановления исходного ЛПИ исходно 16 мин. 00 сек., на сроке 3 месяца 10 минут 00 сек. метров, 6 месяцев - 9 мин. 56 сек., 12 месяцев - 9 мин. 20 сек. Значения ЛПИ исходно 0,34, на сроке 3 месяца 0,4, 6 месяцев - 0,43, 12

месяцев 0,6.

На сроке 48 месяцев у пациента развилась острая ишемия правой конечности с развитием необратимых изменений, в связи с чем, была выполнена ампутация на уровне средней трети бедра. На сроке 60 месяцев пациент заочно анкетирован, конечность сохранена и без признаков ишемии.

Пример 2. Пациент С., 61 год, поступил в отделение сосудистой хирургии 10.09.2009 г. с жалобами на боли в икроножной мышце левой нижней конечности при ходьбе через 50 метров. В анамнезе бедренно-подколенное шунтирование на правой нижней конечности (шунт проходим). Выполнена ангиография, установлен диагноз: Атеросклероз С-м Такаюсу. Оклюзия ВСА справа. ХСМН 1 ст. Облитерирующий атеросклероз нижних конечностей. Оклюзия ПБА, ЗБА и МБА справа. БПШ справа (ноябрь 2008г). Оклюзия подколенной и берцовых артерий левой н\к. ХАН левой нижней конечности 2Б ст. Пациент осмотрен терапевтом: Артериальная гипертензия 3 стадии. Гипертрофия левого желудочка. ОНМК 1996г. Риск 4. Дислипидемия.

С учетом данных ангиографии операция по прямой реваскуляризации на левой нижней конечности была невозможна. Пациенту предложено применение методики аутологичной трансплантации фракции МПК, обогащенной ГСК, в мышцы левой нижней конечности. Согласие пациента получено.

При поступлении в отделение: ОАК от 11.09.2009 г: E_r $4,03 \times 10^{12}$ /л, H_b 145 г/л, T_r 320×10^9 /л, Le $5,2 \times 10^9$ /л (лейкоформула: б-1%, э-1%, с\я-48%, лимфоциты 32% моноциты-3%) СОЭ 4 мм\ч, сахар крови 5,2 ммоль\л. Коагулограмма: от 11.09.2009 г: ПТИ 86%, Фибриноген А 3,2 г\л, АПТВ 2мин 25сек. Биохимический анализ крови от 11.09.2009 г: общий белок 69 г\л, мочевины 6,0 ммоль\л, креатинин 78 ммоль\л, билирубин общий 3,0 мкмоль\л, АЛТ 12ед\л, АСТ 12 ед\л. Общий анализ мочи от 11.09.2009 г: цвет соломенно-желтый, удельный вес 1008, прозрачная, белок и сахар отрицательны, элементы не обнаружены. Группа крови АВ(IV) Rh+(положительная). ЭКГ: Синусовый ритм 85 в 1; горизонтальное положение ЭОС; в грудных отведениях $R_{V6} > R_{V5} > R_{V4}$. Флюорография от 3.04.2009 г.: в легких без патологии. ФГДС от 14.09.09: Хронический гастродуо-

денит, вне обострения.

16.09.2009 г. - пациенту начаты инъекции Нейпогена в дозе 1 млн.ед. на килограмм массы тела (вес пациента 74 кг, 70 млн. Ед. в сутки). Ежесуточный мониторинг лейкоцитоза: второй день стимуляции – $21,3 \times 10^9$ л, на третий – $26,9 \times 10^9$ л, четвертый – $29,5 \times 10^9$ л, пятый – $32,0 \times 10^9$ л, в день ауотрансплантации – $39,8 \times 10^9$ л.

21.09.2009 г. пациенту проведен 3-х часовой сеанс лейкафереза, получено 94 мл ауотрансплантата. Половина трансплантата отобрана для криоконсервирования и анализа клеточного состава. Количество МПК в ауотрансплантате составило $9,28 \times 10^9$, из них жизнеспособных ГСК $31,73 \times 10^6$. В операционной под спинномозговой анестезией выполнен забор фрагмента икроножной мышцы и инфильтрация передней (5 точек) и задней (10 точек) групп мышц левой голени ауотрансплантатом в количестве 47мл примерно по 3мл.

25.09.2009 г. пациент в удовлетворительном состоянии был выписан. Лейкоцитоз при выписке составляло $9,4 \times 10^9$ л.

Результаты функциональных проб пациента Н.: Тредмил тест ДБХ исходно 70 метров, на сроке 3 месяца 105 метров, 6 месяцев – 200 метров (полностью выполнил тредмил-тест), 12 месяцев – 136 метров, 60 месяцев - полностью выполнил тредмил-тест, дистанция ходьбы не лимитирована. Время восстановления исходного ЛПИ исходно 6 мин 00 сек, на сроке 3 месяца 2 минут 20 сек метров, 6 месяцев – 8 мин 38сек, 12 месяцев – 13 мин 30 сек., 60 месяцев – 3 мин 27 сек. Значения ЛПИ исходно 0,67, на сроке 3 месяца 0,65, 6 месяцев – 0,72, 12 месяцев 0,79, 60 месяцев – 0,54.

На сроке 60 месяцев (5 лет) у пациента дистанция безболевого ходьбы была не лимитирована.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на прогресс ангиохирургии, научный поиск и развитие новых методов лечения ЗПА сохраняет свою актуальность. Этому способствует достаточно большая распространенность заболевания, прогрессирующий характера его течения, зачастую приводящий к инвалидизации и смерти.

В настоящее время достигнуты достаточно стабильные результаты в лечении патологии аорто-бедренного сегмента. Показатели отдаленной 5-летней проходимости открытых и эндоваскулярных реконструкций составляют 90%. Риски переоперационных осложнений не превышают 5-10%, а летальности – 3% [22, 166].

Более сложно решается проблема реваскуляризации при патологии инфраингвинального сегмента. Показатели отдаленной проходимости, в сравнении с аорто-бедренными реконструкциями, значительно хуже. Кумулятивная пятилетняя проходимость аутовены в бедренно-подколенной позиции составляет от 60 до 80%, а аллошунтов не превышает 50% [25]. При этом развитие окклюзии бедренно-подколенного шунта зачастую приводит к развитию более тяжелой степени ишемии, чем до вмешательства, и значительно снижает возможность реоперации [27, 35]. Возможности эндоваскулярной хирургии при этой локализации патологии также значительно хуже. Они в настоящее время ограничены локальными стенозами или окклюзиями до 10 см с высокой вероятностью развития ре-стеноза [103].

Кроме того, возможности реваскуляризации лимитируются состоянием дистального артериального русла. Отсутствие адекватного принимающего русла значительно ухудшает непосредственные и отдаленные результаты вмешательств или полностью исключают их выполнение. Поэтому, если при наличии критической ишемии конечности реваскуляризация является основным, а, зачастую, единственным способом спасения конечности, то целесообразность выполнения реконструктивных операций при перемежающейся хромоте дискуссионна.

Считается, что перемежающаяся хромота является относительно благоприятным состоянием. Однако доказано, что примерно четверть больных в течение 5-ти лет переходит в стадию критической ишемии с постепенным ухудшением основных показателей – лодыжечно-плечевого индекса и дистанции безболевой ходьбы [146]. Это значительно снижает качество жизни, а в ряде случаев, приводит к инвалидизации.

Данные нашего наблюдения за 26 пациентами, которым проводилась стандартная терапия ЗПА, с применением препаратов АСК в дозе 100 мг 1 раз в день и ингибиторов ГМГ-КоАредуктазы (статины), соотносятся с этими литературными данными. Отмечено достоверное снижение значения ЛПИ на 0,02 через год, прогрессивное снижение дистанции безболевой ходьбы в течение года на 19,5% ($p < 0,05$). Также зарегистрировано увеличение времени восстановления ЛПИ после нагрузки на 53,3% ($p < 0,05$). Таким образом, несмотря на относительно стабильное состояние показателей макрогемодинамики (о чем свидетельствует ЛПИ), можно констатировать прогрессивное снижение резервов коллатерального кровообращения.

Между тем, стимуляция коллатерального кровообращения является стратегическим направлением лечения патологии артерий. Этим обусловлен интерес к различным методам непрямой реваскуляризации конечности. В качестве таких методик в различное время применялись разнообразные способы десимпатизации, введение аутокрови по Бытка, реваскуляризирующая остеоперфорация и даже дистракционный остеосинтез по Г.А. Илизарову. Нужно констатировать, что ни один из этих методов не имеет доказательной базы. В «Национальных рекомендациях по ведению пациентов с заболеваниями периферических артерий» (2013) эти операции не рекомендуются для лечения ЗПА.

