

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Крылов Андрей Александрович

Современные подходы к лечению пациентов с критической ишемией
нижних конечностей атеросклеротического генеза
при фоновом сахарном диабете

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент Сучков Игорь Александрович

Научный консультант:

кандидат медицинских наук Деев Роман Вадимович

Рязань – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы	14
1.1 Состояние проблемы лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей в сочетании с сахарным диабетом	14
1.1.1 Распространенность патологии	14
1.1.2 Влияние хронической гипергликемии на метаболизм, ангиогенез и регенерацию	18
1.2 Современные подходы к лечению пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне хронической гипергликемии	26
1.2.1 Консервативная терапия	27
1.2.2 Хирургические методы лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне гипергликемии	31
1.3. Место терапевтического ангиогенеза в лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей в сочетании с сахарным диабетом	36
1.3.1 Генная терапия	37
1.3.2 Экспериментальное моделирование сахарного диабета и раневого процесса с использованием терапевтического ангиогенеза у животных	39
1.3.3 Результаты первых пилотных клинических исследований по использованию геннотерапевтической индукции ангиогенеза у больных с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета	44

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	48
2.1 Экспериментальная часть исследования	48
2.2 Клиническая часть исследования	49
2.3 Статистическая обработка данных	64
ГЛАВА 3. Результаты исследования и их обсуждение	68
3.1 Результаты экспериментального исследования	68
3.2 Результаты клинического исследования	77
3.3 Обсуждение полученных результатов и сопоставление их с данными других исследований	108
3.4 Алгоритм лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета	135
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	138
ВЫВОДЫ	146
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	149

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД – артериальное давление
- АСБ – атеросклеротическая бляшка
- ВЖД - высокожировая диета
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ГБА – глубокая бедренная артерия
- ГМК – гладкомышечные клетки
- ДБХ – дистанция безболевого ходьбы
- ДН – диабетическая нейропатия
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЗБА – задняя большеберцовая артерия
- ЗПА – заболевания периферических артерий
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- ИМ – инфаркт миокарда
- КИ – критическая ишемия
- КИНК – критическая ишемия нижних конечностей
- ЛДГ - лактатдегидрогеназа
- ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс
- ЛСК – линейная скорость кровотока
- ММП – матриксные металлопротеиназы
- ММСК - мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
- МНК - моноклеарные клетки
- МЦР – микроциркуляторное русло
- НВГ - Неоваскулген
- ОААНК – облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей
- ОБА – общая бедренная артерия
- ПБА – поверхностная бедренная артерия
- ПБАА – передняя большеберцовая артерия
- ПкА – подколенная артерия
- ПХ – перемежающаяся хромота

- ПЭК – прогениторные эндотелиальные клетки
- ПЯЛ - полиморфоядерные лейкоциты
- СД – сахарный диабет
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ССС – сердечно-сосудистая система
- СОЭ – скорость оседания эритроцитов
- ТКНК – транскутанное напряжение кислорода
- УЗДС - ультразвуковое дуплексное сканирование
- УЗДСММ - ультразвуковая доплерофигмоманометрия
- ФР – фактор роста
- ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей
- ХОЗАНК – хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей
- ЦПЭК - циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток
- ЧТБА - чрескожная транслюминальная баллонная ангиопластика
- ЭК – эндотелиальные клетки
- цАМФ - циклический аденозинмонофосфат
- FGF - фактор роста фибробластов
- HIF-1a - индуцированный гипоксией фактор-1a
- HGF - гепатоцитарный фактор роста
- NO - оксид азота
- PDGF - тромбоцитарный фактор роста
- SDF – стромальный клеточный фактор
- TASC-II - Трансатлантический консенсус
- TGF-beta1 - трансформирующий фактор роста - бета 1
- TNF- α - фактор некроза опухоли-альфа
- VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
- VPF – фактор проницаемости сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Сердечно - сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире. Ежегодно в России от ССЗ умирает более 1 млн 200 тысяч человек, из них – около 100 тысяч человек трудоспособного возраста [107]. ССЗ являются ведущей причиной инвалидизации российского населения. Число случаев сердечно-сосудистых заболеваний, зарегистрированных в государственных медицинских учреждениях России, составляет почти 31 млн человек [60].

Атеросклероз является основной причиной развития сердечно-сосудистых заболеваний. Характерная черта атеросклероза – длительное прогрессирующее течение заболевания, неуклонно приводящее к значительному ограничению физической активности и трудоспособности, как со стороны коронарной патологии, так и со стороны нижних конечностей.

Помимо болезней сердца и цереброваскулярной патологии, среди ССЗ особое внимание следует уделить хронической ишемии при заболевании периферических артерий (ЗПА) и сосудистым осложнениям сахарного диабета.

Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) в 85-90% случаев возникает по причине атеросклеротического поражения терминального отдела аорты, ее бифуркации и нижележащих артерий [104]. Основное клиническое проявление ХИНК – перемежающаяся хромота (ПХ) проявляется в ограничении физической нагрузки по проходимому расстоянию. Прогрессирующее поражение сосудов приводит к постепенному уменьшению проходимого расстояния и появлению болей покоя – критической ишемии нижних конечностей (КИНК), являющейся предиктором возникновения трофических нарушений и требующей решения вопроса об оперативном вмешательстве.

Сахарный диабет (СД) во всем мире признан одним из наиболее важных неинфекционных заболеваний, распространенность которого приобрела характер пандемии [56]. По данным Международной диабетической федерации число больных СД среди взрослого населения в мире к 2030 году составит 552

млн [101]. СД повышает риск развития заболеваний артерий нижних конечностей в 2-4 раза и имеется у 12-20% пациентов с патологией периферических артерий [60]. СД служит фактором, ухудшающим отдаленные результаты артериальных реконструкций при ишемии конечности [169].

Таким образом, наличие у пациента комбинации из двух заболеваний, носящих взаимно отягощающий характер, является прогностически неблагоприятным [20]. Проблема длительно не заживающих язвенных дефектов при консервативном лечении у больных с хронической ишемией нижних конечностей на фоне нарушения углеводного обмена является крайне актуальной [90, 198]. Имеющиеся в распоряжении сосудистых хирургов средства в лечении подобных пациентов не представляются достаточными [68]. Частота ампутаций при ХИНК не имеет тенденции к снижению за последние 20 лет и в итоге выполняется более чем у 25% больных с заболеваниями периферических артерий [9].

Методом выбора для лечения пациентов с КИНК является оперативное вмешательство. Наиболее удовлетворительные результаты лечения получены у пациентов, которым проводилась прямая реваскуляризация пораженной конечности с помощью открытых, либо эндоваскулярных методик. По данным А.В. Покровского и А.С. Ивандаева за 2016 год число артериальных реконструкций на бедренно-подколенно-тибиальном сегменте постоянно увеличивается и на данный момент составляет 20965 операций, что в полтора раза больше, чем двумя годами ранее (13508 операций в 2014 году) [68, 69]. Увеличивается доля современных эндоваскулярных методов лечения, таких как баллонная ангиопластика и стентирование, достигнув величины в 8185 операций в год, что в 1,6 раз больше, чем в 2014 году (5131 операция) [68, 69].

Учитывая сопоставимые показатели эффективности открытых и рентгенохирургических операций при поражениях артерий бедренно-подколенно-тибиального сегмента, число последних остается недостаточным для удовлетворения потребности в лечении больных с КИНК, что связано со

стоимостью расходных материалов и недостаточному оснащению многих лечебных учреждений [69].

Несмотря на многочисленные способы лечения критической ишемии нижних конечностей, объем оперативного пособия при поражении дистальных сосудов крайне ограничен, а консервативная терапия обеспечивает эффект в пределах не более нескольких месяцев [188]. К сожалению, лишь половине пациентов с верифицированным диагнозом проводится реваскуляризация конечности, 25% получают консервативное лечение, остальным выполняют первичную ампутацию [60].

Неудовлетворительные результаты лечения критической ишемии, ухудшаются при ее сочетании с сахарным диабетом. Мультифокальный тип поражения сосудистой стенки с частым ярко выраженным дистальным компонентом ограничивает возможности для оперативного лечения и значительно снижает отдаленные результаты по компенсации кровообращения и сохранности конечности. Большинство пациентов с фоновой гипергликемией имеют высокие индексы периферического сопротивления, и как следствие большой процент ранних и поздних тромботических осложнений. [10].

У пациентов с КИНК на фоне СД изначально прямые шунтирующие операции выполнимы лишь у 41,8% пациентов, а тромбоз участка реконструкции составляет 41% в течение 1 года [32]. При использовании эндоваскулярных методик трехлетняя первичная проходимость в инфраингвинальном сегменте у пациентов с СД составляет 52% [37, 109].

Таким образом, современное состояние проблемы оказания медицинской помощи пациентам с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза на фоне гипергликемии диктует необходимость поиска оптимальных подходов к лечению данной нозологии.

Одним из дополнительных методов лечения является стимуляция эндогенных процессов ангиогенеза. Для улучшения перфузии тканей рассматривается трансплантация пациенту его собственных клеток предшественников. Проведено большое количество исследований

использования клеточных технологий в лечение ИБС и ХИНК [6, 77, 203]. Основоположниками применения в нашей стране клеточных технологий принято считать академиков РАН Л.А. Бокерия, Ю.Л. Шевченко и профессора С.А. Матвеева [5-7, 23]. Монография «Клеточные технологии в сердечно - сосудистой хирургии», вышедшая в 2005 году, является обобщением исследований по проблеме клеточной терапии [94].

Другим способом активации новообразования сосудов являются генные технологии. В «Национальных рекомендациях по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей» было рекомендовано использование методик стимуляции ангиогенеза, основанных на генно-инженерных технологиях [12].

В Российской Федерации в ПАО «Институт стволовых клеток человека» был разработан лечебный препарат на основе плазмиды с геном VEGF165, который содержит ген фактора роста эндотелия сосудов, который в 2011 году внесен в Государственный реестр лекарственных средств. Клинические исследования препарата на основе VEGF-165, получившего в России торговое название «Неоваскулген», II-III фазы показали отсутствие побочных и нежелательных явлений и продемонстрировал хорошие результаты лечения у пациентов со II- III стадией заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна со стороны увеличения дистанции безболевого ходьбы (ДБХ), транскутантно определяемого напряжения кислорода (ТКНК), увеличение перфузии по данным лазерной доплерофлуометрии [7, 30, 81].

В то же время отсутствуют данные о результатах лечения КИНК на фоне СД с использованием терапевтической индукции. Нет сравнения эффективности стандартной сосудистой терапии в моно компоненте и её сочетания с генной индукцией неоангиогенеза у этой группы больных.

Учитывая вышеизложенное, актуальным видится решение вопроса о включении в стандартные схемы лечения пациентов с КИНК и СД методики терапевтического ангиогенеза для оценки возможного улучшения кровообращения в ближайшем и отдаленном периоде.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза при фоновом сахарном диабете.

Задачи исследования

1. Оценить эффективность применения геннотерапевтической индукции ангиогенеза для заживления модельных дефектов кожи (язв) экспериментальных животных на фоне искусственной гипергликемии.

2. Провести оценку безопасности и эффективности комплексного подхода, включающего в себя стандартную консервативную терапию с дополнительной геннотерапевтической индукцией ангиогенеза в лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза при фоновом сахарном диабете.

3. Выявить результаты комбинированного подхода к лечению пациентов с КИНК и СД, сочетающего в себе реваскуляризацию пораженной конечности с послеоперационной геннотерапевтической индукцией ангиогенеза.

4. Сравнить эффективность включения генной индукции ангиогенеза в различные варианты лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза при фоновом сахарном диабете.

5. Сформировать алгоритм ведения пациентов с критической ишемией нижних конечностей при фоновом сахарном диабете с позиции возможности дополнительной стимуляции ангиогенеза.

Научная новизна

1. Впервые проведено экспериментальное исследование динамики заживления индуцированных язвенных дефектов у животных на фоне стойкой гипергликемии под воздействием генно-терапевтического индуктора VEGF-165.

2. Впервые в составе комплексного и комбинированного лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического

генеза и сахарным диабетом, применялась геннотерапевтическая индукция неоангиогенеза.

3. Впервые произведено сравнение безопасности и эффективности современных подходов к лечению вышеуказанной категории пациентов для определения оптимальной тактики ведения пациентов.

Научно-практическая значимость работы

1. Проведенная оценка эффективности дополнительной генной стимуляции ангиогенеза для лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей при фоновом сахарном диабете позволяет расширить подходы к лечению пациентов данной группы.

2. Сравнение эффективности включения геннотерапевтической индукции в состав комбинированного и комплексного лечения позволило сформировать оптимальную тактику ведения больных с данной нозологией.

3. Результаты исследования позволяют расширить показания к применению препарата на основе pVEGF-165 не только для II-III стадии хронической ишемии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна, но и для лечения критической ишемии, диабетической ангиопатии и улучшения динамики заживления язвенных дефектов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Геннотерапевтическая стимуляция ангиогенеза препаратом на основе плазмиды с геном VEGF-165 позволяет улучшить результаты лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротической этиологии при фоновом сахарном диабете как в составе комбинации с оперативным вмешательством, так и в составе комплексной консервативной терапии.

2. Оптимальной тактикой ведения пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета является проведение прямой реваскуляризации с послеоперационной генной индукцией ангиогенеза.

3. Результаты консервативной терапии в сочетании с генной индукцией ангиогенеза у пациентов с критической ишемией нижних

конечностей на фоне сахарного диабета сопоставимы с результатами хирургического лечения.

4. Геннотерапевтическая индукция ангиогенеза плазмидной конструкцией pVEGF-165 не вызывает развития местных и системных воспалительных реакций, а также нежелательных побочных явлений и является безопасным методом лечения.

Внедрение результатов исследования в практику и учебный процесс

Основные положения диссертации внедрены в клиническую практику и лечебный процесс отделения сосудистой хирургии ГБУ РО «Областной клинический кардиологический диспансер» и ГБУЗ МО «Коломенская ЦРБ», отделения гнойной хирургии ГБУ РО «Областная клиническая больница» и ГБУ РО «Больница скорой медицинской помощи», а так же в учебный процесс кафедры сердечно-сосудистой рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Степень достоверности результатов

Получение достоверных результатов обеспечено выполнением достаточного объема экспериментального и клинического исследования с использованием современных лабораторных (иммуногистохимический, гистологический, морфометрический) и инструментальных (ультразвуковая доплеросфигмоманометрия, ультразвуковое дуплексное сканирование с определением скорости кровотока, измерение транскутанного напряжения кислорода, ангиография) методов исследования.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на VIII и IX Всероссийской научно-практической конференции с Международным участием: «Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики синдрома диабетической стопы» (Казань, 2016 и 2017); XXI Ежегодной сессии НЦССХ им А.Н. Бакулева РАМН с Всероссийской конференцией молодых ученых (Москва, 2017); XXXIII Международной конференции Российского Общества Ангиологов и сосудистых хирургов (Сочи,

2017); Междисциплинарной межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Комплексный подход к лечению язвенно-некротических поражений конечностей сосудистого генеза» (Челябинск, 2017); Первом Съезде хирургов Центрального федерального округа Российской Федерации (Рязань, 2017); XXIII Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2017).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 28 печатных работ, из них 5 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 173 страницах и включает следующие разделы: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственного исследования (экспериментальная и клиническая часть) и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список использованной литературы, который включает 108 отечественных и 99 зарубежных источников. Материал иллюстрирован 45 рисунками, 29 таблицами и 4 клиническими примерами.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Состояние проблемы лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей в сочетании с сахарным диабетом

1.1.1 Распространенность патологии

Патология сердечно-сосудистой системы (ССС) признана главной проблемой здравоохранения в современном мире, а двадцать первый век можно охарактеризовать, как век сердечно-сосудистых заболеваний [98]. Высокая распространенность патологии ССС приобрела характер эпидемии. Социальная значимость ишемической болезни сердца (ИБС), цереброваскулярной болезни (ЦВБ) и заболеваний периферических артерий колоссальна, так же заслуживают внимания экономические аспекты, связанные с расходами на реабилитацию больных и финансовые потери, причиной которых является инвалидизация больных трудоспособного возраста.