В 80-е годы XX века появились работы, посвященные применению стволовых клеток для стимуляции коллатерального кровообращения при ЗПА. Благодаря работам Judah Folkman, который предложивший гипотезу о прогрессировании роста злокачественных опухолей в зависимости от их васкуляризации, возник интерес к поиску стимулирующих ангиогенез факторов. Как в последствии

выяснилось, во всех патологических и физиологических процессах стимулируется механизм ангиогенеза, где основным индуктором является гипоксия тканей, а главными эффекторами - прогениторные клетки [98, 102, 182].

Первые клинические исследования трансплантации клеток, полученных из костного мозга, установили положительный клинический эффект у пациентов с ЗПА [185, 147]. В последующем установлено, аутологичная трансплантация фракции МПК, обогащенной ГСК, полученных методом мобилизации их из костного мозга в периферическую кровь, имела сравнимые с трансплантацией клеток КМ клинические результаты [64, 65]. Применение G-CSF, позволило увеличить количество ГСК (CD34+ клеток) в периферической крови в 100 раз. При этом установлено, использование гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в качестве монотерапии ЗПА, без последующей процедуры забора клеточной фракции для трансплантации в пораженную конечность, оказалось не эффективным [173].

Таким образом, в настоящее время используется несколько методик клеточной терапии при ЗПА. Различие заключается, прежде всего, в источнике получения трансплантационного материала. Чаще всего используется костный мозг (КМ). Основным недостатком этого метода является наличие инвазивной процедуры – трепанации губчатой кости с возникающими рисками кантоминации и анестезиологического пособия. Получаемый пунктат КМ отличается большой гетерогенностью клеточного материала. Кроме того, погоня за количественными показателями зачастую приводит к анемии вследствие забора большого количества крови. Поэтому в качестве источника трансплантационного материала нами была выбрана периферическая кровь. Трансплантационный материал, после предварительной цитокиновой мобилизации, получали посредством процедуры лейкофереза на аппарате MCS+ (Haemonetics Corporation, USA), что позволяло получать фракцию мононуклеаров, обогащенную ГСК, а остальные компоненты крови возвращать пациенту.

Для увеличения количества искомых мононуклеаров лейкоферез производился после 5-дневной стимуляции и мобилизации ГСК в периферическую кровь

с помощью рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (коммерческий препарат «Нейпоген») в дозе 1 млн.ед.\кг.\сутки. Данная процедура не имела значительных побочных эффектов. У одного пациента было зафиксировано появление характерного болевого синдрома в левом верхнем квадранте живота, обусловленное развитием спленомегалии. Два пациента отмечали гриппоподобный синдром и миалгии – во всех случаях симптомы носили умеренный характер, не требовали применения анальгетиков и купировались самостоятельно после отмены препарата. Это согласуется с данными мета-анализа литературы, проведенного G.P. Fadini и др., и подтверждает безопасность использованного нами вида аутотрансплантации [105].

Анализ лейкоформулы периферической показал, что стимуляция приводила в среднем к пятикратному увеличению количества лейкоцитов с 7940 до 43250 в мкл. ($p < 0,05$). Примененная нами методика стимуляции и мобилизации ГСК в периферическую кровь с последующей процедурой лейкофереза, несмотря на недостатки, связанные с удорожанием методики (в связи с необходимостью использования G-CSF), позволяет улучшить качество и количество клеточного аутотрансплантата. В исследованиях авторов, использующих в качестве источника трансплантационного материала КМ и различные методы сепарации пунктата костного мозга, количество имплантируемых мононуклеаров составило не более 10×10^9 [59, 89, 169]. Благодаря примененной методике нам удалось получить $13,7 \times 10^9$ (5 – 95 перцентиль: $5,07 \times 10^9$ – $19,75 \times 10^9$) мононуклеаров в, что позволило половине аутотрансплантата подвергнуть криохранению. Таким образом, трансплантационный материал содержал $6,95 \times 10^9$ мононуклеаров, из них жизнеспособных ГСК - $3,89 \times 10^9$. Кроме того, проведение повторных циклов лейкофереза позволило бы получить больший объем клеточного материала, достаточного не только для лечебной манипуляции, но и для резервирования его на неограниченный срок хранения. В последующем этот материал может быть использован для введения в гомо- или контралатеральную конечность, что было выполнено нами у двух пациентов на сроке 6 месяцев. Кроме того, дальнейшее изучение клеточных технологий и появление правовой базы, в перспективе сде-

лает возможным создание «банка стволовых клеток» не только для аутологичной, но и аллотрансплантации.

В исследовании нами установлено, что максимум лейкоцитоза достигался на третьей сутки стимуляции Нейпогеном. Начиная с третьих суток, количество лейкоцитов значительно не изменялись (3 сутки - 43350 в мкл., через 5 дней - 43250 в мкл. ($p < 0,05$)). Поэтому, исходя из соображений безопасности и экономической эффективности, применение рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора для стимуляции в течение трех дней можно считать достаточной.

В нашем исследовании принимали участие пациенты не старше 65 лет. Это было обусловлено предположениями, что возраст может быть лимитирующим фактором для репаративных ресурсов, необходимых для выработки ГСК и стимуляции ангиогенеза. Однако, нами не было выявлено корреляции между возрастом и общим числом мононуклеаров ($r=0,26$, $p=0,19$), возрастом и количеством ГСК (CD34+ клеток) ($r=0,0007$, $p=0,997$) в трансплантате. Полученные данные могут указывать на возможность увеличения в дальнейшем возрастного ценза при отборе пациентов для клеточной терапии ЗПА.

В целом, процедура мобилизации и аутооттрансплантации фракции МПК, обогащенной ГСК, на протяжении госпитального периода не имела осложнений. Таким образом, можно констатировать её безопасность в периоперационном периоде.

Отдаленные результаты трансплантации фракции МПК, обогащенной ГСК, были изучены у всех 30 пациентов на сроке до 60 месяцев. Контрольными точками исследования, на которых проводились инструментальные инвазивные и неинвазивные исследования, были 3, 6, 12 и 60 месяцев. Все пациенты активно наблюдались в течение первых 2-3 недель после процедуры аутооттрансплантации для предупреждения осложнений.

За период наблюдения умерло пять пациентов. Причиной смерти у двух пациентов явилось ОНМК (36 мес., 42 мес. наблюдения соответственно), патология сердца (ОИМ и ХСН) – 2 пациента (48 мес., 56 мес. соответственно), рак лег-

кого - 1 пациент (50 мес.). Кумулятивная выживаемость пациентов спустя три года составила 95,8%, через 5 лет 79,2%.

Так как в исследование были включены пациенты со 2Б степенью ишемии по классификации А.В.Покровского, то основной их жалобой являлась перемежающаяся хромота. Таким образом, наиболее ценными критериями для оценки результата предложенного нами метода лечения ЗПА стали дистанция безболезной ходьбы и время восстановления исходного ЛПИ поле нагрузки.

Увеличение дистанции безболезной ходьбы уже на сроке 3 месяца составила более 42% с 86,9 до 123,6 метров ($p < 0,05$), а к 12 месяцам дистанция возросла до 137,8 метров. Таким образом, в течение первого года наблюдения отмечено увеличение дистанции безболезной ходьбы на 55%, то есть более чем на половину от исходной.

При анализе времени восстановления по методике И.И. Затевахина при включении в исследование все пациенты составляли так называемую группу «критического резерва». К этой группе относятся пациенты, которые не прошли 200 метров или имели время восстановления более 15,5 минут. По мнению И.И. Затевахина с соавторами, такие пациенты нуждаются в коррекции артериального притока к конечности в виду высокого риска развития явлений критической ишемии и потери конечности. При наблюдении пациентов после имплантации фракции аутологичных МПК, обогащенной ГСК, отмечено поступательное перераспределение пациентов из группы с «критическим» в группу с «ограниченным резервом» ходьбы. Уже на сроке 3 месяца количество таких пациентов составило 20%, к 6 месяцам более 30%. На сроке 5 лет все пациенты, кроме одного, не испытывали проблем в выполнении тредмил-теста, а значения восстановления исходного ЛПИ свидетельствовали об отсутствии функционального затруднения в его выполнении. Таким образом, анализ полученных функциональных данных свидетельствует о значительном уменьшении риска возможной ампутации у этих пациентов.

Оценка изменений в клиническом статусе по R. Rutherford на сроке 3 месяца выявила отсутствие улучшения у 1 пациента (+0 по R. Rutherford), минималь-

ное улучшение (+1 по R. Rutherford) у 14 пациентов (50% от исследуемых), умеренное улучшение (+2 по R. Rutherford) – 12 пациентов (42,8%), значительное улучшение (+3 по R. Rutherford) у одного пациента (3,5%). На сроке 6 и 12 месяцев группа с умеренным улучшением (+2 по R. Rutherford) возросла до 53,8% и 70,8% соответственно. У одного пациента на сроке 60 месяцев отмечен регресс положительного эффекта аутотрансплантации до исходной симптоматики. Ухудшения клинического статуса после аутотрансплантации МПК нами не зафиксировано.

На сроке 5 лет пациенты не испытывали проблем в выполнении тредмил-теста, то есть проходили дистанцию в 200 метров полностью, а значения времени восстановления исходного ЛПИ свидетельствовали об отсутствии функциональных нарушений и были близки к значениям нормы. Результаты наблюдения за больными в отдаленном периоде позволяют говорить о стабильности достигнутого эффекта коллатеральной реваскуляризации. Причем если значения ЛПИ, характеризующие, прежде всего, проходимость магистральных артерий, возрастая к 6 месяцам, имели в дальнейшем тенденцию к снижению, то функциональные пробы, отражающие интегральное кровоснабжение конечности (дистанция безболевой ходьбы, время восстановления ЛПИ после нагрузки), имели отчетливую тенденцию к улучшению у 84,2% (16 из 19) обследованных больных. Эти данные свидетельствуют, по-видимому, о сохраняющемся процессе развития коллатерального кровообращения, несмотря на прогрессирование окклюзирующего процесса в магистральных артериях.

Таким образом, все пациенты, перенесшие аутологичную трансплантацию фракции МПК, обогащенной ГСК, имели улучшение функционального состояния конечности, что у большинства пациентов привело к регрессу ишемии до I-IIА степени (по классификации А.В. Покровского).

В отдаленном периоде не было зарегистрировано случаев развития критической ишемии конечности, подвергнутой аутотрансплантации МПК, то есть показатель сохранения конечности составил 100%. Между тем, два пациента перенесли ампутацию контрлатеральной конечности. Кроме того, нами зафиксиро-

вано прогрессивное ухудшение функциональных параметров кровоснабжения у пациентов контрольной группы и в конечностях испытуемых пациентов, которых аутотрансплантация МПК не выполнялась. Таким образом, принимая во внимание вышеуказанные факты и литературные данные о прогрессирующем характере течения ЗПА, можно утверждать о положительном влиянии аутологичной трансплантации фракции МПК, обогащенной ГСК, на прогноз сохранения конечности в отдаленном периоде.

При анализе ангиограмм на сроке 3 месяца отмечено появление развитой коллатеральной сети и заполнение фрагментов берцовых артерий, которые на первичных ангиограммах не контрастировались. Таким образом, информативность первичных ангиограмм о проходимости берцовых артерий становится сомнительной, а контрастирование их на сроке 3 месяца по-видимому связано с развитием коллатерального кровоснабжения. Кроме того, изучение развития коллатеральной сети на основании ангиограмм недостаточно объективно в виду особенностей данного метода диагностики: низкая разрешающая способность (не визуализируются коллатеральные артерии диаметром менее 200 мкм), малая информативность у пациентов с рецидивом ишемии нижних конечностей (ре-окклюзией), невозможность повторения идентичных технических условий и соматического статуса пациента [1].

В проведенном нами исследовании мы можем однозначно утверждать о наличии положительного клинического результата лечения, что выражается в улучшении параметров кровоснабжения конечности на основании функциональных проб. Однако, по полученным функциональным данным делать однозначные выводы о патогенетическом механизме улучшения невозможно. В настоящее время имеются экспериментальные работы, в которых наличие неоангиогенеза после введения прогениторных клеток доказывается морфологически. В клинических исследованиях морфологические исследования имели единичный характер и производились, как правило, посмертно. Таким образом, исследование, доказывающее связь клинического эффекта клеточной терапии с морфоло-

гической оценкой ГСК-стимулированного неоангиогенеза, выполнена нами впервые.

Нами был проведен анализ корреляции динамики функциональных параметров кровотока в конечности, клеточным составом аутотрансплантата с изменениями в морфологической структуре мышечной ткани. Для оценки динамики васкуляризации мышечной ткани (плотности капиллярной сети) мы применили показатель К/М – соотношение капилляров к мышечным волокнам. Иммуногистохимическое исследование производилось в биоптатах икроножной мышцы, взятых перед имплантацией ГСК и через 3 месяца после имплантации. Верификацию капилляров производили по результатам окрашивания с антителами к CD34, поскольку доказано, что CD34, являясь маркером прогениторных клеток (в том числе клеток-предшественниц эндотелия), позволяет выявить капилляры на более ранней стадии развития [125, 149].

Данные иммуногистохимических исследований позволяют утверждать, что источником коллатерального кровообращения, по крайней мере на ранних сроках (3 месяца) после имплантации, является неоангиогенез - соотношение К/М возросло через 3 месяца на 22,4% с 1,52 до 1,86; $p = 0,0005$. Как доказательство причинно-следственной связи между имплантацией ГСК и развитием коллатерального кровоснабжения, можно рассматривать и тот факт, что величина индекса К/М, то есть плотность капиллярной сети, имела положительную корреляцию с абсолютным числом ГСК, содержащихся во введенной в пораженную конечность фракции МПК ($r=0,5$, $p=0,03$). Полученное нами уравнение регрессии позволяет ориентировочно прогнозировать плотность капиллярной сети (величину индекса К/М) в зависимости от числа трансплантированных ГСК. Исходя из полученного на основании формулы графика, следует, что для достижения значений $K/M \geq 2$ в большинстве случаев требуется трансплантация не менее 3×10^7 ГСК, что можно определить как минимальное "целевое значение". В литературных данных в настоящее время отсутствуют данные о зависимости терапевтического эффекта от количества вводимых прогениторных клеток. Есть указания лишь на то, что большее количество клеток CD34+ в трансплантате снижало

риск ампутации и смерти у пациентов в отдаленном периоде [71]. Таким образом, выявленная нами зависимость числа трансплантированных ГСК на плотность вновь образованной капиллярной сети, установлена нами впервые.

Также нами получены данные об отрицательной корреляции между нейпоген-индуцированной стимуляцией лейкопоэза и исходным временем восстановления ЛПИ. Таким образом, у пациентов с исходно меньшим резервом коллатерального кровоснабжения имеется меньшая эффективность мобилизации ГСК. Это заставляет задуматься о показаниях к клеточной терапии на более ранних стадиях заболевания.

Результаты нашего исследования показали эффективность и безопасность применения фракции МПК, обогащенной ГСК, для лечения хронической артериальной недостаточности ИБ степени (по классификации А.В.Покровского). Полученные данные позволяют утверждать, что морфологическим субстратом клинического улучшения является неоангиогенез.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная методика аутотрансплантации фракции моноклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени является эффективной и безопасной. Осложнений, непосредственно связанных с применением методики, ни в раннем, ни в отдаленном периоде не зарегистрировано.

2. Предложенный метод позволяет получить клеточный материал объемом $85,9 \pm 3,49$ мл, содержащий $13,7 \times 10^9$ моноклеарных клеток, из них $47,4 \times 10^6$ жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток. Количество и объем полученного клеточного материала позволяет выполнить не только аутотрансплантацию, но и криоконсервирование клеточного материала.

3. Методика аутотрансплантации фракции моноклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов с хронической артериальной недостаточностью IIБ степени приводит к стойкому и длительному улучшению функциональных параметров кровоснабжения конечности. Выявлено достоверное увеличение дистанции безболевого ходьбы на 55% на сроке 1 год и отсутствие симптомов перемежающейся хромоты у большинства пациентов на сроке 5 лет, во время как течение заболевания у пациентов на фоне стандартной терапии характеризуется прогрессирующим снижением резервов коллатерального кровообращения.

4. Аутотрансплантация фракции моноклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками, в мышцы пораженной конечности у пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей IIБ степени стимулирует процесс ангиогенеза, что проявляется в увеличении плотности капиллярной сети на 22,4%. Степень увеличения плотности капиллярной сети положительно коррелирует с количеством гемопоэтических стволовых клеток в трансплантате.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложенная методика стимуляции ангиогенеза методом ауто-трансплантации фракции мононуклеаров периферической крови, обогащенной гемопоэтическими стволовыми клетками после их цитокиновой мобилизации, может быть рекомендована как один из способов лечения заболеваний периферических артерий в стадии перемежающейся хромоты.

2. Предложенная методика стимуляции и мобилизации гемопоэтических стволовых клеток может быть использована не только для лечения заболеваний периферических артерий, но для создания банка стволовых клеток.