Сердечно-сосудистые заболевания стоят первыми среди причин смерти во всем мире [107]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) за 2012 год в мире в 31% случаев причиной смертельных исходов становились ССЗ. При этом в абсолютных цифрах это 17,5 млн человек. К 2030 году, по предварительным подсчетам, в год от ССЗ будет умирать 23,3 млн человек. Из 16 млн случаев смерти от неинфекционных заболеваний в возрасте до 70 лет причиной 37% являются ССЗ [97, 98, 107].

Сахарный диабет в настоящее время приобретает характер пандемии. Распространенность СД в мире составляет до 8%, при этом частота заболевания и факторов риска увеличивается прямо пропорционально возрасту и достигает в возрастных группах старше 70 лет 100% [177].

Количество людей, больных диабетом, увеличилось со 108 млн в 1980 году до 422 млн в 2014, а его распространенность в группе лиц старше 18 лет за этот же промежуток времени возросла с 4,7% до 8,5% [101]. Каждые 10–15 лет количество больных СД удваивается, а к 2030 году диабет выйдет на 7 место среди причин смерти [158].

Известно, что СД в начальной стадии имеет латентное течение, следовательно «реальные» цифры его распространения могут быть существенно выше. В мире около 415 миллионов людей в возрасте от 20 до 79 лет страдают диабетом. В России таких больных более 12,5 млн, причем до 4 - 4,5 млн из них не знают о наличии у себя подобного заболевания [101]. СД является одной из основных причин таких осложнений как инфаркт миокарда (ИМ), острое нарушение мозгового кровоснабжения (ОНМК), почечная недостаточность и поражение периферических сосудов. Общий риск летальных исходов у пациентов, имеющих фоновый СД в анамнезе, в 2 раза превышает вероятность летального исхода у больного без данной патологии [99]. Наличие фонового сахарного диабета увеличивает риск ИМ и ОНМК в 2-3 раза и так же входит в число одной из основных причин почечной недостаточности [7]. Диабетическая периферическая нейропатия в сочетании с явлениями ишемии повышают вероятность появления на нижних конечностях язв, их последующего инфицирования, приводящих к гангрене и ампутации [171]. Причиной 4,8% случаев слепоты во всем мире признана диабетическая ретинопатия (ДР), развивающаяся в результате поражения мелких кровеносных сосудов сетчатки в течение длительного времени [121].

Хроническая ишемия нижних конечностей

Атеросклероз является причиной возникновения ХИНК в 80-90% случаев. Наиболее часто данная патология наблюдается у лиц старше 60 лет [17, 41]. В России ХИНК диагностирована у 1,5 млн человек [27]. Увеличение частоты атеросклероза в популяции соответствует повышению возраста пациентов. Количество больных атеросклерозом достигает 5-7% к 60-70 годам [80]. При этом у мужской части населения патология встречается значительно чаще во всех возрастных группах. Мужчины болеют, как минимум, в 2 раза чаще женщин [105]. Рост продолжительности жизни ведет к увеличению доли пожилого населения и сопровождается увеличением атеросклеротической патологии артерий нижних конечностей в популяции в целом [39, 76].

Ведущим симптомом проявления хронической ишемии нижних конечностей является перемежающаяся хромота (ПХ) [60].

Распространенность ПХ варьирует от 0,9 до 7,0% в зависимости от возраста, наблюдаясь в среднем у 2-3% населения [60]. В абсолютных числах по данным литературы ПХ в мире страдают 202 миллиона человек. За последние 10 лет, начиная с 2000 года, заболеваемость увеличилась на 25% [23].

Большинство пациентов, которые обращаются за помощью в лечебные учреждения имеют IIБ стадию заболевания по классификации А.В. Покровского – Фонтейна и являются основными кандидатами на оперативное лечение [60, 72]. При наблюдении за данной группой пациентов в течение 5 лет было установлено, что у 61,6% больных удалось добиться стабилизации процесса в стадии субкомпенсации, а 28,8% предъявляли жалобы на боли в нижних конечностях, 8,2% перенесли операции по реваскуляризации конечности или ампутацию, 1,4% имели трофические изменения в виде гангрены или язвы [163].

Естественным течением ХИНК при отсутствии лечения является переход заболевания в критическую ишемию, что соответствует III-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского–Фонтейна. КИНК является фазой декомпенсацией артериального кровообращения в нижних конечностях, её проявления включают в себя возникновение болей покоя и формирование язвенно-некротических изменений, на фоне показателей лодыжечного плечевого индекса (ЛПИ) $<0,4$; пальцевого АД – 30-50 мм.рт.ст.; транскутантного напряжения кислорода (ТКНК) – 30-50 мм.рт.ст. [60].

При отсутствии лечения критическая ишемия развивается у 75% пациентов, страдающих ЗПА атеросклеротического генеза [73]. В США и Европейских странах количество больных КИНК составляет 50-100 пациентов на 100 тыс. населения. При перерасчете данного показателя на население РФ (146 млн 804 тыс. человек по состоянию на 1 января 2017 года) количество больных КИНК составит 95,4 тыс. человек [125].

Наличие критической ишемии является показанием для выполнения оперативного вмешательства [69]. Учитывая характер поражения сосудистого русла атеросклеротическим процессом, только половине пациентов с верифицированным диагнозом проводится своевременная реваскуляризация конечности, 25% получают консервативное лечение, остальным выполняют первичную ампутацию [60]. При консервативном лечении в течение первых 6 месяцев только 40% пациентов сохраняют нижнюю конечность. В 20% случаев будет зарегистрирован летальный исход, остальные перенесут большую ампутацию. К концу первого года суммарно среди всех верифицированных больных с КИНК 45% сохраняют конечность, 30% будут жить после ампутации, в 25% случаев будет зарегистрирован летальный исход [60].

Неудовлетворительные результаты лечения критической ишемии, ухудшаются при ее сочетании с сахарным диабетом. На данный момент пациенты с КИНК в сочетании с сахарным диабетом являются наиболее тяжелой группой для лечения в связи с наличием мультисегментарного поражения сосудистого русла, в том числе дистальных отделов и тяжелой коморбидной патологии [10].

Ампутации у пациентов с ЗПА на фоне СД выполняются в 15–30 раз чаще, чем пациентам, не страдающим диабетом [156]. У больных с диабетом значительно снижается качество жизни после выполнения ампутации, а 5-летняя летальность составляет 50% [115]. Примерно у 10% больных СД пожилого возраста имеется гангрена или язва стопы. При синдроме диабетической стопы 55% язв у больных сахарным диабетом развиваются на фоне критической ишемии нижних конечностей [141].

Одна из причин, ухудшающая результаты лечения пациентов с КИНК и СД - это сочетание атеросклеротического повреждения артерий конечностей и нейропатии [169]. Диабетической нейропатией (ДН) расстройство нервной системы, связанное с поражением при диабете малых кровеносных сосудов (*vasa vasorum, vasa nervorum*), которое проявляется нарушением сенсорной, моторной и вегетативной иннервации и встречается у половины пациентов с

СД [189]. Сочетание нейропатии с КИНК увеличивает возможные риски развития неблагоприятных исходов в десятки раз [170, 174].

Число пациентов с КИНК на фоне СД, имеющих нереконструктабельное сосудистое русло, по причине поражения дистальных отделов, по данным различных авторов может достигать 80% [5, 33]. Такие больные обречены на выполнение высоких ампутаций. Арсенал терапевтических и хирургических методов лечения, а так же возможности их применения являются недостаточными у данной группы пациентов, в связи с чем, необходима разработка и внедрение новых методов лечения, направленных на сохранение конечности, увеличение продолжительности жизни и ее качества [33, 34]. В настоящее время идет активное накопления материалов по возможностям терапевтического ангиогенеза у пациентов с КИНК и СД [181]. Инновационный подход к лечению больных с КИНК и СД, связанный с генными технологиями индукции ангиогенеза, может позволить улучшить результаты лечения [37].

1.1.2 Влияние хронической гипергликемии на метаболизм, ангиогенез и регенерацию

Хроническая гипергликемия влияет на сосудистую стенку на макро- и микроуровнях. Гипергликемия активизирует сорбитоловый путь окисления, при этом образуются осмотически активные сорбитол и фруктоза, что вызывает перерастяжение, деформацию, набухание клеток и сопровождается нарушением их функциональной активности. Являясь активными осмотическими веществами, фруктоза и сорбит привлекают на себя воду, вызывают выраженный гиперосмолярный отек и дальнейшие нарушения в заинтересованных тканях [3, 84].

Эндотелиальная дисфункция (ЭД) неотъемлемый патологический компонент тканевой гипергликемии [129]. При хронической гипергликемии в первую очередь нарушается выработка сосудистого эндотелий зависимого релаксирующего фактора – оксида азота (NO) [129] (таблица 1).

Таблица 1

Влияние гипергликемии на эндотелиальную дисфункцию

Гипергликемия			
Снижение выработки и ускорение распада NO			
Повышение проницаемости клеток эндотелия для лейкоцитов	Пролиферация гладкомышечных клеток	Повышение агрегации тромбоцитов	Повышение экспрессии молекул адгезии на поверхности эндотелиоцитов

При гипергликемии увеличивается количество свободных радикалов, которые усиливают миграцию лейкоцитов через эндотелий, повышают темпы синтеза супероксид аниона митохондриями, что приводит к активации протеинкиназы C [47]. Моноциты мигрируют в субэндотелиальное пространство с образованием пенистых клеток в области бляшки, склонность к разрушению которой увеличивается. Цитокины повышают содержание в крови таких маркеров воспаления как С-реактивный белок, стимулируют разрушение коллагена и разрыв фиброзной покрышки бляшки, ухудшают липидный профиль [25].

Повышение концентрации глюкозы влияет на систему гемостаза и функцию тромбоцитов. При гипергликемии наблюдаются нарушения в коагуляции крови в сторону ее увеличения (таблица 2).

Таблица 2

Влияние гипергликемии на систему гемостаза

Гипергликемия	увеличение агрегационной активности тромбоцитов
	нарушение синтеза тканевого активатора плазминогена
	снижение фибринолитической активности
	гиперфибриногенемия
	повышение фактора фон Виллебранда

Гиперпродукция инсулина усиливает митотическое деление фибробластов, макрофагов и гладкомышечных клетки сосудистой стенки. Кроме того, происходит гликирование белков плазмы крови и стенок сосудов (апопротеинов), повышается их атерогенность [184]. При нарушении

углеводного обмена, не остается в стороне и жировой обмен. Дислипидемия заключается в увеличении концентрации липопротеинов низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП), снижении уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [24].

Наслаивающаяся при этом активация агрегации тромбоцитов приводит к быстрому развитию атеросклероза в сосудах большого и среднего диаметра. Вышеизложенный комплекс метаболических изменений приводит к явлению, названному макроангиопатией [51, 79].

Наиболее значительными функциональными нарушениями при микроангиопатии являются изменение вязкости крови, нарушение функции тромбоцитов, повышение проницаемости сосудистой стенки, гемодинамические нарушения [200]. Происходит плазморрагическое повреждение базальной мембраны микроциркуляторного русла. Изменения в системе мелких сосудов, носят функциональный и структурный характер. Важнейшая особенность изменения в сосудистой стенке – утолщение базальной мембраны капилляров. В результате повышения концентрации глико- и мукопротеидов, которые накапливаются в соединительной ткани, образуется гиалиноподобное вещество, повреждается сосудистая стенка. Возникают явления стромально–сосудистой (мезенхимальной) дистрофии. Процесс завершается склерозом и гиалинозом. Иногда выраженная пролиферация эндотелия сочетается с лимфогистиоцитарной инфильтрацией стенки микрососуда, что позволяет говорить о развитии васкулита [51, 79].

Понятие васкуло-, ангио-, ангиогенеза и влияние на них гипергликемии.

Васкулогенез представляет собой формирование сосудов *de novo* из эндотелиальных клеток-предшественниц (ЭКП) [183]. В настоящее время не вызывает сомнения, что процесс васкулогенеза возможен не только в эмбриональном периоде, но и в постэмбиональном развитии организма [140, 186].

При возникновении повреждения, воспаления, ишемии в тканях происходит мобилизация гемопоэтических клеток костного мозга в

периферический кровоток. Основными механизмами передачи сигнала служат гранулоцитарный и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующие факторы, ангиопоэтин-1, эритропоэтин, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), и другие регуляторы [55]. Таким образом, происходит миграция и накопление ЭКП в «зоне интересов» с последующей дифференцировкой в эндотелиоциты. Образующаяся сеть эндотелиоцитов в последующем служит для процессов ангиогенеза [57]. Процессы васкулогенеза происходят во взрослом организме наряду с ангио- и артериогенезом. Васкулогенез является триггерным фактором процессов как физиологической (в ишемизированных тканях), так и патологической (диабетическая ретинопатия, опухолевые процессы) неоваскуляризации [124, 132].

Ангиогенез - развитие новых капилляров из ранее существующих сосудов путем пролиферации эндотелиальных клеток (ЭК) из состава сосудистой стенки. Процесс ангиогенеза протекает в несколько этапов при взаимодействии компонентов клеточного матрикса, растворимых факторов и клеток [48].

Недостаток кислорода (гипоксия или ишемия) является триггерным фактором ангиогенеза, в результате которого происходит транскрипция индуцируемого гипоксией фактора-1 α (HIF-1 α), который активирует фактор сосудистый эндотелиальный фактор роста и его рецепторы (VEGFR1 и VEGFR2).

VEGF запускает экспрессию матриксных металлопротеиназ (ММП), которые влияют на деградацию базальной мембраны и окружающего внеклеточного матрикса, что делает возможным включить в процесс эндотелиальные клетки [161]. ЭК пролиферируют в виде либо отдельных почечек роста, формирующих просвет сосуда, либо выпячиваний капиллярной стенки в просвет сосуда. Кроме того, VEGF способствует вазодилатации за счет усиления продукции NO [63].

Далее следует процесс стабилизации и «взросления» новообразованной сосудистой сети, в котором принимают участие ангиопоэтины, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF),

трансформирующий фактор роста β (TGF- β) и другие факторы [63]. TGF- β в эндотелиальных клетках потенцирует развитие дозозависимого апоптоза, а в гладкомышечных клетках ингибирует апоптоз [111]. Ангиопоэтин-1 влияет на стабилизацию сосуда путем привлечения гладкомышечных клеток, уменьшением проницаемости сосуда, подавлением пролиферации ЭК и суммации перицитов [122] (таблица 3).

Таблица 3

Схема ангиогенеза

Новообразование сосудов под воздействием VEGF	
1	Связывание VEGF с Flt-1 или Flk-1
2	Фосфорилирование и активация рецепторных тирозинкиназ
3	Растворение протеолитическими ферментами базальной мембраны эндотелия
4	Растворение ММП межклеточного матрикса
5	Пролиферация и миграция ЭК через базальную мембрану в зону ишемии
6	Образование трубчатых структур за счет связей эндотелиоцитов между собой
7	Формирование сосудистых петель
8	Дифференцировка сосудистых петель на артериальные и венозные сосуды
9	«Созревание» стенки кровеносного сосуда за счет формирования окончательной структуры гладкомышечными клетками и перицитами и стабилизация сосудистой архитектуры.
10	Стабилизация паравазального пространства
11	Начало тока крови

Артериогенез заключается в активном росте уже имеющихся сосудов за счет увеличения их диаметра и превращения артериол в «шунтирующие» артерии. Стимуляция артериогенеза происходит за счет увеличения напряжения сдвига над местом окклюзии [148]. При закрытии основной магистральной артерии происходит увеличение кровотока по коллатералям и увеличения градиента давления в них.