3. Анализ динамики лейкоцитарного ответа на применение рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора в дозе 1 млн\кг массы тела может свидетельствовать о достаточности 3-х дневного курса стимуляции.

4. Положительная корреляция между количеством гемопоэтических стволовых клеток в ауто-трансплантате и плотностью вновь образованной капиллярной сети свидетельствует о необходимости применения методик забора клеточного материала, позволяющих повысить мобилизацию гемопоэтических стволовых клеток в трансплантате, таких как цитокиновая мобилизация и иммуносепарация.

5. Отсутствие корреляции между возрастом и общим числом мононуклеаров, возрастом и количеством гемопоэтических стволовых клеток в трансплантате указывают на возможность увеличения возрастного ценза при отборе пациентов для клеточной терапии заболеваний периферических артерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абалмасов К.Г. Окклюзирующие поражения дистального русла. Проблемы диагностики и лечения (ч. 1) / К.Г. Абалмасов, К.М. Морозов // Анналы хирургии. – 1997. - №4. – С. 21-25.
2. Артериализация венозного кровотока стопы в лечении тяжелой ишемии у больных с окклюзиями артерий голени и нефункционирующей плантарной дугой / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.Г. Хоровец, А.В. Чупин // Хирургия. – 1990. – Т. 5. – С. 35-42.
3. Бокерия Л.А. Сердечно-сосудистая хирургия / Л.А. Бокерия, Р.Г. Гудкова // Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. - М.: Изд-во НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН, 2007. – 108с.
4. Бытка П.Ф. Стимуляция кровотока в конечности при облитерирующих поражениях артерий / П.Ф. Бытка, Е.Т. Чикалэ // Хирургия. - 1982. - №7. - С. 102-105.
5. Воробьёва А.И. Руководство по гематологии / А.И. Воробьёва. – М.: Медицина, 2002. - Т. 1. - 280 с.
6. Гавриленко А.В. Микроциркуляция у больных с хронической ишемией нижних конечностей / А.В. Гавриленко, О.А. Омаржанов, А.В. Абрамян // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2003. - Т. 9. - №2. – С. 130-135.
7. Гавриленко А.В. Отдаленные результаты артериализации венозного кровотока голени и стопы у больных критической ишемией нижних конечностей / А.В. Гавриленко, Скрылев С.И. // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2007. - №2 . - С. 95-103.
8. Гавриленко А.В. Результаты комплексного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных технологий стимуляции ангиогенеза (ЧАСТЬ 1) / А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. - №21 (3). – С. 7-14

9. Допплерографические критерии определения анаэробного порога и ишемии нижних конечностей / С.В. Иванов, В.Э. Кудряшев, Ю.В. Белецкий [и др.] // Медицинская техника (М.: Медицина). – 1995. - №5. – С. 3-6.
10. Затевахин И.И. Тредмил в диагностике и лечении хронической артериальной недостаточности / И.И. Затевахин, М.Ш. Цициашвили, Р.Ю. Юдин. - М., 1999. – 87 с.
11. Золоев Г.К. Облитерирующие заболевания артерий. Хирургическое лечение и реабилитация больных с утратой конечности / Г.К. Золоев. – М.: Медицина, 2004. – 432 с.
12. Исмаилов Н.Б. Тактика хирургического лечения хронической ишемии нижних конечностей IV степени у больных в возрасте 70 и более лет / Н.Б. Исмаилов, А.В. Веснин // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2008. - №2. - С. 123-127.
13. Использование обогащенной тромбоцитами плазмы при лечении ишемии нижних конечностей / А.Г. Драгунов, Ю.В. Александров, С.В. Поляков [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2010. - Т. 16. - №4 (прил.). – С. 120-121.
14. Казанчан П.О. Хирургическая реваскуляризация при критической ишемии // Ангиология и сосудистая хирургия / П.О. Казанчан, В.А. Попов, Ю.В. Дебелый. – 2006. – №3. – С. 32–35.
15. Корымасов Е.А. Применение аутологичных погенеторных клеток костного мозга в лечении больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (Результаты рандомизированного двойного слепого плацебо контролируемого исследования) / Е.А. Корымасов, О.В. Тюмина, А.В. Казанцев // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2009. – Т. 15. - №3. – С. 28-31.
16. Кохан Е.П. Поясничная симпатэктомия в лечение заболеваний сосудов (история, проблемы, перспективы) / Е.П. Кохан, В.Е. Кохан, О.В. Пинчук. - М.: ИТАР-ТАСС, 1997. - 100 с.
17. Кротовский Г.С. Тактика лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей / Г.С. Кротовский, А.М. Зудин. - М., 2005. - 159 с.

18. Кунгурцев В.В. Метаболизм тканей нижних конечностей при критической артериальной ишемии / В.В. Кунгурцев, А.И. Шиманко // Материалы научной конференции: Хроническая критическая ишемия нижних конечностей. – М:Тула, 1994. – С. 156-157.
19. Ларионов М.В. Опыт применения артериализации венозного кровотока стопы у пациентов с критической ишемией нижних конечностей / М.В. Ларионов, О.В. Чуенков // Практическая медицина. - 2005. - № 8. - С. 12-15.
20. Лелюк В.Г. Методические аспекты ультразвуковых ангиологических исследований / В.Г. Лелюк, С.Э. Лелюк. - М., 2002. - 25 с.
21. Лосев Р.З. Хирургическое лечение больных с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза / Р.З. Лосев, Ю.А. Буров // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. - 1999. - №4. - С. 43-46.
22. Максимов А.В. 15-Летний опыт применения ПТФЭ-протезов «ЭКОФЛОН» при синдроме Лериша / А.В. Максимов, М.В. Плотников, О.Ф. Галиуллин // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2014. - №2. - С.168-173.
23. Микрохирургия при поражении артерий дистального русла нижних конечностей / Л.А. Бокерия, А.А. Спиридонов, К.Г. Абалмасов, К.М. Морозов. - М., 2004. - 55 с.
24. Мировой опыт и тенденции генной терапии ишемических заболеваний / Р.В. Деев, А.С. Григорян, И.В. Потапов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. - №17 (2). – С. 145-154.
25. Национальные рекомендации по ведению пациентов с патологией артерий нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия (Приложение). - 2013. - Т. 19. - №2. - С. 1-67.
26. Неинвазивные методы диагностики в хирургии брюшной аорты и артерий нижних конечностей / С.А. Дадвани, С.К. Терновой, В.Е. Сеницин, Е.Г. Артюхина. - М.: Видар, 2000. - 139 с.
27. Отдаленные результаты бедренно-тибиальных реконструкций / П.О. Казанчян, В.А. Попов, Ю.В. Дебелый, Г.В. Костанян // Материалы 12-й (XVI) Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых

хирургов: Отдаленные результаты реконструктивных операций на брюшной аорте и артериях нижних конечностей. – Казань, 2001. - С. 76-77.

28. Отдаленные результаты и показания к использованию протеза «GORE-TEX» в бедренно-подколенной позиции у больных с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.Е. Зотиков [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2004. - №10 (2). – С. 91-97.

29. Патогистологическая оценка состояния скелетной мышцы после прямой генной терапии *vegfl65* пациентов с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей / М.О. Мавликеев, М.В. Плотников, А.В. Максимов [и др.] // Гены & Клетки. – 2014. - Т. IX, №3. – С. 105-111.

30. Покровский А.В. Клиническая ангиология: руководство в 2-х томах / А.В. Покровский. - М.: Медицина, 2004. - 1700 с.

31. Покровский А.В. Состояние сосудистой хирургии в России в 2014 году / А.В. Покровский. – М.: Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов, 2015. – 101 с.

32. Поспелов А.Л. Способность гемопоэтических клеток костного мозга к ангиогенезу утрачивается с возрастом / А.Л. Поспелов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Т. 3. - №5. – С. 11.

33. Российский консенсус «Рекомендуемые стандарты для оценки результатов лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей». М., 2001.

34. 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. - 214 с.

35. Скугарь А. Бедренно-подколенные реокклюзии. Всегда ли реоперация? / А. Скугарь, Н.О. Логущ, В.П. Фоменко // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2003. – Т. 9. - №3. – С. 104-110.

36. Староверов И.Н. Сравнительная характеристика открытой и химической десимпатизации поясничных ганглиев при возвратной ишемии после ре-

конструктивных операций на артериях нижних конечностей / И.Н. Староверов, О.М. Лончакова // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. - 2014. - №4. - С.112-119.

37. Течение перемежающейся хромоты и прогноз больных атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей. Анализ результатов проспективного наблюдения / А.Л. Комаров, Е.Л. Панченко, А.Д. Деев [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2000. – Т. 6, №2. – С. 9-18.

38. Ультразвуковые характеристики периферической диабетической макроангиопатии / Г.И. Кунцевич, А.Ю. Токмакова, М.Б. Анциферов, Д.Н. Староверова // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2004. - №3. – С. 106.

39. Хорев Н.Г. Терапевтический клеточный ангиогенез в лечении заболеваний периферических артерий / Н.Г. Хорев, В.А. Елыкомов, Д.А. Залозный // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. - Т. 17. - №2. - С. 36-44.

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

41. Шойхет Я.Н. Клеточные технологии в лечении заболеваний периферических артерий / Я.Н. Шойхет, Н.Г. Хорев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. - Т. VI, №3. – С. 15-23.

42. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулен» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIb-III фаза клинических испытаний) / П.Г. Швальб, А.В. Гавриленко, Р.Е. Калинин [и др.] // Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия. – 2011. – №6(3). – Р. 76-83.

43. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей / К.А. Талицкий, О.С. Булкина, Т.И. Арефьева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т.4. – № 3. – С. 89-98.

44. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis / N. Takakura, T. Watanabe, S. Suenobu [et al.] // *Cell*. - 2000. - V. 102 (2). - P. 199-209.
45. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles / C. Akyurekli, Y. Le, R.B. Richardson [et al.] // *Stem. Cell. Rev.* – 2015. – V.11(1). – P.150-160.
46. A systematic review of treatment of intermittent claudication in the lower extremities / R.D. Malgor, F. Alahdab, T.A. Elraiyah [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2015. – V. 61(3 Suppl.). – P.54S-73S.
47. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit / L.E. Huang, Z. Arany, D.M. Livingston, H.F. Bunn // *J. Biol. Chem.* - 1996. – V. 271 (50). – P. 32253-32259.
48. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 / J.A. Forsythe, B.H. Jiang, N.V. Iyer [et al.] // *Mol. Cell Biol.* - 1996. – V. 16 (9). – P. 4604-4613.
49. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs / O. Jeon, S.J. Song, S.H. Bhang [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – 2007. – V. 14 (3). – P. 323-330.
50. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy / H. Nakagami, R. Morishita, K. Maeda [et al.] // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2006. – V. 13 (2). – P. 77-81.
51. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells / O.M. Tepper, J.M. Capla, R.D. Galiano [et al.] // *Blood*. – 2005. - V. 105. - P. 1068-1077.
52. Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia / S.W. Kim, H.Z. Zhang, C.E. Kim [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2012. – V. 93 (3). – P. 525-534.
53. An analysis of the outcomes of a decade of experience with lower extremity revascularization including limb salvage, lengths of stay, and safety / N.N. Egorova, S. Guillerme, A. Gelijns [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2010. – V. 51 (4). – P. 878–885.

54. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs / O. Iba, H. Matsubara, Y. Nozawa [et al.] // *Circulation*. – 2002. – V. 106. – P. 2019-2025.
55. Angiogenesis facilitated by autologous whole bone marrow stem cell transplantation for Buerger's disease / D.I. Kim, M.J. Kim, J.H. Joh [et al.] // *Stem. Cells*. – 2006. – V.24(5). – P. 1194-1200.
56. Angiogenic cell therapy for critical limb ischemia: an update on concepts and trials. / J. Furmston, A.S. Patel, F. Ludwinski [et al.] // *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*. - 2014. – V. 55 (5). – P. 641-654.
57. Antegrade flow and peripheral resistance determine the level of endogenous arteriogenesis in patients with superficial femoral artery occlusion / I. Vajanto, P. Korpisalo, J. Karjalainen [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2009. - V.39(12). – P. 1048-1054.
58. Autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the diabetic mouse hindlimb / V. Sica, S. Williams-Ignarro, F. de Nigris [et al.] // *Cell Cycle*. – 2006. – V. 5 (24). – P. 2903-2908.
59. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease / B. Amann, C. Luedemann, R. Ratei, J.A. Schmidt-Luckeb // *Cell. Transplant.* - 2009. – V. 18 (3). – P. 371-380.
60. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease. N. Idei, J. Soga, T. Hata [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Interv.* – 2011. – V. 14(1). – P. 15-25.
61. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for induction of arteriogenesis for limb salvage in critical limb ischaemia / B. Amann, C. Lüdemann, R. Ratei, J.A. Schmidt-Lucke // *Zentralbl Chir.* - 2009. – V. 134 (4). – P. 298-304.
62. Autologous mononuclear stem cell transplantation in patients with peripheral occlusive arterial disease / T. Bartsch, M. Brehm, T. Zeus, B.E. Strauer // *J. Cardiovasc. Nurs.* – 2006. – V. 21 (6). – P. 430-432.

63. Autologous skeletal myoblasts transduced with a new adenoviral bicistronic vector for treatment of hind limb ischemia / M.I. Niagara, H.Kh. Haider, L. Ye [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2004. – V. 40 (4). – P. 774-785.

64. Autologous transplantation of peripheral blood endothelial progenitor cells (CD34+) for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia / F.A. Kudo, T. Nishibe, M. Nishibe, K. Yasuda // *Int. Angiol.* – 2003. – V. 22. – P. 344-348.

65. Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities / P.P. Huang, S.Z. Li, M.Z. Han [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2004. – V. 91 (3). – P. 606-609

66. Beneficial effects of concurrent autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the mouse hindlimb / C. Napoli, S. Williams-Ignarro, F. de Nigris [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2005. – V. 102 (47). – P. 17202-17206.

67. Bisdas T. Current practice of first-line treatment strategies in patients with critical limb ischemia / T. Bisdas, M. Borowski, G. Torsello First-Line Treatments in Patients With Critical Limb Ischemia (CRITISCH) Collaborators. // *J Vasc Surg.* – 2015. – V.62(4). – P. 965-973.

68. Blessing E. Update peripheral arterial occlusive disease / E. Blessing // *Herz.* – 2015. – V.40(7). – P.1013-1024.

69. Bocalandro F. Critical limb ischemia and limb salvage / F. Bocalandro, R.W. Smalling [Электронный ресурс]// From the Division of Cardiology The University of Texas Houston Medical School at Houston, 2007. Режим доступа: http://www.uth.tmc.edu/anes/wound/critical_ischemia.htm.

70. Bone Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled Trials / S.M. Peeters Weem, M. Teraa, G.J. de Borst, M.C. Verhaar [et al.] // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2015. – V.50(6). – P. 775-783.

71. Bone marrow mononuclear cells versus G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells for treatment of lower limb ASO: pooled analysis for long-

term prognosis / R. Onodera, S. Teramukai, S. Tanaka [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* - 2011. – V. 46 (2). – P. 278-284.

72. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature / T. Ziegelhoeffer, B. Fernandez, S. Kostin [et al.] // *Circ. Res.* - 2004. – V. 94. – P. 230-238.

73. Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment / M. Dubsy, A. Jirkovska, R. Bem [et al.] // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2013. – V. 29 (5). – P. 369-376.

74. Brothers T.E. Failure of patients with peripheral arterial disease to accept the recommended treatment results in worse outcomes / T.E. Brothers // *Ann. Vasc. Surg.* – 2015. – V.29(2). – P. 244-259.

75. Burns P. What constitutes best medical therapy for peripheral arterial disease? / P. Burns, E. Lima, A.W. Bradbury // *Eur. J. Endovasc. Surg.* – 2002. – V. 24 (1). – P. 6-12.

76. Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg (BASIL) trial: Analysis of amputation free and overall survival by treatment received / A.W. Bradbury, D.J. Adam, J. Bell [et al.] BASIL trial Participants. // *J. Vasc. Surg.* – 2010 V. 51(5 Suppl). – P.18S-31S.

77. Camargo-Arias E. Screening for Peripheral Arterial Disease / E. Camargo-Arias, J. Aponte-Rodriguez, H. Banchs-Pieretti, P.I. Altieri-Nieto // *Bol. Asoc. Med. P.R.* – 2015. – V.107(3). – P. 95-97.

78. Capillary density and capillary-to-fibre ratio in vastus lateralis muscle of untrained and trained men. *Folia. Histochem* / J.A. Zoladz, D. Semik, B. Zawadowska [et al.] // *Cytobiol.* – 2005. – V. 43 (I). - P. 11-17.

79. Changes in functional status after treatment of critical limb ischemia / F.A. Frans, R. Met, M.J. Koelemay [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2013. – V.58(4) . – P. 957-965.