При этом клетками эндотелия экспрессируются молекулы адгезии и накапливаются моноциты, которые секретируют большое количество факторов

роста, в том числе VEGF, FGF, PDGF и СХС-хемокины [148]. При ангиогенезе происходит увеличение в размере коллатеральных артерий за счет пролиферации и ремоделирования. Таким образом, увеличивается количество крови, доставляемое к постокклюзионному участку [138].

При СД возникает «диабетический парадокс», заключающийся в развитии патологического избыточного ангиогенеза высокопроницаемых сосудов в сетчатке глаза (диабетическая ретинопатия) и развитии недостаточного адаптивного ангио-артериогенеза в сердце и мышцах нижних конечностей, способствующий тяжелой ишемии, незаживающим трофическим язвам и ампутациям [123, 192, 199].

Основные клетки, определяющие процесс неоваскулогенеза – эндотелиальные клетки. При культивировании ЭК *in vitro* в среде с нормальной и повышенной концентрацией глюкозы в последней происходит достоверное подавление способности ЭК к направленной миграции на VEGF и сыворотку [194]. Так же нарушается способность клеток к капиллярогенезу (уменьшение количества формирования капилляроподобных структур ЭК на Матригеле в четыре раза). Снижение капиллярогенеза связано с нарушением экспрессии рецепторов к VEGF на ЭК. При этом снижается не только экспрессия рецепторов VEGF на уровне мРНК, но и уменьшается их количество на поверхности ЭК [61].

Второй тип клеток сосудистой стенки, задействованных в процессе неоваскулогенеза мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК). Гипергликемия не изменяет их способность к пролиферации, не увеличивает апоптоз и не влияет на миграцию. Однако происходит снижение суммарной способности продуктов секреции ММСК, стимулировать капиллярогенез *in vitro*, что может быть обусловлено возрастанием экспрессии плазминогена с параллельным повышением активности ММП, которые расщепляют плазминоген с образованием мощного ингибитора ангиогенеза — ангиостатина [61]. Так же избыток глюкозы уменьшает способность ММСК стимулировать ангиогенез через паракринную активность [113]. Кроме

перечисленных выше механизмов влияния на ангиогенез показано, что гипергликемия нарушает выработку VEGF эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). В эксперименте на мышах с СД установлено, что выраженность нарушения продукции VEGF и интенсивности ангиогенеза в зоне ишемии тазовых конечностей зависит как от уровня, так и от колебания диапазона показателей глюкозы крови [119, 182].

Третий тип клеток, задействованных в реорганизации сосудистого русла циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток (ЦПЭК). Наименьшее их содержание обнаружено у больных СД II типа с хронической ишемией нижних конечностей [134]. На сегодняшний день главными причинами уменьшения числа ЦПЭК при гипергликемии считается нарушение их мобилизации и повышение апоптоза [135, 139]. Моделирование гипергликемии *in vitro* снижает пролиферацию и увеличивает апоптоз ЦПЭК. Поздние продукты гликирования так же обладают проапоптотическим действием [128, 166]. Как следствие снижается ангиогенный потенциал, уменьшается способность к пролиферации, миграции, внедрению в формирующиеся сосуды. Происходит нарушение дифференцировки ЭПК в эндотелиоциты под влиянием SDF-1 [135].

Кроме того, по данным многих исследований, нарушение мобилизации, пролиферации и повышенный апоптоз ЦПЭК у животных с моделированным СД ассоциированы с замедленным заживлением ран [114, 149].

Влияние гипергликемии на регенерацию

Стандартный процесс заживления кожных ран происходит по определенному алгоритму, который начинается с гемостаза и образования струпа. Далее следует очищение раны от инородных тел, погибших тканей и микроорганизмов. Завершается процесс репарации формированием грануляционной ткани, заполняющей дефект, которая со временем дифференцируется и становится способна выполнять все функции кожных покровов [85, 87].

В процессе репарации существуют определенные фазы, выделение которых основано на морфологических изменениях в ходе процесса заживления. Современная классификация раневого процесса выделяет фазы: альтерации; экссудации (остановка кровотечения и очистка раны); пролиферации (развитие грануляционной ткани); дифференциации (образование рубца) и эпителизации [49].

На молекулярном уровне при хронической гипергликемии нарушается выработка факторов роста тромбоцитами, макрофагами, фибробластами и ЭК. Факторы роста при процессах репарации оказывают позитивное действие на миграцию и пролиферацию ЭК. Снижение синтеза EGF, PDGF, TGF-beta, VEGF, FGF, негативно влияет на темпы заживления раневых дефектов и усугубляет скудные процессы ангиогенеза [110, 118, 187]. Преобладание воспалительных процессов при длительном заживлении раны приводит к избыточной выработке ММП, вызывающих деградацию внеклеточного матрикса и ухудшению регенерации тканей [142].

На клеточном уровне наблюдается нарушение способности полиморфоядерных лейкоцитов (ПЯЛ), обеспечивающих первую линию защиты против раневой инфекции, осуществлять эффективный фагоцитоз. В основе расстройств функции ПЯЛ лежат дефицит внутриклеточного образования макроэргических соединений, нарушение опсонизации бактерий и снижение синтеза лецитина, необходимого для восстановления клеточной мембраны в процессе фагоцитоза [136]. Для ПЯЛ так же характерно нарушение хемотаксиса у больных диабетом, обусловленного снижением уровня иммуноглобулинов и недостаточностью компонентов комплемента. Экспозиции инсулина и глюкозы *in vitro* и *in vivo* улучшают хемотаксис ПЯЛ, однако данные эффекты не являются последовательными [53].

При наличии стойкой гипергликемии репарация характеризуется так же расстройствами микроциркуляции (формированием сладж-феномена, микротромбообразованием) [45].

Патогенез длительно незаживающей раны на тканевом уровне заключается в преобладании процессов воспаления над репарацией, наличии признаков одновременно всех 3 фаз раневого процесса. Одновременное покрытие фибрином и грануляциями дна раны, наличие участков некроза и гнойного отделяемого. В ране грануляции вялые и бледные, края раны и ткани вокруг уплотнены; часто имеет место краевая эпителизация [21, 45].

Таким образом, наличие высокой концентрации глюкозы в крови вызывает запуск множества патологически измененных путей утилизации энергии, происходит нарушение всех видов обменов в тканях и как следствие нарушаются основные механизмы адаптации организма человека к условиям гипоксии. Снижается способность реагировать на возникновение ишемии в тканях, нарушаются процессы васкуло – и ангиогенеза. Кроме того, происходит нарушение процессов грануляции, что вместе с нарушением перфузии дистальных отделов приводит к возникновению длительно незаживающих дефектов кожных покровов. Основные патогенетические механизмы нарушений заключаются в блокировке экспрессии различных факторов, участвующих в нормальном ответе организма на ишемию и повреждение. Учитывая изложенные выше данные, на молекулярном уровне, перспективным видится использование у таких пациентов в лечении рекомбинантных факторов роста, клеточных и генных технологии.

1.2 Современные подходы к лечению пациентов с КИНК на фоне хронической гипергликемии

Лечение пациентов с периферическим атеросклерозом представляет собой актуальную задачу для современной медицины. Важность вопроса обусловлена частотой ЗПА атеросклеротического генеза, тенденцией заболевания к прогрессирующему течению, трудностями диагностики начальных стадий заболевания, длительностью лечения и высокой степенью инвалидизации данной группы пациентов, и, как следствие, важной социальной и экономической значимостью [201]. Основной подход для улучшения перфузии

у пациентов с КИНК – хирургическая реваскуляризация конечности, но и консервативная терапия является неотъемлемой частью лечения.

1.2.1 Консервативная терапия

Основные принципы консервативного лечения пациентов с КИНК: модификация факторов риска и отказ от курения, липидоснижающая, антигипертензивная, антиагрегантная, гомоцистеин - снижающая терапия, лечебная физкультура. Снижения глюкозы крови и поддержание ее на нормальном уровне. Фармакотерапия КИНК заключается в приеме препаратов простагландинов, пентоксифиллина, цилостазола, сулодексида, ингибиторов плазминогена и генных методов лечения [57, 60, 103, 108, 164].

Лечение пациентов данной группы пожизненное и должно начинаться с модификации или полного исключения факторов риска: табакокурение, сахарный диабет, дислипидемия и артериальная гипертензия, а также поддержание ежедневной физической активности и соблюдение неатерогенной диеты [204]. Эти принципы имеют отношение к построению программ лечения всех стадий ЗАНК.

Одним из ведущих факторов риска, подлежащего коррекции является отказ от курения. Необходимо информировать больных о необходимости изменения образа жизни, модификации поведения, никотинзависимой терапии бупропионом, варениклином (уровень доказательности В (КЛАСС I)) [60, 190].

Всем пациентам с КИНК на фоне сахарного диабета показан контроль гликемии с целью уменьшения уровня гликозилированного гемоглобина до 6% и менее, как метод эффективной профилактики микрососудистых осложнений и улучшения сердечно-сосудистого исхода. (уровень доказательности С (КЛАСС IIА)) [60, 103]. Рекомендован надлежащий уход за стопами, а любое повреждение кожи, появление изъязвлений требует немедленного лечения (уровень доказательности В (КЛАСС I)) [60, 103]. При возникновении трофических нарушений кожных покровов к лечению присоединяются перевязки, неоднократные обработки ран с освобождением их от

некротических тканей, разгрузка стопы, включение антибиотикотерапии при присоединении инфекции [126].

Лечение ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы (статины) рекомендуется всем пациентам с ЗПА для достижения целевого уровня [193]. При сопутствующем сахарном диабете целевое значение ХС<4,5 ммоль/л; ЛПНП<1,8 ммоль/л; триглицериды<1,7 ммоль/л; ЛПВП>1,0 ммоль/л (для мужчин) >1,2 ммоль/л (для женщин) [60, 103]. В терапии пациентов с низким уровнем ЛПВП, нормальным уровнем ЛПНП и повышенным уровнем ТГ рекомендуется использование фибратов (уровень доказательности С (КЛАСС II)). Нормализация показателей жирового спектра позволяет снизить риск общей коронарной смертности и улучшить течение атеросклеротического процесса [70].

Так же важным фактором является контроль уровня артериального давления (АД). Оптимальным считается поддержание цифр АД ниже 140/90 мм.рт.ст., а при наличие таких состояний, как сахарный диабет цифры АД должны быть снижены до 130/80 мм.рт.ст. (уровень доказательности А (КЛАСС I)). Основными группами препаратов, снижающих риск развития фатальных сердечно-сосудистых осложнений являются ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (уровень доказательности В (КЛАСС II)). Консервативная терапия так же должна быть направлена на профилактику тромботических осложнений длительным приемом антиагрегантных препаратов. Тромбоциты, стимулируя пролиферацию фибробластов и рост гладкомышечных клеток, тем самым вызывают рост бляшки с одной стороны, а с другой стороны при разрыве бляшки вызывают запуск каскада формирования тромба внутри сосуда с последующей его окклюзией [82]. Для предотвращения данных процессов пациентам показан прием аспирина (75-325 мг/сут), либо клопидогреля (75 мг/сут) для снижения риска инфаркта миокарда (ИМ), инсульта и сердечной смерти (уровень доказательности А (КЛАСС I)) [60, 103]. Данные препараты являются представителями разных классов (ингибиторы циклооксигеназы и

тиенопиридинов соответственно). Некоторые пациенты склонны к нечувствительности к отдельным группам препаратов, поэтому перед назначением лечения необходимо определять чувствительность к назначаемому препарату [50].

Вазоактивная терапия КИНК, при невозможности хирургического лечения, заключается, прежде всего, в применении препаратов простагландина E1 (PGE1) и простаглицина I2 (PGI2). Парентеральное введение данных препаратов может снизить боли в конечности в покое, ночные боли, способствовать заживлению некрозов, и, как следствие, позволяет отсрочить или избежать ампутацию (уровень доказательности A (КЛАСС IIB)) [60, 103]. По данным метаанализа 7 рандомизированных исследований терапия PGE1 способствовало уменьшению боли и заживлению язв по сравнению с плацебо (47,8% для PGE1 и 25,2% для плацебо, $p=0,0294$). Так же в полугодовом периоде наблюдения после лечения наблюдаются лучшие показатели PGE1 по конечной точке «большая ампутация и смерть» (22,6% для PGE1 по сравнению с 36,6% для плацебо, $p=0,015$) [131]. Результат мета-анализа рандомизированных контролируемых исследований PGI2, показал, что лечение PGI2 статистически значимо снижает боли покоя и стимулирует эпителизацию и снижает частоту ампутаций (23% в группе исследуемого препарата по сравнению с 39%, $p<0,05$). Кроме того, пациенты в группе илопроста имели значительно большую вероятность выжить и сохранить обе нижние конечности в течение наблюдаемого периода (35% по сравнению с 55%, $p<0,05$) [157]. Важно заметить, что пациенты с сопутствующим сахарным диабетом лучше реагировали на терапию илпростом [86].

В терапии КИНК перспективным видится использование регионарного катетерного тромболиза, в особенности у пациентов с гипергликемией. Применение урокиназы у больных с КИНК на фоне диабетической макро- и микроангиопатии показывает обнадеживающие результаты [4, 8].

Точки приложения тромболитической терапии профилактика и лечение процессов микротромбообразования, длительное снижение концентрации

фибриногена, снижения процессов ПОЛ, эндотелиальной интоксикации и стабилизация коагуляционных свойств крови. Конечные точки эффективности: заживление раневых дефектов, снижение числа ампутации и смертельных исходов [36].

Так же перспективным является использование терапии, направленной на коррекцию дисфункции эндотелия и стимуляцию оксида азота. При КИНК с фоновой гипергликемией процессы эндогенного высвобождения оксида азота нарушаются в большей степени, чем при нормальном уровне глюкозы. Повреждение эндотелия и нарушение работы эндотелий - зависимой NO - синтазы можно рассматривать, как один из начальных механизмов повреждения сосудов [40]. Терапия, направленная на коррекцию ЭД и увеличение выработки NO оказывает положительное влияние не только на пациентов с ПХ, но и при более тяжелых степенях декомпенсации кровообращения. В коррекции ЭД используют методы интермиттирующей пневмокомпрессии [92], включение в схемы лечения гипотензивных препаратов из группы ингибиторов АПФ (пириндоприл) [146], блокаторов рецепторов ангиотензина – II (лозартан) [42, 154], β -адреноблокаторов (небиволол) [137, 196]. Использование препаратов данных групп особенно важно, учитывая частую сопутствующую патологию в виде ГБ, ИБС, ХСН. Лекарственные средства, используемые для лечения ЭД, не противопоказаны для пациентов с КИНК и являются эффективными антигипертензивными препаратами, снижающими риск сосудистых осложнений и улучшающих прогноз [60, 103].

Дополнительные методы консервативного лечения критической ишемии - гипербарическая оксигенация и физиотерапия (лазеро- и магнитотерапия) не имеют под собой конкретных исследований с подтвержденной эффективностью. В документе TASC указано, что у данных методов отсутствует доказательная база относительно использования их у пациентов с КИНК [57, 103].

Применение сулодексида (250 ЛЕ перорально 2 раза в день) возможно у пациентов с КИНК. Эффективность препарата основана на снижении адгезии

тромбоцитов к стенке сосуда, снижении их агрегации, ингибирования антитромбина III и через кофактор II гепарина — фактор Ха и тромбина. Сулодексид повышает высвобождение тканевого активатора плазминогена и снижает активность его ингибитора. Установлено положительное влияние препаратов сулодексида при диабетической ангиопатии. Лечение препаратами сулодексида увеличивает ДБХ у пациентов с ПХ до 95% [46, 60, 103].

Эффективность ангиогенных факторов роста и геннотерапевтических препаратов для лечения КИНК изучена в открытых плацебо-контролируемых исследованиях с использованием внутриартериального введения VEGF - плазмидных ДНК (phVEGF165). У некоторых больных были получены ангиографически и гистологически подтвержденные формирования новых сосудов и заживление ишемических язв. Так же была показана безопасность использования геннотерапевтических методов стимуляции ангиогенеза и в частности, препарата на основе pVEGF-165, в комплексном лечении пациентов с КИНК по улучшению отдаленных результатов хирургических вмешательств [74]. В последних рекомендация по лечению пациентов с патологией артерий нижних конечностей использование геннотерапевтических конструкций было отнесено к уровню доказательности C (КЛАСС IIB) [17], Что говорит о дальнейшей необходимости внедрения данной методики в лечение пациентов с накоплением более обширных данных по отдаленным результатам лечения.

Более подробный анализ результатов исследований по применению терапевтического ангиогенеза в комбинированном и комплексном подходе к лечению пациентов с ХИНК, будет разобран при сопоставлении литературных данных с результатами собственного исследования в разделе обсуждение результатов.

1.2.2 Хирургические методы лечения пациентов с КИНК на фоне гипергликемии

Наличие у пациента критической ишемии (III-IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна) является абсолютным показанием для поиска вариантов оперативного лечения. Наиболее эффективным методом

лечения данной группы пациентов является реваскуляризация конечности [69]. Хирургическая реваскуляризация позволяет купировать, либо уменьшить клинические проявления ишемического синдрома и должна проводиться у большинства пациентов, имеющих клиническую картину критической ишемии, соответствующие показания и отсутствие противопоказаний к операции [60]. На современном этапе существует множество различных вариантов реваскуляризации и определенные аспекты стратегий в выборе метода лечения, которые зависят не столько от тяжести течения заболевания, сколько от локализации сосудистого поражения [103].

Основная задача любого оперативного лечения улучшение перфузии периферических тканей, находящихся в состоянии ишемии.

Наилучшим вариантом открытой операции в такой ситуации является прямая реваскуляризация [60, 103]. Она может быть достигнута путем восстановления просвета магистрального сосуда (открытая, полузакрытая, петлевая эндартерэктомия) или путем формирования обходного «шунтирующего» пути доставки крови к месту ишемии. При невозможности выполнения реконструкции могут быть выполнены операции не прямой реваскуляризации (артериализация венозного кровотока стопы [51, 52], имплантация сальника на сосудистой ножке [59], реваскуляризирующая остеотрепанация костей голени [75], поясничная симпатэктомия [14]).

К эндоваскулярным вмешательствам относятся: реканализация, ангиопластика, эндопротезирование артерий [35]. Так же существуют «гибридные» операции, сочетающие в себе открытую и эндоваскулярную техники.

Для каждого вида операции существуют свои показания и противопоказания. Выбор метода оперативного вмешательства и его характер определяется согласно рекомендациям TASC II и Российским рекомендациям по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией в зависимости от уровня и степени поражения, длины стенозированного или окклюзионного участка, наличия путей притока и оттока [57]. Всего выделены четыре типа

поражения артерий нижних конечностей по TASC II (A, B, C, D). Для каждого сегмента артерий нижних конечностей (аортоподвздошного, бедренно-подколенного, артерии голени) существуют критерии, по которым то или иное поражение можно отнести к соответствующей группе для определения предпочтительного подхода к реваскуляризации конечности [179].

Главной проблемой на пути к успешной реваскуляризации пораженной конечности является частое отсутствие адекватных путей оттока ниже места критического стеноза или окклюзии при многоуровневом характере поражения сосудистого русла, проявляющееся в высоком общем периферическом сопротивлении сосудов (ОПСС).

Наиболее остро данная проблема проявляется у пациентов с наличием фоновой гипергликемии. При сопутствующем сахарном диабете у пациентов наиболее часто имеется либо изолированное поражение артерий голени, либо сочетание поражений бедренно-подколенно-берцового сегмента. У больных с дистальным типом поражения развивается компенсаторная сеть коллатералей, снижая ОПСС, однако этого не происходит при наличии диабетической микроангиопатии. По данным различных авторов доля пациентов с дистальным типом поражения на фоне сахарного диабета достигает до 80% [5].

Изначально прямые шунтирующие операции при КИНК на фоне СД выполнимы лишь у 41,8% пациентов, из них дистальные шунтирования составляют 56% (бедренно-подколенное – 37,5%, бедренно-берцовое – 18,5%). Тромбоз участка реконструкции достигает 16% – в ближайшем периоде, еще 25% – в течение 1 года после выполнения операции (41% за год), а послеоперационная летальность составляет 3,2% [32].

По данным других авторов, периоперационная летальность достигает 14%, а частота выполнения высоких ампутаций, колеблется от 8,8 до 20,4% в течение 6 месяцев после вмешательства [26, 32, 71]. Пятилетняя выживаемость не превышает 57–87%, а десятилетняя 30–70% [83].

В виду изложенных выше причин прямая реваскуляризация у пациентов с критической ишемией на фоне СД показывает неудовлетворительные результаты [71].

Другим вариантом лечения пациентов с КИНК при СД являются эндоваскулярные методики. В исследовании BASIL по сравнению результатов лечения пациентов с КИНК с помощью чрескожной транслюминальной баллонной ангиопластики (ЧТБА) и шунтирующих операций через год после операции 71% после ЧТБА и 68% пациентов после открытой операции не были подвергнуты ампутации. Через 3 года 52 и 57%, соответственно [109]. Однако следует обратить внимание на преимущество эндоваскулярных методик при дистальных типах поражения. Бедренно-подколенное шунтирование ниже коленного сустава и бедренно-берцовые шунтирования позволяют достичь удовлетворительный результат в 53-93% случаев, в зависимости от выбранного материала. А при ЧТБА инфраингвинальной зоны технически успешный результат достигается в 85-100% случаев, клинический эффект варьирует в пределах 65-91%. При этом сохранение конечности достигается у 70-78% пациентов [19]. В другом исследовании отдаленных результатов эффективности ЧТБА при поражении артерий голени сохранение конечности составило 85-91% в течение 2-5 лет после вмешательства [133].

В связи с вышеизложенными данными можно сделать вывод о преимуществе эндоваскулярных методик при дистальном типе поражения сосудистого русла.

В виду отсутствия путей оттока возможным вариантом хирургического лечения является использование методики артериализации венозного русла. Однако удовлетворительные результаты показаны в большей степени при лечении облитерирующего тромбангиита и лишь в нескольких учреждениях, специализирующихся на выполнении данных вмешательств. Данную операцию необходимо выполнять в центрах с большим опытом подобных реконструкций (уровень доказательности С) и вопрос о ее эффективности относительно использования у данной когорты пациентов остается дискуссионным [65].

Так же использование методики аутотрансплантации большого сальника и кожно-мышечного лоскута, показало свою эффективность для пациентов с КИНК на фоне облитерирующего тромбангиита, однако для больных с КИНК атеросклеротического генеза эта операция малоэффективна (уровень доказательности С) [63].

Методика поясничной симпатэктомии может улучшить периферическую гемодинамику за счет снижения сопротивления пульсовой волны со стороны мелких и мельчайших сосудов. Частота применения ПСЭ при КИНК достигает 18% от всего объема оперативных вмешательств, при этом положительные результаты достигаются в 30-72% в ближайшем послеоперационном периоде, и в 32-68% в отдаленном [14, 19].

Еще одним методом хирургического лечения служит реваскуляризирующая остеотрепанация. Механизм действия заключается в рефлекторном воздействии на надкостницу, уменьшении спазма артерий и раскрытию существующих коллатералей в ближайшем периоде. Развитие новых коллатеральных путей кровотока происходит через 3-4 месяца после операции [38]. Удельный вес данной операции составляет 6,5% от всех хирургических вмешательств, количество высоких ампутаций после данной операции составляет 39% [41].

Один из факторов мешающих успешному восстановлению кровотока – многоуровневое поражение сосудистого русла, по этой причине не происходит компенсации кровоснабжения, и прогрессируют явления ишемии [116]. Препятствием для удачной реконструкции служит выраженность поражения дистального русла по причине высокого риска раннего тромбообразования [13]. Кроме того, важную роль играет наличие развитой сети коллатералей, являющейся руслом для приема крови и участвующей в трофике тканей [83]. При оценке состояния периферического русла перед операцией следует использовать бальную классификацию путей оттока по Рутерфорду, в которой 0 баллов соответствует неизменным артериям, а 10 баллов обозначает отсутствие приема [175]. Считается, что на каждый балл приходится 10% риска

тромбообразования в послеоперационном периоде, а критическое значение для возможной попытки реваскуляризации 8 баллов [67].

Так же на восстановление кровообращения влияет степень поражения микроциркуляторного русла (МЦР) в ишемизированных тканях. При КИНК происходит ремоделирование сосудов МЦР, снижение ангиогенеза и выработки VEGF, нарушении функции эндотелия [54]. Нарушается структура капилляров, происходит закручивание артериальных и венозных отделов вокруг друг друга, переходный отдел выглядит в виде «спичечной головки». Диаметр капилляров уменьшается, снижается плотность сети, увеличивается периваскулярная зона и снижается скорость капиллярного кровотока. Вышеизложенные изменения объединяются в понятие «микроциркуляторной дисфункции». Микроциркуляторная дисфункция способна восстанавливаться при реваскуляризации конечности [159]. После успешного оперативного лечения увеличивается регионарное систолическое давление и перфузия тканей, отсутствие клинического эффекта говорит либо о неэффективности операции, либо о необратимом изменении в капиллярном русле [96].

1.3 Место терапевтического ангиогенеза в лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей в сочетании с сахарным диабетом

Один из наиболее активно развивающихся методов лечения тяжелой группы пациентов с КИНК является стимуляция эндогенных процессов роста сосудов с помощью экзогенного воздействия [62, 160]. Данный механизм, затрагивающий индукцию ангиогенеза, принципиально отличается от основных точек приложения стандартных методов консервативного и хирургического лечения.

Основные средства терапевтического ангиогенеза - это рекомбинантные факторы роста, клеточная и генная терапия. Наиболее изученными методами терапевтического ангиогенеза в лечении пациентов с ХИНК являются геннотерапевтические методы [23].

1.3.1 Генная терапия

Лечение пациентов заключается во введение в клетку, находящуюся в области ишемии, с помощью векторной системы терапевтического гена. Внутри клетки происходит встраивание терапевтического генома в структуру мРНК с последующей его транскрипцией. Методы генной терапии работают в тканях до нескольких недель, обеспечивают длительное повышение содержания кодируемого ангиогенного фактора в месте введения, благодаря этому механизму действия исключаются многократные повторные инъекции препарата и снижается риск сенсибилизации организма [64].

При разработки геннотерапевтических препаратов используются наиболее изученные факторы, участвующие в ангиогенезе – VEGF, FGF, HFG, HIF-1 α [117].

В США, Азии и Европе конструкции с геном VEGF-165 прошли 2 фазу клинических испытаний в нескольких центрах. Препарат показал хорошую переносимость и безопасность при использовании, как для ИБС, так и для ХИНК [7, 81, 153]. Так же в США завершилось I фаза исследования препарата на основе ДНК – плазмиды с геном VEGF-A, предназначенного для лечения ХИНК, где так же была доказана безопасность использования данного препарата [58].

Клинические исследования препарата на основе pVEGF-165 II-III фазы проводилась одновременно на базах трех медицинских центров, по результатам которого препарат показал отсутствие побочных и нежелательных явлений и продемонстрировал хорошие результаты лечения для пациентов со II-III стадией заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна со стороны увеличения ДБХ, ТКНК, увеличение перфузии по данным лазерной доплерофлуометрии [30]. При этом пациенты, включенные в исследование имели непригодное для реконструкции сосудистое русло, наличие трофических изменений кожных покровов на нижних конечностях являлось критерием исключения из исследования, и не проводилось анализа показателей у пациентов с сопутствующим сахарным диабетом.

Другим геном, включаемым в состав плазмид, является FGF [165]. В нескольких исследованиях доказывалась безопасность введения препарата с FGF-1 при внутримышечном введении при ХИНК, в том числе КИНК. В 2011 году была завершена III фаза клинических исследований данного препарата в 32 странах при лечении пациентов с КИНК и язвенными дефектами кожных покровов. Однако при данном исследовании за промежуток времени в 1 год не было выявлено достоверных отличий в терапии между испытуемой и контрольной группой в конечной эффективности по выживаемости и частоты ампутации [165, 117].

Исследуется эффективность препаратов с геном HGF в США, Кореи и Китае прошла II-III фаза клинических испытаний, в которых препарат показал уменьшение язв нижних конечностей, снижение болей покоя, прирост ЛПИ, повышение качества жизни [168, 180].

Клинические исследования, посвященные применению гена HIF-1 α с аденовирусным вектором оказались малоэффективными. На сроках до 1 года не получено статистически значимых различий по показателям ДБХ, ЛПИ и улучшению качества жизни, [130].

В России проводилось исследование эффективности использования геннотерапевтических препаратов в комплексном лечении пациентов с ХИНК в составе дополнения к консервативной терапии и хирургическим методам лечения. В исследовании использовались гены кодирующие VEGF, FGF, ангиогенин. В группе пациентов с добавлением генной терапии отмечались лучшие показатели по приросту ДБХ на II стадии заболевания на 300 метров, а при III стадии на 100 метров, так же в группах с комплексным лечением и при добавлении генной терапии к консервативному улучшалось качество жизни и уменьшалось время восстановления исходных параметров кровотока на тредмил-тесте [181].

Проводилось сравнение эффективности консервативной терапии с геннотерапевтическим лечением и консервативной терапии с методами непрямой реваскуляризации (поясничной симпатэктомии и

реваскуляризирующей остеотрепанации) на протяжении 3 лет. В данном исследовании было показано, что эффективность генной терапии препаратом на основе рVEGF-165 превосходит результаты вспомогательных операций у больных ПБ-III стадией заболевания. В группе генной терапии получено 83% положительных результатов (53% стабильного перехода во ПА стадию, удовлетворительных - 30%). Количество положительных результатов после ПСЭ составило 62%, после РОТ - 71%, при этом перехода во ПА стадию заболевания при непрямой реваскуляризации не зафиксировано [88].

Наибольшее число исследований в сфере генных технологий являются плацебо-контролируемыми, дают достоверные результаты об эффективности и безопасности использования методов терапевтического ангиогенеза [195]. На основании многочисленных клинических испытаний можно сделать вывод, что препараты на основе рVEGF-165 лидируют по безопасности и эффективности для лечения хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза по сравнению с генами других ангиогенных факторов [60, 88, 100]. В то же время отсутствуют данные об использовании препарата в комбинации с хирургическим или терапевтическим лечением при наиболее тяжелых поражениях сосудистого русла: КИНК на фоне длительно незаживающих раневых дефектов кожных покровов при наличии сопутствующего сахарного диабета.

1.3.2 Экспериментальное моделирование сахарного диабета и раневого процесса с использованием терапевтического ангиогенеза у животных

Важным этапом для создания новых препаратов, изучения новых свойств уже известных лекарств, расширения показаний к применению и внедрения новых методов лечения является доклиническое исследование. Большое значение при этом уделяется созданию доклинических моделей какого-либо заболевания на экспериментальных животных.

Моделирование сахарного диабета у животных.

В настоящее время разработано большое количество методик индуцирования гипергликемии и развития сахарного диабета на различных животных. Методы получения гипергликемии могут быть спонтанными, генетическими, диетическими, индуцированы диабетогенными веществами или хирургическими манипуляциями [185]. По данным литературы моделирование СД возможно на многих видах животных, однако наиболее подробно описаны модели на грызунах (крысах и мышах). Выделяют два основных вида модификаций СД: генетические (спонтанно вызванные) и негенетические (экспериментально вызванные) модели [91].

Пример генетически детерминированной формы инсулиннезависимого СД - диабет мышей с ожирением *C57BL/KsJ-db/db*. У данных животных была выявлена аутосомно-рецессивная мутация гена *db* (diabetes), который действует как диабетогенный стресс. Например, у мышей инбредной линии *C57BL/6J* наблюдается резистентность к гену *db/db*, проявляющаяся в компенсаторной гиперинсулинемии и гиперплазии β -клеток [155]. Существуют и другие генетически разработанные модели СД 2 типа (без ожирения у крыс *Goto-Kakizaki*, с ожирением у крыс *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*) [127].