80. Characterization of the Cellular Output of a Point-of-Care Device and the Implications for Addressing Critical Limb Ischemia / J.E. Woodell-May, M.L. Tan, W.J. King [et al.] // *Biores. Open. Access.* – 2015. – V.4(1). – P. 417-424.
81. Chavakis E. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis / E. Chavakis, S. Dimmeler // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2002. – V. 22. – P. 887-893.
82. Claeys L.G. Transcutaneous oxygen pressure as predictive parameter for ulcer healing in endstage vascular patients treated with spinal cord stimulation / L.G. Claeys, S. Horsch // *Int. Angiol.* - 1996. – V. 15 (4). – P. 344-349.
83. Clayton Z.E. Generating induced pluripotent stem cell derived endothelial cells and induced endothelial cells for cardiovascular disease modelling and therapeutic angiogenesis / Z.E. Clayton, S. Sadeghipour, S.Patel // *Int. J. Cardiol.* – 2015. – V.197. – P. 116-122.
84. Collective therapy and therapeutic strategy for critical limb ischemia / H. Masaki, A. Tabuchi, Y. Yunoki [et al.] // *Ann. Vasc. Dis.* – 2013. – V.6(1). – P. 27-32
85. Combination of in vivo angiopoietin-1 gene transfer and autologous bone marrow cell implantation for functional therapeutic angiogenesis / K. Kobayashi, T. Kondo, N. Inoue [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – V. 26 (7). – P. 1465-1472.
86. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia / T. Iwase, N. Nagaya, T. Fujii [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – V. 66 (3). – P. 543-551.
87. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis / G.R. Fowkes, D. Rudan, I. Rudan, M.H. Criqui // *The Lancet.* – 2013. - V. 382, Issue 9901. – V. 19. – P.1329-1340.
88. Computational Network Model Prediction of Hemodynamic Alterations Due to Arteriolar Rarefaction and Estimation of Skeletal Muscle Perfusion in Peripheral Arterial Disease / J.L. Heuslein, X. Li, K.P. Murrell [et al.] // *Microcirculation.* – 2015. – V.22(5). – P. 360-369.

89. Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity / P.C. Hermann, S.L. Huber, T. Herrler [et al.] // *Cell. Transplant.* – 2008. – V. 16 (10). – P. 1059-1069.

90. Consensus Document on Intermittent Claudication from the Central European Vascular Forum (C.E.V.F.)-3rd revision (2013) with the sharing of the Mediterranean League of Angiology and Vascular Surgery, and the North Africa and Middle East Chapter of International Union of Angiology / G.M. Andreozzi, E. Kalodiki, L. Gašpar [et al.] // *Int. Angiol.* - 2014. – V. 33 (4). – P. 329-347.

91. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia / I. Baumgartner, A. Pieczek, O. Manor [et al.] // *Circulation.* – 1998. – V. 97 (12). – P.1114-1123.

92. Cooke J.P. Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies / J.P. Cooke, D.W. Losordo // *Circ Res.* – 2015. – V.116(9) . – P. 1561-1578.

93. Criqui M.H. Epidemiology of peripheral artery disease / M.H. Criqui, V. Aboyans // *Circ Res.* – 2015. – V. 116 (9). – P. 1509-1526.

94. Criqui M.H. Peripheral arterial disease – epidemiological aspects / M.H. Criqui // *Vascular Medicine.* – 2001. - V. 6 (suppl 1). – P. 3–7.

95. Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease [Электронный ресурс]/ J.I. Suzuki, M. Shimamura, H. Suda [et al.] // *Hypertens Res.* – 2015. – Режим доступа: <http://www.nature.com/hr/journal/v39/n4/full/hr2015134a.html>

96. Development of a self-inactivating lentivirus vector / H. Miyoshi, U. Blömer, M. Takahashi [et al.] // *J. Virol.* – 1998. – V. 72 (10). – P. 8150-8157.

97. Dhaliwal G. Peripheral arterial disease: Epidemiology, natural history, diagnosis and treatment / G. Dhaliwal, D. Mukherjee // *Int. J. Angiol.* – 2007. – V. 16 (2). – P. 36–44.

98. Different Outlook on the Role of Bone Marrow Stem Cells in Vascular Growth: Bone Marrow Delivers Software not Hardware / M. Heil, T. Ziegelhoeffer, B. Mees, W.A. Schaper // *Circ. Res.* – 2004. – V. 94. – P. 573-574.
99. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors / O. Awad, E.I. Dedkov, C. Jiao [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2006. - V. 26 (4). - P. 758-764.
100. Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease / F.G.R. Fowkes, E. Housley, E.H. Cawood [et al.] // *Diabetes. Care.* – 2005. – V. 28 (8). – P. 1981-1987.
101. Endothelial juxtaposition of distinct adult stem cells activates angiogenesis signaling molecules in endothelial cells / E. Mohammadi, S.M. Nassiri, R. Rahbarghazi [et al.] // *Cell. Tissue. Res.* – 2015. – V.362(3). – P. 597-609
102. Endothelial progenitor cells: identity defined? / F. Timmermans, J. Plum, M.C. Yöder [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* - 2009. – V. 3 (1). – P. 87-102.
103. European Society For Cardiology. 2011 ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases / C. Brogneaux, M. Sprynger, M. Magnée, P. Lancellotti // *Rev. Med. Liege.* - 2012. – V. 67 (11). – P. 560-565.
104. Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro / A. Burlacu, G. Grigorescu, A.M. Rosca [et al.] // *Stem Cells.* – 2013. – V.22(4). – P. 643-53
105. 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. – V. 209. – P. 10-17.
106. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease / J. Folkman // *Nat. Med.* – 1995. – V. 1. – P. 27-30.
107. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications / J. Folkman // *N. Engl. J. Med.* - 1971. – V. 285. – P. 1182-1186.
108. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor / K. Gradin, J. McGuire, R.H. Wenger [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* - 1996. – V. 16 (10). – P. 5221-5231.

109. Gardner R. Stem cells and regenerative medicine: Principles, prospects and problems / R. Gardner // *C.R. Biol.* – 2007. – V. 330. – P. 465-473.

110. Gene therapy for peripheral arterial disease / M. Shimamura, H. Nakagami, Y. Taniyama, R. Morishita // *Expert. Opin. Biol Ther.* – 2014. – V.14(8). – P.1175-1184

111. Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors / Y. Maeda, U. Ikeda, Y. Ogasawara [et al.] // *Cardiovasc. Res.* 1997. – V. 35. – P. 514-521.

112. Gil de Lamadrid José Hernández. Peripheral Arterial Disease: Surgical Treatment / Hernández Gil de Lamadrid José, H.Delgado Osorio // *Bol. Asoc. Med. P.R.* – 2015. – V. 107(3). – P. 75-78.

113. Granulocyte-colony stimulating factor augments neovascularization induced by bone marrow transplantation in rat hindlimb ischemia / Y. Takagi, T. Omura, M. Yoshiyama [et al.] // *Pharmacol. Sci.* – 2005. – V. 99 (1). – P. 45-51.

114. Gulati A. Critical limb ischemia and its treatments: a review / A. Gulati, I. Botnaru, L.A. Garcia // *J Cardiovasc Surg (Torino)*. – 2015. – V.56(5). – P. 775-785.

115. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia / M.H. Moon, S.Y. Kim, Y.J. Kim [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2006. – V. 17 (5-6). – P. 279-290.

116. Hunting C.B. Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization / C.B. Hunting, W.A. Noort, J.J. Zwaginga // *Vox. Sang.* – 2005. – V. 88. – P. 1-9.

117. Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell-derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia / S.W. Cho, S.H. Moon, S.H. Lee [et al.] // *Circulation.* – 2007. – V. 116. – P. 2409-2419.