Из недостатков генетических моделей следует обратить внимание на их высокую стоимость и трудности моделирования, в связи с чем, так же большое распространение получили негенетические модели, которые требуют меньшее вложение средств, просто воспроизводятся и дают хорошую достоверность результатов [78].

Из хирургических методов можно выделить модель частичного удаления поджелудочной железы (до 90% объема), которая дополняется введением химических диабетогенных веществ (аллоксан, стрептозоцин и др.). Данная модель часто используется для исследований факторов трансплантации или регенерации в связи с низкой способностью поджелудочной железы к регенерации [172].

В последние десятилетия активно внедряются различные модели СД, индуцированного цитотоксическими химическими диабетогенными

веществами (дексаметазон, стрептозоцин), или нарушением характера питания (питание на рационе с высокой долей жиров), либо сочетанием вышеизложенных факторов. У каждой модели имеются свои особенности в связи с различными механизмами действия цитотоксических агентов.

Неонатальный стрептозоциновый диабет моделируют на крысах линии Вистар двумя вариантами: 1) вводят однократно 100 мг/кг массы тела на 2 сутки после рождения внутривбрюшинно. 2) внутривбрюшинно вводят 80 мг/кг на 5 сутки после рождения. Следует учесть, что при втором варианте наблюдается высокая летальность среди животных (около 50%) в течение ближайших трех суток [120, 167].

Так же существует модель частичного повреждения β -клеток поджелудочной железы. Выполняется многократное внутривбрюшинное введение низких доз стрептозоцина взрослым крысам (5 дней 15 мг/кг в цитратном буфере 1mM, pH 4.5), с последующим отбором животных с уровнем глюкозы 7,78 - 11,1 ммоль/л. Такая модель СД 2 типа характеризуется гипергликемией за счет частичного дефицита инсулина, но без нарушения периферической инсулинорезистентности [120].

Для снижения токсического действия стрептозоцина предложены методы с одновременным введением никотинамида для защиты β -клеток.

Еще одной моделью является индукция СД с помощью дексаметазона. Дексаметазон вводится в дозе 0,125 мг/кг массы тела 18-месячным крысам линии Wistar на протяжении 13 суток подкожно. У животных развивается умеренная базальная гипергликемия, двукратно возрастает концентрация инсулина и ненасыщенных жирных кислот. В периферических тканях при этом снижается чувствительность к действию инсулина и толерантность к углеводам [145].

Наиболее физиологической на данный момент признана модель комбинации высокожировой диеты (ВЖД) и низких доз стрептозоцина. В 2008 году была предложена стабильная модель СД 2 типа, полученная на крысах-самцах линии Wistar массой 200-250 грамм с помощью комбинации

высокожировой диеты (4 недели) и двукратного внутрибрюшинного введения низких доз стрептозоцина (30 мг/кг массы тела) с интервалом 2 недели [202]. Модель (ВЖД и стрептозоцин) основана на ожирении и инсулинорезистентности, поэтому является наиболее физиологичной и позволяет воспроизвести типичные для людей с СД метаболические процессы. Использование данной модели видится перспективным в связи с имитацией в ней естественного течения болезни [178].

Экспериментальные модели коррекции раневого процесса на фоне СД с применением генной терапии

Первое доклиническое исследование генных препаратов при лечении язвенных дефектов была выполнена в 2002 году. У CD-1 мышей с стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом оценивалось применение в лечении AdCMV.VEGF. Язвенный дефект формировался путём иссечения кожного покрова диаметром 3,5 мм на всю толщину. Ангиогенный препарат вводился по диаметру раны в дозе 10^8 вирусных единиц, в группе контроля применялся фосфатный буфер. В качестве критериев эффективности использовались такие показатели, как площадь и объём грануляционной ткани. Так же производилась оценка гистологии и количества сосудов, подсчёт которых выполнялся на препаратах после проведения иммуногистохимической реакции с антителами к PECAM-1 и размера язвенного дефекта, измерение которого проводилось на 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13 сутки после введения вектора с геном VEGF. В результате эксперимента было получено значимое сокращение сроков заживления раневого дефекта, увеличение количества сосудов и ускорение развития грануляционной ткани в экспериментальной группе. Впервые была продемонстрирована возможности генной терапии в коррекции репаративной регенерации на фоне нарушения гликемического профиля [173].

В 2006 году было проведено исследование аналогичного гена VEGF на модели кожного лоскута на ножке. На дорсальной поверхности животного формировался лоскут, размерами 4×10 см, который после подшивался обратно. В наиболее дистальных отделах лоскута отмечается развитие выраженной

ишемии, что приводит к некрозу с последующим формированием раневого дефекта. Сразу после восстановления целостности кожного покрова выполнялось введение AdCMV.VEGF в дозе 5×10^8 вирусных единиц субдермально, по периметру и в сам кожный лоскут. В результате опыта было получено увеличение количества сосудов в месте введения генного препарата, что сопровождалось улучшением перфузии, уменьшением площади некроза [176].

Производилось исследование по оценке влияния генной стимуляции ангиогенеза плазмидой p-VEGF165 на процесс заживления кожной раны, в результате которого было получено в 2,2 большее число сосудов на 7-е сутки и в 1,7 раз большее на 14-е сутки. Кроме этого в исследуемой группе отмечалось ускорение формирования слоя вертикально ориентированных сосудов, которые влияют на стимуляцию развития грануляционной ткани [95, 197].

На основании трех вышеперечисленных исследований можно сделать вывод об улучшении условий для репарации тканей в условиях индукции ангиогенеза конструкцией AdCMV.VEGF.

В другом исследовании с использованием гена VEGF-C на базе аденовируса *db/db* мышам выполнялось круговое иссечение кожного покрова на дорсальной поверхности тела диаметром 5 мм, после чего осуществлялось интрадермальное введение генной конструкции по периметру раны. Далее производилось иммуногистохимическое исследование поперечных тонких срезов кожи, с антителами к PECAM-1. В ходе данного эксперимента было выявлено, что VEGF-C обеспечивает достоверное улучшение процессов репаративной регенерации на фоне нарушения углеводного обмена, за счет увеличения количества сосудов в экспериментальной группе, что сопровождалось статистически значимым сокращением сроков заживления по сравнению с животными группы контроля [144].

В эксперименте с использованием в качестве вектора индукции ангиогенеза при раневом процессе введения ADV/VEGF165 выполнялось иссечение кожного покрова диаметром 14 мм на всю толщину на дорсальной

поверхности тела *db/db* мышам. Далее вводился ген ADV/VEGF165 в концентрациях от 1.6×10^{10} до 5×10^{11} вирусных единиц, в зависимости от экспериментальной группы. После полного закрытия раны, выполнялась гистологическая оценка количества и толщины коллагена в поперечных срезах образцов кожи, полученных с места дефекта. В контрольной группе достоверно уменьшилось время заживления дефекта, а увеличение количества коллагена на срезах позволило сделать вывод о улучшении репарации ран за счет индукции пролиферации и миграции фибробластов и кератиноцитов, что было также продемонстрировано *in vitro* [143].

В некоторых других исследованиях рассматривались возможности коррекции репаративной регенерации при СД с помощью трансфера гена EGF [152], PDGF-B [151] и трансформирующего фактора роста β [147].

Важно обратить внимание, что большинство исследований средств терапии раневых дефектов при СД выполняются в эксперименте с острым повреждением и при нарушении гликемии по причине отсутствия релевантных биологических моделей длительно незаживающих язв при СД. Комплекс патологических изменений в ране у пациентов с СД, включающий в себя поражение периферических нервов, хроническое снижение перфузии, нарушение углеводного обмена, персистирующая механическая травма не может быть в полной мере воспроизведен в эксперименте. Потому результаты, полученные *in vivo*, дают возможность лишь условно предполагать, будет ли лекарственный препарат эффективен у больных с КИНК на фоне СД.

1.3.3 Результаты первых пилотных клинических исследований по использованию геннотерапевтической индукции ангиогенеза у больных с КИНК на фоне СД

Первым исследованием в клинической практике стала 1-2 фаза клинического исследования по оценке безопасности и переносимости Ad-5PDGF-B (GAM501) у пациентов с резистентными язвами при нейропатической форме СДС в США. В данном исследовании выполнялось нанесение

ангиогенного препарата 15 пациентам непосредственно на раневой дефект в составе коллагенового геля в комбинации со стандартным лечением, включавшем разгрузку конечности и хирургическую обработку дефекта. Применение GAM501 безопасно у данной категории пациентов, обладает хорошей переносимостью и не сопровождалось развитием нежелательных реакций. Заживления язвенного дефекта удалось добиться у 12 пациентов из 15 [162]. В дальнейшем было проведено двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование применения гена Ad-5PDGF-B с участием 210 пациентов с нейропатическими язвенными дефектами. Эффективность последнего остается неизвестным, по причине отсутствия публикаций после его завершения [205].

Другое пилотное исследование III фазы безопасности и эффективности препарата на основе плазмиды с геном HGF (VM202) компании ViroMed Co., Ltd начато в 2015 году в Южной Корее. Основанием для запуска исследования III фазы стало статистически значимое увеличение количества заживших трофических дефектов кожных покровов в ходе II фазы клинического исследования. В исследование включались пациенты с КИНК, 60% больных имели фоновый сахарный диабет. Использование генной терапии у данной подгруппы пациентов оказалось наиболее эффективно, поэтому было принято решение об изменении критериев включения в III фазе в сторону пациентов с ишемической формой СДС [207]. Многоцентровое плацебо-контролируемое исследование, начатое в 2016 году, будет заключаться во внутримышечном введении препарата в область голени, с последующей оценкой в качестве первичного критерия эффективности размера язвенного дефекта в динамике.

Так же проведена I и II фаза КИ препарата VM202, содержащим в себе плазмиду с генами из двух изоформ HGF. Препарат показал хорошую переносимость и безопасность ангиогенной терапии с использованием дозировок 4 мг, 8 мг и 16 мг во время I фазы КИ [112]. Во II фазе двойного слепого, плацебо-контролируемого КИ участвовало 100 пациентов с болевой формой диабетической нейропатии. В лечении использовались дозировки 16 мг и 32 мг. Курс лечения составил 16 и 32 инъекций соответственно с интервалом

в 14 дней. Критерием эффективности являлся среднесуточный показатель шкалы боли относительно базального уровня, показатель VAS, качества жизни, интраэпидермальная плотность нервных волокон по данным щипковой биопсии на уровне бедра и голени с интервалом в 6 месяцев. В результате лечения нежелательных эффектов со стороны препарата не было выявлено, а по критериям эффективности была получена статистически значимая положительная динамика [150]. В 2016 году начато проведение III фазы регистрационного КИ, у пациентов с болевой формой ДН [206].

Таким образом, тема лечения критической ишемии нижних конечностей с фоновым нарушением углеводного обмена не теряет своей актуальности.

В настоящее время, методов консервативной терапии недостаточно для сдерживания прогрессивного снижения перфузии тканей, приводящих в конечном итоге к декомпенсации кровообращения и ампутации конечности. После перенесенной ампутации значительно снижается качество жизни пациентов и остается неутешительным прогноз отдаленной выживаемости.

Всем пациентам данной группы необходима эффективная реваскуляризация нижних конечностей, однако возможности хирургического вмешательства серьезно ограничиваются мультифокальным характером вовлечения в патологический процесс сосудистой системы и частым дистальным типом поражения. При этом на ведущие роли выходит использование эндоваскулярных методов лечения и гибридных операций.

Пациенты данной группы часто имеют большое сопротивление периферического русла по причине скудного развития капилляров и плохих возможностей дистальной перфузии. Микроциркуляторная дисфункция, развивающаяся на фоне диабетической микроангиопатии ухудшает и без того недостаточную доставку нутриентов к клеткам и тканям, за счет снижения скорости обменных процессов непосредственно в капиллярах. В связи с вышеизложенными причинами у пациентов данной группы увеличивается риск послеоперационных тромбозов. Специфические проявления диабетической макроангиопатии (медиакальциноз Менкеберга, протяженные мягкие бляшки)

приводят к увеличению процента рестенозов и диссекций у пациентов при баллонной ангиопластики.

В настоящее время активно внедряются методы использования индукции ангиогенеза в лечении данной группы больных. Применение стволовых клеток для улучшения процессов васкулогенеза и рекомбинантных факторов роста в качестве местных стимуляторов репарации показывает положительные результаты. Однако трудности в использовании СК и ФР связаны с высокими затратами на производстве, быстрым разрушением в процессе циркуляции и при нанесении на место раневого дефекта, необходимостью создания и поддержания определенного пула для достижения клинического эффекта. На сегодняшний день имеется не большое количество исследований использования СК и ФР у пациентов с длительно незаживающими дефектами кожных покровов ишемического генеза.

Наиболее изученным методом терапевтического ангиогенеза у пациентов с КИНК является генная индукция. Использование плазмидных векторов, несущих генетически измененные факторы роста показывает удовлетворительные результаты лечения. При анализе данных многих клинических исследований можно сделать вывод, что препараты rVEGF-165 лидируют по безопасности и обладают эффективным преимуществом в лечении ХИНК по сравнению другими ангиогенными факторами. Пилотные исследования по применению генных технологий в лечении пациентов с критической ишемией на фоне нарушения углеводного обмена дают положительные результаты. Поэтому дальнейшее проведение более детальных клинических исследований использования препарата rVEGF-165 у пациентов данной группы в составе комбинированной и комплексной терапии в сравнении со стандартными методами консервативной терапии и хирургической помощи является перспективным направлением изучения.

Глава 2. Материалы и методы исследования

В ходе научного исследования проводилось изучение эффективности и безопасности дополнительной геннотерапевтической индукции ангиогенеза в лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей (III-IV стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна) и сахарным диабетом.

2.1 Экспериментальная часть исследования.

Экспериментальная часть исследования выполнена на белых крысах линии Wistar ($n = 24$), содержащихся в условиях вивария с соблюдением правил гуманного обращения с животными [106]. Животные были получены из питомника ФГБУН ФЦБМТ ФМБА России «Столбовая». Содержание животных, моделирование гипергликемии и кожного дефекта осуществлялось в условиях вивария и экспериментальной операционной. После выдерживания животных в двухнедельном карантине, крысы массой 300-350 гр включались в эксперимент. Все животные получали кормление стандартными комбикормами, имели неограниченный доступ к воде.

Для индукции гипергликемии у крыс производилось внутрибрюшинное введение аллоксана (120 мг/кг в 1 мл ацетатного буфера 0,02М рН 4,0). Приготовление вводимых растворов производилось непосредственно перед введением животным в связи с неустойчивостью вводимых веществ. Через сутки после инъекции проводится измерение сахара крови глюкометром на фоне 12-часового голода. В случае если гипергликемия вызвана не была, животные повторно получали аллоксан (150 мг/кг).

На 21 день с начала развития гипергликемии крысам наносили хирургическую рану кожи размером 8×8 мм в межлопаточной области. Животным контрольной группы в края раны вводили 200 мкл воды для инъекций ($n=8$). Крысам в экспериментальных группах в края раны внутрикожно был введен раствор 60 мкг (группа 2, $n=8$) или 200 мкг (группа 3, $n=8$) плазмиды pCMV-VEGF165 в 200 мкл воды для инъекций. Расчет дозы при

местном введении осуществлялся исходя из соотношений, заложенных в доклиническое исследование препарата "Неоваскулген" исходя из уровня основного обмена человека и лабораторных грызунов.

Всем животным на сроках 3, 6 и 10 суток после операции осуществляли фотографирование раны и планиметрию при помощи накладывания цифровой сетки на фотоизображение. Животных выводили из эксперимента через 10 дней путем передозировки тиопентала натрия. Фрагменты тканей, включавшие гранулирующую рану, края раны и подлежащие ткани фиксировали 10% нейтральным формалином. Проводку материала осуществляли по стандартным протоколам, изготавливали гистологические срезы. Для визуализации тканевых изменений применяли окрашивание гематоксилином и эозином. Для последующей морфометрической оценки сосудистого русла выполняли иммуногистохимические реакции с антителами к гладкомышечному актину (α ГМА) - компоненту цитоскелета гладких миоцитов, входящих в структуру сосудистой стенки и к белку нейрофиламентов (Дакко, Дания), визуализационная система Novolink фирмы Novocastra (Великобритания). В дальнейшем срезы исследовали при помощи светового микроскопа.

Помимо качественного описания препаратов осуществляли регистрацию морфометрических параметров. При помощи цифрового модуля к микроскопу измеряли протяженность раны не покрытую эпителием. Остальные морфометрические параметры оценивали отдельно для центральной части раны и краевых участков, находящиеся под новообразованным эпителием. Оценивали количество α ГМА-положительных сосудов (артериолы, венулы) в поле зрения (подсчет проводился в 10 случайно выбранных полях ограниченной зоны, при увеличении $\times 400$). Аналогично подсчитывали число нейрофиламент-положительных структур.

2.2 Клиническая часть исследования

В диссертационной работе представлены данные 140 пациентов с КИНК и СД, разделенных на 4 группы. В I группу (n=45) были включены пациенты, которым было проведено лечение с помощью открытого или эндоваскулярного

вмешательства. Во второй группе (n=40) пациенты получали стандартную консервативную терапию согласно Национальным рекомендациям по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией, по причине невозможности выполнения оперативного лечения.

Пациенты III (n=30) и IV (n=25) группы наряду с хирургическими (III группа) или терапевтическими (IV группа) методами лечения получали препарат для терапевтического ангиогенеза в режиме и дозе, рекомендованной изготовителем. Одновременно выполнялись внутримышечные инъекции по 1 мл раствора на уровне средней и нижней трети голени в ишемизированную конечность, учитывая ангиосомный принцип нарушения перфузии, в проекции задней и передней большеберцовой артерии с соблюдением всех правил асептики (рис. 1 (А, Б)).



А

Б

Рис. 1. Места инъекции препарата рVEGF-165 по передней (А) и по задней (Б) поверхности голени

Введение препарата в дозировке 1,2 мкг производилось дважды, с интервалом в 14 дней в одну исследуемую конечность, за которой в дальнейшем и проводилось наблюдение в течение 1 года.

Клиническая часть исследования проведена на базе кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в течение 2014-2018 гг.

Критерии включения пациентов в группу терапевтического ангиогенеза, комбинированного с хирургическими методами лечения:

1. пациенты мужского и женского пола в возрасте от 40 лет;
2. хроническая ишемия нижних конечностей на фоне периферического атеросклероза;
3. недавно выполненное оперативное вмешательство на периферических артериях нижних конечностей в течение (в течение 10 суток до момента включения пациента в наблюдательную программу);
4. характер поражения магистральных артерий, обеспечивающий техническую возможность выполнения открытого и (или) эндоваскулярного оперативного вмешательства;
5. сахарный диабет 1 и 2 типов;
6. пациенты с отсутствием срочных показаний к ампутации;
7. возможность повседневного жёсткого контроля гликемии (приверженность пациента к лечению);
8. готовность пациента выполнять требования по обследованию и лечению.

Критерии не включения пациентов в группу терапевтического ангиогенеза, комбинированного с хирургическими методами лечения:

1. возраст моложе 40 лет или проявление заболевания сосудов до 40 лет;
2. хроническая ишемия нижних конечностей неатеросклеротической природы (артериит, системные заболевания, болезнь Бюргера, врожденные аномалии и травмы сосудов и т.д.);

3. невозможность адекватного контроля гликемии (согласно алгоритмам оказания специализированной помощи пациентам с сахарным диабетом);

4. недавние (менее 6 месяцев) случаи острого инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии, аортокоронарного шунтирования или стентирования коронарных артерий, инсульта или транзиторных ишемических атак;

5. планируемая обширная хирургическая операция в ближайшие 6 месяцев;

6. тяжелое сопутствующее заболевание с ожидаемой продолжительностью жизни менее года;

7. декомпенсация сердечно–сосудистой системы, функции почек, печени, декомпенсированный сахарный диабет;

8. инфекционные заболевания, септические состояния, ВИЧ инфекция;

9. наличие злокачественных новообразований или рецидив злокачественного новообразования в течение последних 6 месяцев;

10. повышенная чувствительность к компонентам препарата;

11. наличие алкогольной или наркозависимости;

12. клинически значимые изменения лабораторных показателей, которые могут свидетельствовать о не диагностированном заболевании и требуют проверки;

13. беременность, лактация;

14. отсутствие приверженности пациента к лечению.

Критерии включения пациентов в группу геннотерапевтической индукции ангиогенеза в составе комплексного консервативного лечения:

1. пациенты мужского и женского пола в возрасте от 40 лет;

2. длительно не заживающий язвенный дефект на фоне проводимой стандартной терапии (не менее 1 месяца) ограниченный стопой и отсутствие тенденции к заживлению;

3. глубина язвенного дефекта по Вагнеру 1-2 степень;
4. наличие гемодинамически значимых поражений магистральных артерий нижних конечностей;
5. сахарный диабет 1 и 2 типов;
6. пациенты с отсутствием срочных показаний к ампутации;
7. возможность повседневного жёсткого контроля гликемии (приверженность пациента к лечению);
8. готовность пациента выполнять требования по обследованию и лечению.

Критерии не включения пациентов в группу геннотерапевтической индукции ангиогенеза в составе комплексного консервативного лечения:

1. возраст моложе 40 лет или проявление заболевания сосудов до 40 лет;
2. хроническая ишемия нижних конечностей неатеросклеротической природы (артериит, системные заболевания, болезнь Бюргера, врожденные аномалии и травмы сосудов и т.д.);
3. нейропатическая форма синдрома диабетической стопы;
4. выраженная нейроостеоартропатическая деформация стопы (нейроостеоартропатия 3-4 стадии) или иная деформация, оказывающая значительное влияние на процесс заживления;
5. наличие гнойно-деструктивных поражений стопы (абсцесс, флегмона);
6. невозможность адекватного контроля гликемии (согласно алгоритмам оказания специализированной помощи пациентам с сахарным диабетом);
7. недавняя (менее 3 месяцев) операция на артериях нижних конечностей или недавний (менее 3 месяцев) тромбоз глубоких вен нижних конечностей;
8. недавние (менее 6 месяцев) случаи острого инфаркта миокарда,

нестабильной стенокардии, аортокоронарного шунтирования или стентирования коронарных артерий, инсульта или транзиторных ишемических атак;

9. планируемая обширная хирургическая операция в ближайшие 6 месяцев;

10. декомпенсация сердечно-сосудистой системы, функции почек, печени, декомпенсированный сахарный диабет;

11. инфекционные заболевания, септические состояния, ВИЧ инфекция;

12. наличие злокачественных новообразований;

13. наличие алкогольной или наркозависимости;

14. беременность, лактация;

15. наличие клинически значимых изменений лабораторных показателей, свидетельствующих о не диагностированном заболевании и требующих дообследования;

16. повышенная чувствительность к компонентам препарата;

17. отсутствие приверженности пациента к лечению.

Критериями нереконструктабельности сосудистого русла являлись:

– мультифокальное поражение в виде распространенного поражения артерий нижних конечностей: протяженная окклюзия собственной бедренной артерии с переходом на подколенную артерию и (или) артерии подколенно – берцового сегмента (окклюзия, либо гемодинамически значимые стенозы) при наличии магистрального кровотока выше уровня поражения;

– дистальный тип поражения в виде окклюзии и (или) гемодинамически значимого стеноза подколенной и (или) берцовых артерий.

По классификации путей оттока данные типы поражения соответствовали 7-10 баллам по классификации R.V. Rutherford (где 1 балл означает удовлетворительное периферическое русло, а 10 баллов соответствуют

изолированному (слепому) сегменту с отсутствием магистральных артерий) [175].

Всего в исследование включены 140 человек, из них 87 мужчин и 53 женщины (рис. 2). Средний возраст пациентов составил $67,2 \pm 7,7$ лет. Распределение по возрасту между группами было сопоставимо (I группа - $67,5 \pm 7,9$ лет; II группа - $69,6 \pm 7$ лет; III группа - $63,3 \pm 7,8$ лет; IV группа - $67,8 \pm 6,8$ лет). Внутри каждой группы распределение по гендерному признаку выглядело следующим образом:

- в I группе, состоящей из 45 человек, - 35 мужчин и 10 женщин;
- во II группе, из 40 человек - 18 мужчин, 22 женщины;
- в III группе из 30 человек - 20 мужчин, 10 женщин;
- в IV группе из 25 человек - 14 мужчин, 11 женщин.



Рис. 2. Распределение пациентов в исследовании по гендерному признаку

Критическая ишемия нижних конечностей объединяет в себя III и IV стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна:

- III стадия - безболевого проходимое расстояние менее 25 м и (или) наличие болевого синдрома в ноге в покое, без язвенно-некротических изменений тканей конечности;
- IV стадия - сильные боли в покое с появлением язвенно-некротических изменений в тканях.

Из всех пациентов, включенных в исследование, III стадию хронической ишемии конечности имели 26 человек, IV стадию - 114 человек.

Распределение больных внутри групп в зависимости от стадии заболевания выглядит следующим образом. В I группе у 19 человек имелась III стадия заболевания, у 26 пациентов IV стадия. В III группе - 7 пациентов с III стадией

хронической ишемии, 23 пациента с IV. Все пациенты во II и IV группах имели IV стадию заболевания (рис. 3 (А, Б)).

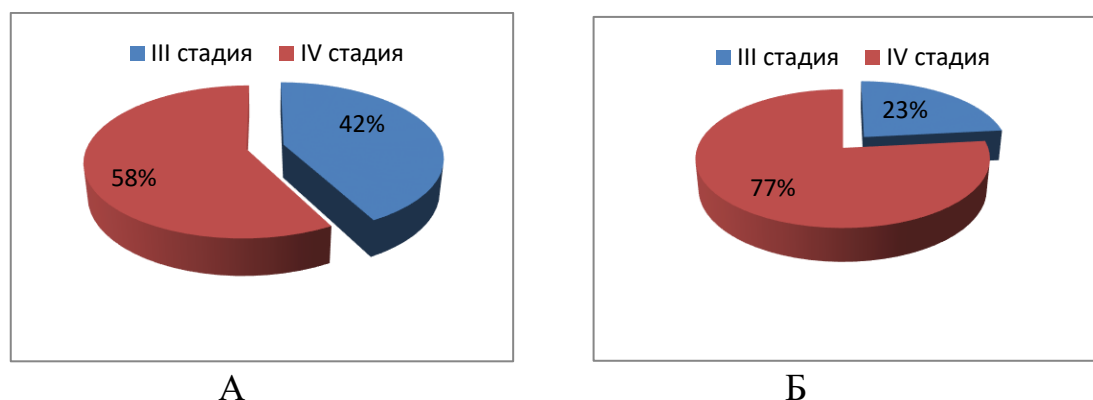


Рис. 3. Распределение пациентов по стадии заболевания в I группе (А) и в III группе (Б)

По уровню поражения сосудистого русла распределение пациентов выглядело следующим образом: преимущественное поражение артерий подвздошного сегмента имели 12 человек, бедренно–подколенная окклюзия отмечена у 85 человек. Дистальный тип поражения выявлен у 24 пациентов и распространенный мультифокальный процесс у 19 человек (таблица 4).

Таблица 4

Распределение пациентов по уровню поражения внутри групп

№ группы / Уровень поражения	I группа (n=45)	III группа (n=30)	II группа (n=40)	IV группа (n=25)
Подвздошный сегмент	6 (13,3%)	-	4 (10%)	2 (8%)
Бедренно – подколенный сегмент	25 (57,8%)	23 (76,7%)	24 (60%)	13 (52%)
Дистальный сегмент	4 (8,9%)	4 (13,3%)	8 (20%)	8 (32%)
Мультифокальный	10 (20%)	3 (10%)	4 (10%)	2 (8%)

Все пациенты имели многолетний анамнез заболевания, как по поводу облитерирующего атеросклероза, так и по поводу сахарного диабета.

Коррекция сахарного диабета в 43,6% случаев выполнялась при помощи таблетированных гипогликемических препаратов (из групп производных сульфонилмочевины, бигуанидов), а в 56,4% пациенты находились на

комбинированной терапии с подкожным введением инсулина короткого или длительного действия.

Из сопутствующих заболеваний, наиболее часто у пациентов всех групп имела ишемическая болезнь сердца (57,9%), в большинстве случаев пациенты так же имели фоновую гипертоническую болезнь (72,1%) (таблица 5).

Таблица 5

Сводная таблица по сопутствующим заболеваниям

Сопутствующее заболевание	I группа (n=45)	III группа (n=30)	II группа (n=40)	IV группа (n=25)
Гипертоническая болезнь	35 (77,8%)	24 (80%)	24 (60%)	18 (72%)
Ишемическая болезнь сердца	32 (71,1%)	19 (63,3%)	14 (35%)	16 (64%)
Постинфарктный кардиосклероз	5 (11,1%)	12 (40%)	11 (27,5%)	5 (20%)
Цереброваскулярная болезнь	9 (20%)	2 (6,7%)	3 (7,5%)	6 (24%)
Острое нарушение мозгового кровообращения	8 (17,8%)	1 (3,3%)	2 (5%)	4 (16%)
Хронические неспецифические заболевания легких	3 (6,7%)	1 (3,3%)	4 (10%)	2 (8%)
Язвенная болезнь желудка или двенадцатиперстной кишки	2 (4,4%)	2 (6,7%)	2 (5%)	1 (4%)

Все пациенты были распределены на 2 потока в зависимости от принятой тактики лечения. Пациентам I и III группы после скрининга проводилась прямая реваскуляризация открытым, либо эндоваскулярным методом. При невозможности проведения реконструктивного вмешательства проводился курс консервативной терапии согласно Национальным рекомендациям по лечению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей (II и IV группа) [60].

Курс консервативной терапии включал в себя:

- стол №9;
- антиагрегантная терапия (ацетилсалициловая кислота 100 мг в сутки);

- гиполипидемическая терапия (статины с индивидуально подобранной дозировке, в зависимости от уровня ХС, ЛПНП, ЛПВП, АЛТ и АСТ);
- пентоксифиллин 1200 мг в сутки;
- внутривенно введение препаратов сулодексида (600 ЛЕ в сутки), депротеинизированного гемодеривата (2000 мг в сутки), 6% гидроксиэтилированного крахмала (250 мл в сутки);
- препаратов простагландина E1 (50-200 мкг в сутки);
- внутривенное введение препаратов тиоктовой (α -липоевой) кислоты (600 мг в сутки).

Всем пациентам, включенным в исследование, назначалась консультация эндокринолога с подбором таблетированной гипогликемической терапии, либо решением вопроса о назначении препаратов инсулина с подбором дозировки и режима введения.

Кроме лечения основного заболевания, все пациенты получали терапию по поводу сопутствующей патологии в индивидуально подобранном режиме и дозировке.

Пациенты исследуемых групп дополнительно после проведенного оперативного лечения (III группа), либо прохождения курса консервативной терапии в стационаре (IV группа) получали индукцию ангиогенеза в виде введения геннотерапевтического препарата. В III группе введение препарата выполнялось на 7 и 21 сутки после операции. В IV группе введение препарата выполнялось в последний день прохождения курса консервативной терапии и через 14 суток после первой инъекции.