118. Incidence of peripheral arterial disease in the ARTPER population cohort after 5 years of follow-up / Alzamora M.T., Forés R., Pera G., [et al.] // *BMC Cardiovasc Disord.* – 2016. – V.16(1). – P. 8

119. Intermittent claudication in 8343 men and 21-year specific mortality follow-up / S.J. Bowlin, J.H. Medalie, S.A. Flocke [et al.] // *Ann. Epidemiol.* - 1997. - V. 7 (3). – P. 180-187.
120. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease / L. Norgren, W.R. Hiatt, J.A. Dormandy [et al.] // TASC II Working Group. *Int Angiol.* – 2007. – V. 26 (2). – P. 81-157.
121. Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA) / D.H. Walter, H. Krankenberg, J.O. Balzer [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Interv.* – 2011. – V. 4 (1). – P. 26-37.
122. Intramuscular or combined intramuscular/intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial in patients with advanced limb ischemia / R.B. Van Tongeren, J.F. Hamming, W.E. Fibbe [et al.] // *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*. – 2008. – V. 49 (1). – P. 51-58.
123. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization / T. Takahashi, C. Kalka, H. Masuda [et al.] // *Nat Med.* – 1999. – V.5(4). – P. 434-438.
124. Isner J.M. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization / J.M. Isner, T. Asahara // *J. Clin. Invest.* – 1999. – V. 103 (9). – P. 1231-1236.
125. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan [et al.] // *Science.* - 1997. – V. 275. – P. 964-967.
126. Jamieson C. The definition of critical ischaemia of a limb [Электронный ресурс] / C. Jamieson // *Br. J. Surg.* – 1982. – V. 69. - Suppl:S1. – Режим доступа: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1365-2168](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1365-2168)
127. Ko S.H. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia / S.H. Ko, D.F. Bandyk // *Semin. Vasc. Surg.* – 2014. – V. 27 (1). – P. 23-31.
128. Krause K. Clinical Cardiology Analysis of progenitor cell mobilization and erythropoietin plasma levels in patients with acute myocardial infarction / K.

Krause, B. Fehse, K. Jaquet, C. Lang // *Exp. Clin. Cardiol.* – 2005. – V. 10 (2). – P. 104-107.

129. Krishna S.M. Evaluation of the clinical relevance and limitations of current pre-clinical models of peripheral artery disease / S.M. Krishna, S.M. Omer, J. Golledge // *Clin. Sci. (Lond).* – 2016. – V.130(3). – P. 127-150.

130. Local association between endothelial dysfunction and intimal hyperplasia: relevance in peripheral artery disease [Электронный ресурс] / Y. Heinen, E. Stegemann, R. Sansone [et al.] // *J. Am. Heart. Assoc.* – 2015. – V.4(2). - Режим доступа: <http://jaha.ahajournals.org/content/4/2/e001472>.

131. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms / T. Kinnaird, E. Stabile, M.S. Burnett [et al.] // *Circulation.* - 2004. – V. 109 (12). – P. 1543-1549.

132. Low Rates of Revascularization and High In-Hospital Mortality in Patients With Ischemic Lower Limb Amputation: Morbidity and Mortality of Ischemic Amputation [Электронный ресурс]/ N.M. Malyar, E. Freisinger, M. Meyborg [et al.] // *Angiology.* – 2016. – Режим доступа: <http://ang.sagepub.com/content/early/2016/01/13/0003319715626849>

133. Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia / A. Aicher, C. Heeschen, K. Sasaki [et al.] // *Circulation.* – 2006. – V. 114 (25). – P. 2823-2830.

134. Markowitz D. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids / D. Markowitz, S. Go, A. Bank // *J. Virology.* – 1988. – V. 62. – P. 1120-1124.

135. Marques L. Drug-coated balloons: what is the evidence? / L. Marques, S. Hopf-Jensen, S. Müller-Hülsbeck // *J. Cardiovasc. Surg. (Torino).* – 2016. –V.57(1). - P.12-17.

136. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through para-

crine mechanisms / T. Kinnaird, E. Stabile, M.S. Burnett [et al.] // *Circ. Res.* – 2004. – V. 94 (5). – P. 678-685.

137. Matsui K. Therapeutic angiogenesis by transplantation of autologous bone marrow and peripheral blood mononuclear cells in patients with peripheral arterial disease / K. Matsui // *Int. J. Angiol.* – 2003. – V. 12 (3). – P. 155-161.

138. McDermott M.M. Lower extremity manifestations of peripheral artery disease: the pathophysiologic and functional implications of leg ischemia / M.M. McDermott // *Circ Res.* – 2015. – V.116(9). – P. 1540-1550.

139. Metabolic reprogramming by HIF-1 promotes the survival of bone marrow-derived angiogenic cells in ischemic tissue / S. Rey, W. Luo, L.A. Shimoda, G.L. Semenza // *Blood.* – 2011. – V.117(18). –P. 4988-4998.

140. Mid- and long-term results of the treatment of infrainguinal arterial occlusive disease with precuffed expanded polytetrafluoroethylene grafts compared with vein grafts / S.A. Loh, B.S. Howell, C.B. Rockman [et al.] // *Ann. Vasc. Surg.* – 2013. – V. 27 (2). – P. 208-217.

141. Minar E. Integrative therapy in patients with intermittent claudication / E. Minar // *Vasa.* – 2015. – V. 44 (2). – P. 85-91.

142. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony_stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation / H.J. Cho, H.S. Kim, M.M. Lee [et al.] // *Circ.* – 2003. – V. 108 (23). – P. 2918-2925.

143. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins / N. Ferrara, K. Houck, L. Jakeman, D.W. Leung // *Endocr. Rev.* - 1992. – V. 13 (1). – P. 18-32.

144. Mortality after major amputation in diabetic patients with critical limb ischemia who did and did not undergo previous peripheral revascularization Data of a cohort study of 564 consecutive diabetic patients / E. Faglia, G. Clerici, M. Caminiti [et al.] // *J. Diabetes. Complications.* – 2010. – V.24(4) . –P. 265-269.

145. Mortality rates and mortality predictors in patients with symptomatic peripheral artery disease stratified according to age and diabetes / T. Mueller, F. Hinterreiter, C. Luft [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2014. – V.59(5). – P. 1291-1299.

146. Natural history of claudication: Long-term serial follow-up study of 1244 claudicants / R. Aquino, C. Johnnides, M. Makaroun [et al.] // *J. Vasc. Surg.* - 2001. - V. 34. - P. 962-970.

147. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease / K. Esato, K. Hamano, T.S. Li [et al.] // *Cell. Transplant.* – 2002. – V. 11 (8). – P. 747-752.

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

149. Norrby K. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII / K. Norrby, B. Ridell // *APMIS.* – 2003. – V. 111. – P.483-489.

150. Ohmine T. Strategy of Revascularization for Critical Limb Ischemia Due to Infragenicular Lesions-Which Should Be Selected Firstly, Bypass Surgery or Endovascular Therapy? / Ohmine T., Iwasa K., Yamaoka T. // *Ann Vasc Dis.* – 2015. - V.8(4). – P. 275-281.

151. Oldfield E.H. Intrathecal gene therapy for the treatment of leptomeningeal carcinomatosis / E.H. Oldfield, Z. Ram // *Human Gene Therapy.* – 1995. – V. 6. – P. 55–85.

152. Outcome events in patients with claudication: A 15-year study in 2777 patients / C. Muluk, Satish, S. Muluk Visala, E. Kelley Mary [et al.] // *J. Vasc. Surg.* - 2001. – V. 33. – P. 251-258.

153. Outcomes of infrainguinal bypass determined by age in the Vascular Study Group of New England / M. Dermody, C. Homsy, Y.Zhao [et al.] Vascular Study Group of New England. // *J. Vasc. Surg.* – 2015. – V. 62 (1). – P. 83-92.

154. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence / H. Reinecke, M. Unrath, E. Freisinger [et al.] // *Eur Heart J.* – 2015. – V.36(15). – P.932-938.

155. Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer / H. Gahéry-Ségard, V. Molinier-Frenkel, C. Le Boulaire [et al.] // *J. Clinical Invest.* – 1997. – V. 100. – P. 2218–2226.

156. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans / P.P. Huang, X.F. Yang, S.Z. Li [et al.] // *Thromb. Haemost.* - 2007. – V. 98 (6). – P. 1335-1342.

157. Raval Z. Cell therapy of peripheral arterial disease: from experimental findings to clinical trials / Z. Raval, D.W. Losordo // *Circ Res.* – 2013. – V. 112 (9). – P. 1288-1302.

158. Recombinant adenoassociated virus for muscle directed gene delivery / K.J. Fisher, K. Jooss, J. Alston [et al.] // *Nature Medicine.* – 1997. – V. 3. – P. 306–316.

159. Recommended standards for reports dealing with lowerextremity ischemia: Revised version / R.B. Rutherford, J.D. Baker, C. Ernst [et al.] // *J. of Vascular Surgery.* – 1997. – V. 25. – P. 517-538.

160. Regional biochemical and hematologic changes in patients after revascularization of the lower extremities in ischemia of the extremities / P. Mondek, V. Sefránek, J.Tomka [et al.] // *Rozhl. Chir.* – 2002. – V.81(5). – P. 265-270

161. Rehman J. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors / J. Rehman, J. Li, C.M. Orschell, K.L. March // *Circulation.* - 2003. – V. 107 (8). – P. 1164-1169.

162. Relationship between leg muscle capillary density and peak hyperemic blood flow with endurance capacity in peripheral artery disease / J.L. Robbins, W.S. Jones, B.D. Duscha [et al.] // *J Appl Physiol (1985).* – 2011. – V.111(1). – P.81-86.

163. Remote 3-year results of application of “indirect” ways of revascularization in patients with chronic ischemia of lower extremities / Iu.V. Cherviakov, I.N. Sta-

roverov, A.V. Borisov [et al.] // Vestn. Khir. Im. I.I. Grek. – 2015. – V.174(2). – P. 84-88.

164. Remote results of open and endovascular operations in correction of occlusive and stenotic lesions of the femoropopliteal arteries / I.I. Zatevakhin, V.N. Shipovskii, V.N. Zolkin [et al.] // Angiol. Sosud. Khir. - 2011. – V. 17 (3). – P. 59-62.

165. Results for primary bypass versus primary angioplasty/stent for intermittent claudication due to superficial femoral artery occlusive disease / J.J. Siracuse, K.A. Giles, F.B. Pomposelli [et al.] // J. Vasc. Surg. 2012. – V. 55 (4). – P. 1001-1007.

166. Review of direct anatomical open surgical management of atherosclerotic aorto-iliac occlusive disease / K.W. Chiu, R.S. Davies, P.G. Nightingale [et al.] // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2010. – V. 39. – P. 460-471.

167. Selvin E. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000 / E. Selvin, T.P. Erlinger // Circulation. – 2004. – V. 110 (6). – P. 738-743.

168. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease / G.L. Semenza // Annu. Rev. Physiol. – 2014. – V. 76. – P. 39-56.

169. Separation of human lymphocytes from citrated blood by density gradient (NycoPrep) centrifugation: monocyte depletion depending upon activation of membrane potassium channels / A. Bøyum, H. Brincker Fjerdingsstad, I. Martinsen [et al.] // Scand. J. Immunol. - 2002. – V. 56 (1). – P. 76-84.

170. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium. Feasibility, cell migration, and body distribution / I.M. Barbash, P. Chouraqui, J. Baron [et al.] // Circulation. – 2003. – V. 108. – P. 863-868.

171. Smith A.E. Viral vectors in gene therapy / A.E. Smith // Ann. Rev. Microbiol. – 1995. – V. 49. – P. 807–838.

172. Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing Group / M.S. Conte, F.B. Pomposelli, D.G. Clair [et al.] // J. Vasc. Surg. – 2015. - V. 61 (3 Suppl). – P. 2S-41S.

173. START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease / N. van Royen, S.H. Schirmer, B. Atasever [et al.] // *Circulation*. - 2005. - V. 112 (7). - P. 1040-1046.

174. Stem cell therapy in patients with thromboangiitis obliterans: assessment of the long-term clinical outcome and analysis of the prognostic factors / K.B. Lee, E.S. Kang, A.K. Kim [et al.] // *Int. J. Stem. Cells*. – 2011. – V. 4 (2). – P. 88-98.

175. Sutherland D.R. Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells / D.R. Sutherland, M. Keeney, J.W. Gratama // *Curr Protoc Cytom*. – 2003. - 6. - Unit 6.4

176. Takeshita S. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularisation in a rabbit ischemic hindlimb model / S. Takeshita, L.P. Zheng // *J. Clin. Invest*. – 1994. – V. 93. – P. 662-670.

177. Teissie J. Mechanisms of cell membrane electroporation: a mini-review of our present knowledge / J. Teissie, M. Golzio, M.P. Rols // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2005. – V. 1724. – P. 270–280.

178. The benefit of revascularization in nonagenarians with lower limb ischemia is limited by high mortality / E. Saarinen, S. Vuorisalo, P. Kauhanen [et al.] // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg*. – 2015. – V.49(4). – P. 420-425.

179. The bone marrow-derived endothelial progenitorcell response is impaired in delayed wound healing from ischemia / S.M. Bauer, L.J. Goldstein, R.J. Bauer [et al.] // *J. Vasc. Surg*. - 2006. – V. 43 (1). – P. 134-141.

180. The definition of critical ischemia of a limb. Working party of the intern. vaskul. Simp / P.R.F. Bell, D. Charleworth, R.G. De Palma, H.H. Eastcott // *Brit. J. Surg*. – 1982. – V. 69 (2). - P. 2.

181. The management of severe aortoiliac occlusive disease: endovascular therapy rivals open reconstruction / V.S. Kashyap, M.L. Pavkov, J.F. Bena [et al.] // *J. Vasc. Surg*. – 2008. – V. 48. – P. 1451-1457.

182. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses / S. Moens, J. Goveia, P.C. Stapor [et al.] // *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* – 2014. – V. 25 (4). – P. 473-482.

183. The therapeutic efficacy for limb ischemia by transplantation of mobilized peripheral blood cells before and after CD34+ cell depletion / B. Zhou, S. Li, D.S. Gu [et al.] // *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2007. - №28 (3). – C. 194-198.

184. The Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. Critical limb ischemia: management and outcome. Report of a national survey // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 1995. – V. 10. – P. 108-113.

185. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial / E. Tateishi-Yuyama, H. Matsubara, T. Murohara [et al.] // *Lancet.* – 2002. – V. 360. – P. 427-435.

186. Therapeutic angiogenesis of bone marrow mononuclear cells (MNCs) and peripheral blood MNCs: transplantation for ischemic hindlimb / H. Zhang, N. Zhang, M. Li [et al.] // *Ann. Vasc. Surg.* – 2008. – V. 22 (2). – P. 238-247.

187. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model / A. Al-Khalidi, H. Al-Sabti, J. Galipeau, K. Lachapelle // *Ann. Thorac. Surg.* – 2003. – V. 75. – P. 204-209.

188. Thiruvoipati T. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes / T. Thiruvoipati, C.E. Kielhorn, E.J. Armstrong // *World. J. Diabetes.* – 2015. – V. 6 (7). – P. 961-969.

189. Time-dependent effect of preinfarction angina pectoris and intermittent claudication on mortality following myocardial infarction: A Danish nationwide cohort study / M. Schmidt, E. Horváth-Puhó, L. Pedersen [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2015. – V. 187. – P. 462-469.

190. Trans-Atlantic Inter-Society Consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II) / L. Norgren, W.R. Hiatt, J.A. Dormandy [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2007. – V. 45 (Suppl S). – P. S5–S67.

191. Treatment of critical lower limb ischemia / L. Salomon du Mont, S. Déglise, C. Dubuis [et al.] // *Rev Med Suisse*. – 2014. – V. 10 (447). – P. 1992-1996.
192. Trial of a Paclitaxel-Coated Balloon for Femoropopliteal Artery Disease / K. Rosenfield, M.R. Jaff, C.J. White [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – V. 373 (2). – P. 145-153.
193. Twine C.P. Graft type for femoro-popliteal bypass surgery [Электронный ресурс] / C.P. Twine, A.D. McLain // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2010. – V. 5. – Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD001487.pub2/full>.
194. Update PAVK: Epidemiology, comorbidity and prognosis of peripheral arterial obstructive disease / H. Lawall, C. Diehm, U. Hoffmann, H. Reinecke // *Dtsch Med Wochenschr.* – 2015. – V.140(24). – P. 1798-1802.
195. Vartanian S.M. Surgical intervention for peripheral arterial disease / S.M. Vartanian, M.S. Conte // *Circ. Res.* – 2015. – V. 116 (9). – P. 1614-1628.
196. VEGF-PKD1-HDAC7 signaling promotes endothelial progenitor cell migration and tube formation / D. Yu, W. Chen, J. Ren [et al.] // *Microvasc. Res.* – 2014. – V.91. – P. 66-72.
197. Verhaeghe R. Epidemiology and prognosis of peripheral obliterative arteriopathy / R. Verhaeghe // *Drugs*. – 1998. – V. 56 (Suppl 3). – P. 1-10.
198. Virologic and immunologic evidence of multifocal genital herpes simplex virus 2 infection / C. Johnston, J. Zhu, L. Jing [et al.] // *J Virol.* 2014. – V. 88 (9). – P. 4921-31.
199. Wahlberg Eric Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia / Eric Wahlberg // *J. Vasc. Surg.* - 2003. – V. 38 (1). – P. 198-203.
200. Winell K. The National Hospital Discharge Register Data on Lower Limb Amputations / K. Winell, M. Niemi, M. Lepantalo // *J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2006. – V. 32 (1). – P. 66-70.
201. Yang Y. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I restricted CD4⁺ CTLs in vivo / Y. Yang, J.M. Wilson // *J. Immunol.* – 1995. -V. 155. – P. 2564–2569.