Активный период наблюдения за пациентами составил 6 месяцев с момента первого введения геннотерапевтического препарата. Далее еще через 6 месяцев была произведена оценка параметров сохранности конечности и летальных исходов. Пациентам I и III групп на госпитальном этапе выполнялось оперативное лечение. Далее пациенты III группы совершали 3 визита к врачу. Через 14 суток после первой инъекции проводилось повторное введение препарата (визит V-1), далее следовали два контрольных визита через 3 месяца (визит V-2) и 6 месяцев

(визит V-3) после проведения оперативного лечения. Пациенты II и IV групп на госпитальном этапе после прохождения скрининга и рандомизации проходили курс консервативной терапии, с последующим введением генной конструкции в IV группе, далее пациенты совершали еще 3 визита. Через 14 суток после первой инъекции выполнялась второе введение препарата (визит V-1), и два контрольных визита проходили через 3 (визит V-2) и 6 месяцев (визит V-3) от момента первого введения препарата. Далее, еще через 6 месяцев, в рамках постклинического наблюдения, производилась оценка основных критериев эффективности: количество летальных исходов и сохранность конечности в отдаленном периоде (1 год) (рис. 4).

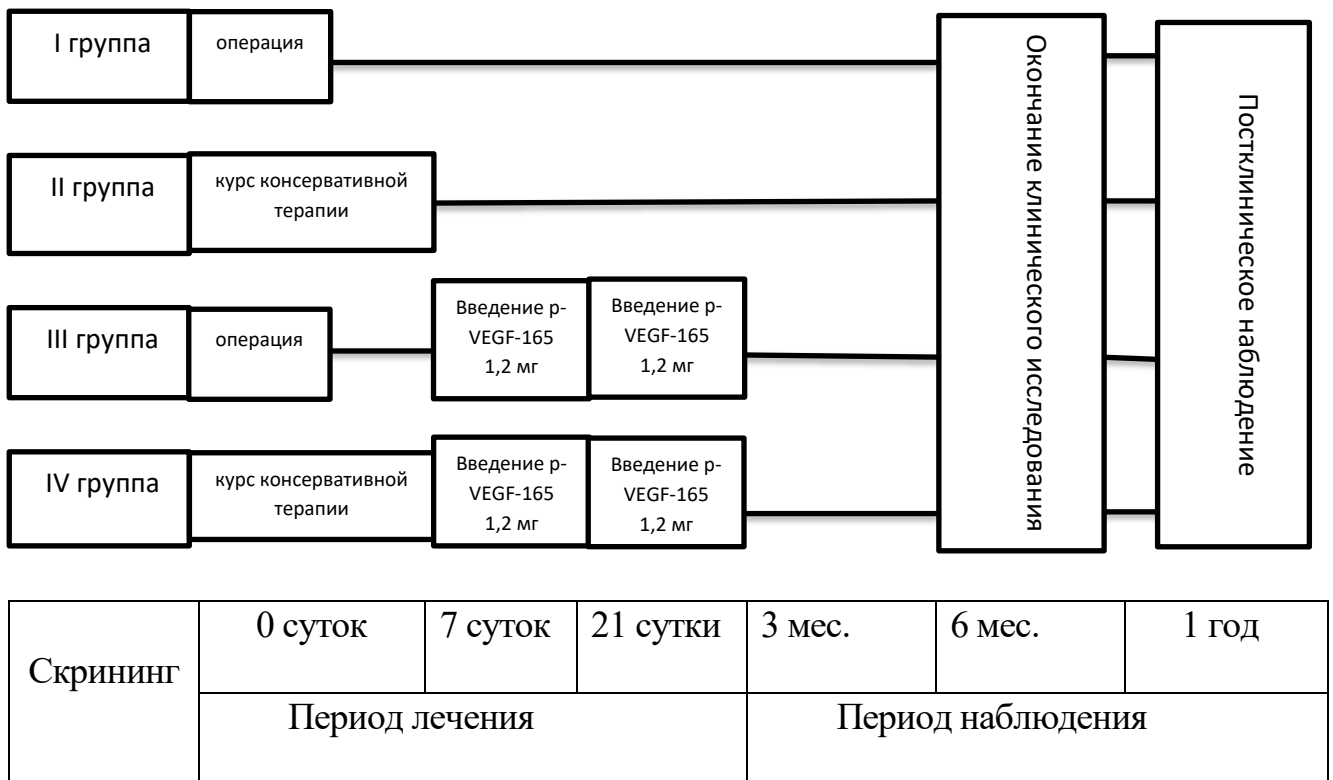


Рис. 4. Дизайн клинического исследования

Всем пациентам, включенным в исследование, проводились исследования с помощью лабораторных и инструментальным методов.

Лабораторные методы включали в себя:

- анализ крови клинический;
- анализ крови биохимический;
- обследование свертывающих свойств крови (коагулограмма);
- общий анализ мочи.

Из инструментальных методов обследования использовались

1. Электрокардиография в стандартных и грудных отведениях выполнялась с помощью двенадцатиканального электрокардиографа Kaden ECG-9012.

2. Ультразвуковое дуплексное сканирование (УЗДС) артерий нижних конечностей проводилось для выявления степени поражения сосудистого русла и состояния, как магистрального, так и периферического кровотока, а также определения состояния коллатерального кровотока. При прогрессировании заболевания происходит снижение данного показателя в динамике, а развитие коллатерального кровотока, в свою очередь, приведет к снижению общего периферического сопротивления и увеличению скоростей кровотока по артериям берцового сегмента. При обследовании пациентов УЗДГ и ДС проводилось одним и тем же специалистом, на портативном ультразвуковом аппарате Siemens Sonoline G60S с использованием секторного, комплексного и линейного датчиков. При выполнении УЗДС так же измерялась линейная скорость кровотока (ЛСК)

3. Ультразвуковая доплерофигмоманометрия (УЗДСММ) с определением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ). Данная процедура является обязательным скрининговым методом для всех пациентов с заболеваниями периферических артерий, которая позволяет определить состояние кровотока по магистральным артериям. ЛПИ представляет собой отношение систолического артериального давления на берцовых артериях к систолическому давлению на плечевой артерии (в мм.рт.ст.) с помощью доплеровского сигнала. Исследование выполнялось с помощью доплера портативного «АНГИОДИН ПК». В норме индекс на нижних конечностях всегда незначительно выше, чем на верхних (нормальные значения ЛПИ 1,1-1,2).

У пациентов с сопутствующим сахарным диабетом, при наличии медиасклероза артериальной стенки (синдром Менкеберга), величина ЛПИ бывает недостоверно высокой. Данные ЛПИ таких больных не использовались при оценке результатов исследования (n=5).

4. Транскутанное напряжение кислорода (ТКНК) - позволяет судить о функции кожного кровотока за счет перфузии кислорода в тканях. Исследование основано на полярографическом методе с использованием модифицированных электродов Кларка. Данный метод может служить критерием прогноза заживления трофических язв и некрозов. Регистрация показателей ТКНК осуществлялась при нахождении пациента с выпрямленными конечностями на спине в горизонтальном положении. Датчик фиксировался в первом межпальцевом промежутке на тыле стопы по технологии фирмы изготовителя прибора TCM-2 «Radiometer» (Дания). Показатели регистрировались через 20 после калибровки датчика на месте измерения.

5. Ангиографическое исследование периферических артерий нижних конечностей проводилось пациентам для решения вопроса о реконструктабельности сосудистого русла при отсутствии и (или) неинформативности данных УЗДС артерий нижних конечностей, либо в качестве дополнительного метода диагностики. Данный метод позволяет наиболее информативно оценить состояние артериального сосудистого русла, и определить степень развития коллатерального кровоснабжения. При исследовании использовались трансфemorальный, плечевой, радиальный или транслюмбальный доступ в зависимости от уровня и степени поражения сосудистого русла. Ангиография выполнялась на ангиографических установках Siemens «Artis Zee» и Siemens «Axtom Artis» (Германия) под местной анестезией по M. Jadcins с катетеризацией брюшной аорты, бедренной, плечевой или лучевой артерии по S. Seldinger.

6. Тредмил-тест – использовался для определения дистанции безболевой ходьбы. Для выполнения тредмил-теста использовалась дорожка с углом 0 градусов со скоростью движения 1 километр / час. Засекалось время от начала ходьбы до появления болевых ощущений в икроножных мышцах.

7. Оценка тяжести диабетической полинейропатии с помощью Мичиганского опросника, и шкалы NSS (Neurological Symptoms Score).

Общими критериями эффективности пациентов во всех группах были приняты выживаемость и сохранность ишемизированной конечности, по которой пациент включался в исследование.

Первичными критериями эффективности лечения пациентов в группах с комбинированными методами лечения (I и III группа) был принят показатель дистанции безболевой ходьбы. Данный показатель является главенствующим при распределении пациентов по стадии хронической ишемии, лежащий в основе классификации А.В. Покровского-Фонтейна (1979 г.) [66].

Вторичными критериями эффективности служили:

- доля больных, перешедших в более легкую стадию заболевания;
- купирование явлений критической ишемии;
- качество реконструкций (% проходимости зоны реконструкции через 6 мес);
- количество ампутации, выполненных после «окклюзии» зоны реконструкции вследствие тромбоза или прогрессирования заболевания.

Для пациентов, в группах комплексной консервативной терапии (II и IV группа) в качестве первичной конечной точки эффективности оценивалось уменьшение площади (S) некроза, как главного показателя улучшения коллатерального кровоснабжения в ишемизированной конечности;

В качестве вторичных критериев эффективности для II и IV групп были приняты:

- доля больных, перешедших в более легкую стадию заболевания;
- купирование явлений критической ишемии;
- изменение дистанции безболевой ходьбы;
- степень насыщения кислородом тканей периферических отделов стопы (ТКНК);
- лодыжечно – плечевой индекс (ЛПИ);
- линейная скорость кровотока;
- степень тяжести дистальной диабетической полинейропатии.

Характеристика препарата для генной индукции ангиогенеза на основе pVEGF-165.

Препарат «Неоваскулген®» является высокоочищенной сверхскрученной формой плазмиды pCMV-VEGF-165, кодирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста (рис. 5).

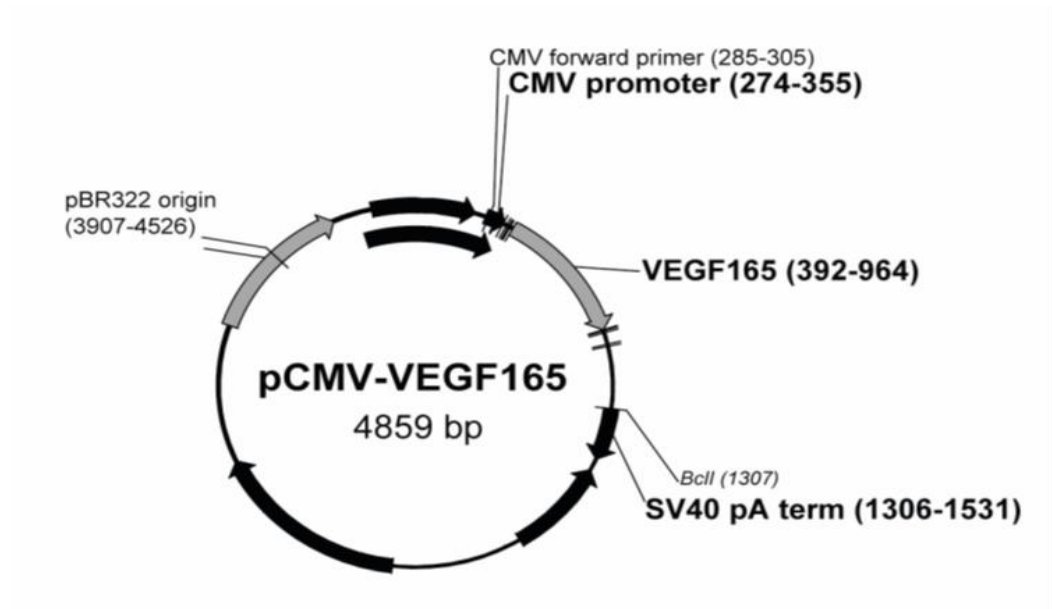


Рис. 5. Структура препарата Неоваскулген – плаزمида с терапевтическим геном VEGF-165

Рекомбинантная плазмидная ДНК состоит из 3 основных компонентов. Первый - pBR322 origin фрагмент в 22 нуклеотидные пары, который является регуляторным участком и определяет транскрипцию гена, следующего за ним в клетках млекопитающих. Второй компонент представляет собой ген сосудистого эндотелиального фактора роста, при экспрессии которого синтезируется изоформа VEGF, состоящая из 165 аминокислот, сигнала сплайсинга и полиаденилирования, а так же терминатора транскрипции SV40, обеспечивающих синтез зрелой РНК гена. Третий компонент - вспомогательные области, для биосинтеза плазмидной ДНК в клетках штамма-продуцента *E. coli*.

Выработка VEGF происходит после проникновения молекул плазмиды внутрь клеток. Стимуляция ЭК происходит за счет связей VEGF со специфическими рецепторами, расположенными на поверхности клеток

эндотелия сосудов (рецептор VEGF 1 типа (Flt-1) и рецептор VEGF 2 типа (KDR/Flk-1)). Рецепторные тирозинкиназы активируются после связывания с лигандом VEGF за счет фосфорилирования и включают пост-рецепторный сигнальный каскад внутри клетки, приводящий к ангиогенезу.

Проникновение плазмиды внутрь клетки - спонтанный процесс. Размножения плазмидной ДНК в клетках млекопитающих не происходит. Молекулярная масса плазмиды – 2817091,85 г/моль. Размер – 4559 пар оснований. Сверхскрученная ДНК плазмиды имеет 9116 фосфодиэфирных химических связей, чувствительных к разрыву. После разрыва одной из данных связей молекула ДНК переходит в релаксированную форму, теряя сверхскрученность. Кольцевая релаксированная ДНК при этом теряет способность эффективно проникать в клетки и становится более чувствительной к распаду в кровотоке.

Препарат «Неоваскулген®» представляет собой стерильный лиофилизат в дозе 1,2 мг во флаконе для приготовления раствора для внутримышечного введения, который разводится водой для инъекций непосредственно перед процедурой. Разведенный препарат вводится сразу, не допуская хранения. Действие препарата основано на проникновении препарата после инъекции в клетку и обеспечения временного синтеза VEGF-165, выступающего в качестве ауто- и паракринного регулятора роста сосудов *in situ*, не интегрируя в собственно геном клетки [196].

2.3 Статистическая обработка данных

Все анализы безопасности и эффективности осуществлялись с использованием методов описательной статистики. Суммарная статистика включает: количество (N), среднее, стандартное отклонение (STD), медиану, минимум (min) и максимум (max) для непрерывных переменных и абсолютную частоту (n) и процент (%) для категориальных переменных. При оценке эффективности были также рассчитаны доверительные интервалы для соотношений (дихотомические переменные) и среднее (непрерывные переменные), с допущением нормального распределения. Для оценки статического различия показателей использовались параметрические и

непараметрические статистические критерии с уровнем значимости $p < 0,05$ (таблица 6).

1. Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения определялся с помощью проверки статистических гипотез критерием Шапиро-Уилка. При анализе принималась одна из двух гипотез. Нулевая гипотеза ($p > 0,05$) свидетельствовала о нормальном распределении признака в генеральной совокупности, а альтернативная гипотеза ($p < 0,05$) – о ненормальности распределения.

2. Количественные данные, в зависимости от вида их распределения, описывались в следующем объеме: среднее значение, медиана, среднее квадратическое отклонение, стандартная ошибка среднего, нижний (25%) и верхний (75%) квантили.

3. Сравнение по качественным порядковым (стадия заболевания) и бинарным признакам (ампутация, летальный исход, окклюзия зоны реконструкции, наличие критического ишемии) с помощью построения таблиц сопряженности 2×2 и использованием методики χ^2 с поправкой Йетса и точного критерия Фишера.

4. Сравнение 3 и более связанных (зависимых) групп по количественным признакам с помощью рангового дисперсного анализа Фридмана и конкорданции Кендалла для определения достоверности различий между всеми группами и возможности перехода к попарному сравнению связанных (зависимых) групп с поправкой Бонферрони (перерасчет уровня значимости p для множественных парных сравнений по формуле $p \cdot n$, где n – количество парных сравнений).

5. Сравнение 3 и более несвязанных (независимых) групп по количественным признакам с использованием рангового дисперсного анализа Краскела-Уоллиса и медианного теста для определения достоверности различий между всеми группами и возможности перехода к попарному сравнению несвязанных (независимых) групп с поправкой Бонферрони.

6. Внутригрупповые сравнения по основным количественным признакам ишемии (ДБХ, ЛПИ, ЛСК, ТКНК, S некроза, Мичиганского опросника, шкалы NSS) выполнялись с помощью метода сравнения парных случаев Вилкоксона (Wilcoxon) при ненормальности распределения признака или t – критерия Стьюдента для связанных (зависимых) групп при нормальном распределении признака.

7. Межгрупповые сравнения для оценки результатов морфометрии в экспериментальной части работы и статистической значимости основных количественных признаков ишемии (ДБХ, ЛПИ, ЛСК, ТКНК, S некроза, Мичиганского опросника, шкалы NSS) производились с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Таблица 6

Проверяемые гипотезы и методы, использованные в данном исследовании

Гипотеза	Статистический метод
Сравнение независимых (несвязанных) групп при оценке результатов морфометрии в экспериментальной части исследования	U - критерий Манна – Уитни
Сравнение групп по качественным порядковым (стадия заболевания) и бинарным признакам (ампутация, летальный исход, окклюзия зоны реконструкции, наличие критическое ишемии)	методика χ^2 с поправкой Йетса и точным критерием Фишера
Сравнение 3 и более связанных (зависимых) групп по количественным признакам	ранговый дисперсный анализ Фридмана и конкорданция Кендалла
Сравнение 3 и более несвязанных (независимых) групп по количественным	ранговый дисперсный анализа Краскела-Уоллиса и медианный

признакам	тест
Сравнение связанных групп (одних и тех же групп на разных сроках исследования) по количественным признакам (ДБХ, ТКНК, ЛПИ, S некроза, Мичиганского опросника, шкалы NSS.)	<p>– непараметрический метод: сравнения парных случаев Вилкоксона (Wilcoxon) с поправкой Бонферрони</p> <p>– параметрический метод: t – критерий Стьюдента для связанных (зависимых) групп с поправкой Бонферрони</p>
Сравнение независимых (несвязанных) групп по количественным признакам (ДБХ, ТКНК, ЛПИ, S некроза, Мичиганского опросника, шкалы NSS.) на каждом сроке наблюдения	U - критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони

Для проведения статистического анализа и моделирования использовался ноутбук SAMSUNG NP300E5X стандартной конфигурации с объемом ОЗУ 4 Гб и тактовой частотой процессора 2,5 МГц. Для формирования матрицы данных и подготовки таблиц в исследовании использовались программы MS Office 2010 и MS Excel 2010. Для статистического анализа полученных в ходе исследования данных использовалась программа Statistica for Windows 10.0.

Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1 Результаты экспериментального исследования

В результате постановки модели аллоксанового диабета после моделирования кожной раны до окончания всего эксперимента не дожило одно животное контрольной группы, в этой связи статистический анализ проводился с учетом этой корректировки.

Результаты планиметрии у животных трех групп были различными. В контрольной группе только у одного животного в течение 10 суток произошла полная эпителизация кожного дефекта. Среди животных получивших 60 мкг pCMV-VEGF165 – у трех, а после введения максимальной для данного эксперимента дозы у 5 животных (62,5%) констатировано полное заживление раны (рис. 6). В ряде случаев заживление проходило под струпом, поэтому для окончательного принятия решения о заживлении ожидали данных гистологического исследования.

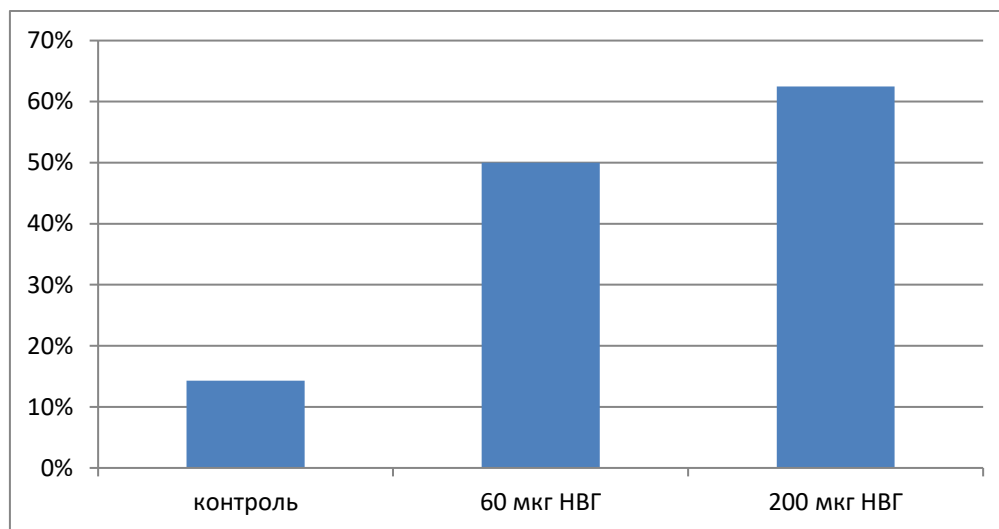


Рис. 6. Доля животных (в %), у которых в течение 10 суток произошла полная эпителизация раневого дефекта кожи

Посуточная планиметрия продемонстрировала динамику заживления кожных ран. Из статистического анализа были удалены животные с полной эпителизацией. При этом оказалось, что в первые трое суток размер раневого дефекта существенно не меняется (рис. 7).

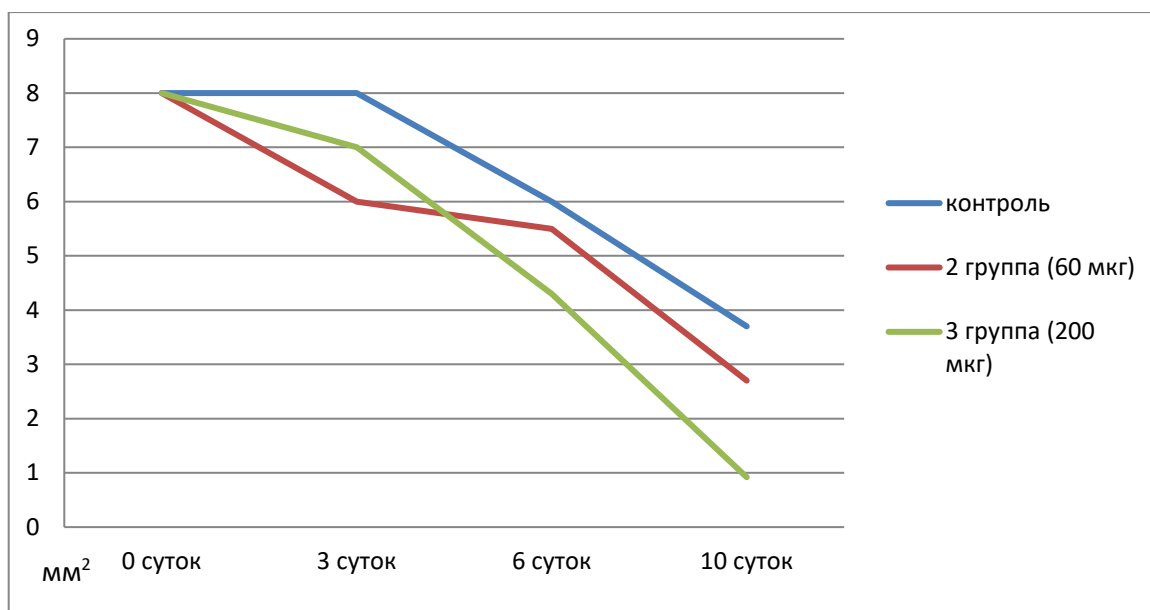
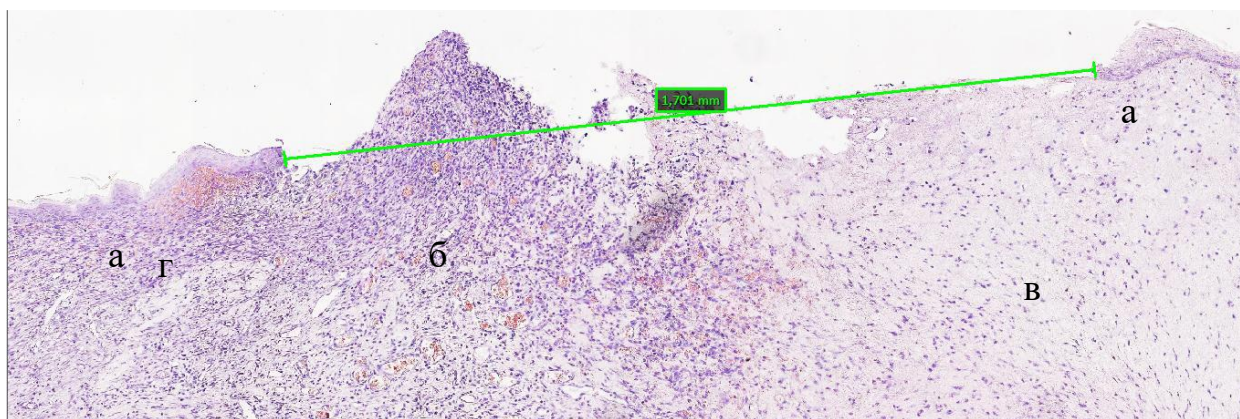


Рис. 7. Размеры кожной раны у животных различных групп (мм²): синяя кривая – контроль, красная – 2 группа (60 мкг pCMV-VEGF165), зеленая – 3 группа (200 мкг pCMV-VEGF165)

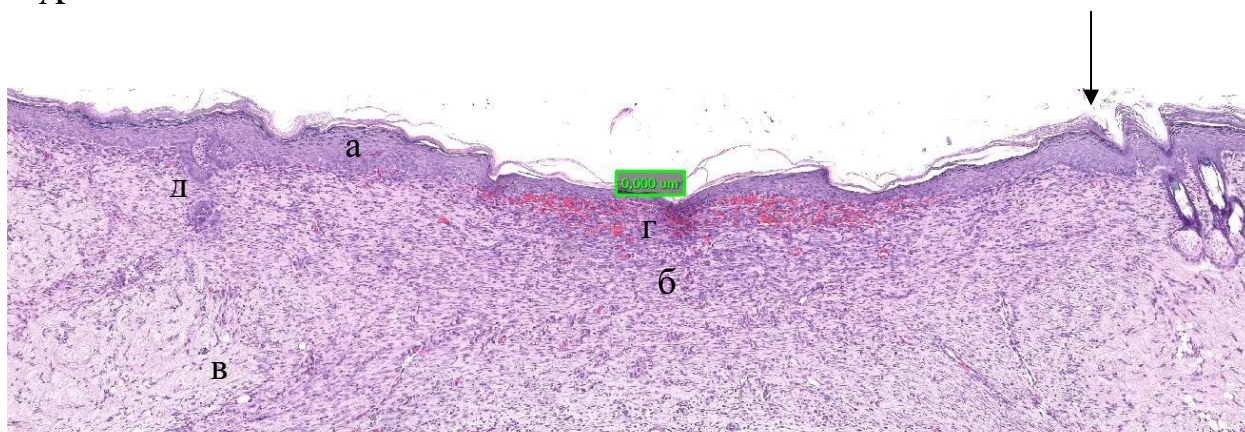
В контрольной группе к концу эксперимента средний размер дефекта (по наибольшему размеру) составил $3,7 \pm 0,5$ мм. У животных получивших 60 мкг плазмиды – $2,7 \pm 0,6$, а в третьей группе – $0,92 \pm 0,7$ мм ($p=0,038$ для 3 группы по сравнению с группой контроля). Следовательно, с учетом того, что по параметрам содержания и набору манипуляций группы отличались только наличием и дозой препарата, следует констатировать, что эффект на рост эпителия заключается в ускорении эпителизации раны, причем этот эффект носит дозозависимый характер.

Гистологически в контрольной группе отмечалось протекание ряда естественных гистогенетических процессов. Во-первых, к 10 суткам прошли явления острого экссудативного воспаления и превалировали собственно регенерационные явления. Часто под краем эпителия можно было обнаружить богато инфильтрованную полиморфноядерными лейкоцитами грануляционную ткань. Она характеризовалась высокой клеточностью, из-за чего эти участки раны при окрашивании гематоксилином и эозином выглядели базофильно (рис. 8 (А)). В некоторых топографических зонах раны грануляционная ткань уже находилась на более продвинутых этапах

гистогенеза, эти поля зрения характеризовались невыраженным инфильтратом, большим количеством оксифильного волокнистого соединительнотканного матрикса. Во-вторых, в некоторых участках обнаруживали зоны с богатой васкуляризацией; они располагаются как под эпителиальным пластом, так и в толще незрелой грануляционной ткани. Третьим процессом следует указать репаративную регенерацию многослойного плоского эпителия. У краев дефекта его стратификация выражена нечетко, центробежное вертикальная анизоморфия нарастает, на расстоянии 1 мм уже можно различить базальный, шиповатый и роговой слои, появляются признаки десквамации. Следует отметить, что в этот момент придатки кожи еще не сформировались, кожные сосочки не наблюдаются, однако толщина эпителиального пласта приближается к обычным величинам.



А



Б

Рис. 8. Кожная рана у животных контрольной группы (А) и группы, получившей 200 мкг rCMV-VEGF165 (Б): а – многослойный плоский эпителий кожи; б – инфильтрированная полиморфноядерными лейкоцитами

грануляционная ткань; в – новообразованная соединительная ткань с незначительной инфильтрацией; г – участки ангиоматоза; д – участок дифференцировки придатков кожи; дефект эпителия отмечен зеленым отрезком; черная стрелка – уровень неповрежденной кожи с придатками;

Окраска: гематоксилин и эозин. Ув. $\times 100$

Края дефекта часто выглядят как утонченные конусы роста, однако встречаются и тупо заканчивающиеся эпителиальные регенераты, вероятно наличие плотного струпа было в этих случаях непреодолимым препятствием для роста.

В группах животных после применения препарата гистологическая картина также соответствовала типичной картине заживления большой по площади кожной раны. Вместе с тем в большинстве случаев процесс находился на более зрелой стадии. Дефект эпителия или не выявлялся, или был незначительных размеров. «Цветущая» грануляционная ткань сохранялась преимущественно в центральных участках раневого дефекта. Ей были присущи все типичные характеристики – богатое кровоснабжение, полиморфноклеточная лейкоцитарная инфильтрация, большое число клеток соединительнотканного ряда – молодых фибробластов, которые, однако, еще не приступили к активному синтезу матрикса. Чем ближе к бывшим краям раневого дефекта, которые можно выявить по появлению придатков кожи – волосяных фолликулов и сальных желез, тем более зрелая и даже фиброзированная соединительная ткань заполняла объем поврежденной дермы. Центробежно наблюдалось уменьшение лейкоцитарной инфильтрации, скученно расположенных сосудов, соединительнотканых клеточных элементов, которые в наиболее «зрелых» участках были представлены уже в основном терминальными звеньями дифферона – префиброцитами и фиброцитами. Отмечается увеличение удельного объема межклеточного вещества.

Стратификация эпителиального пласта была восстановлена на большей части площади восстановленного эпителия, в большинстве участков легко различить базальный, шиповатый, зернистый и роговой слои, лишь в центральных участках стратификация редуцирована до трех слоев, однако роговой дескамирующийся слой можно наблюдать везде, где восстановлен эпителий. В некоторых (редких) участках отмечено врастание в подлежащую новообразованную дерму тяжей кожного эпителия, которые начинают дифференцироваться в первоначальные элементы волосяных луковиц (см. рис. 8 (Б)).

Таким образом, введения индуктора ангиогенеза приводит к заметным изменениям гистологического строения заживающей раны на сроке 10 суток. В частности, отмечается более интенсивное образование и дифференцировка грануляционной ткани, что приводит к раннему формированию молодой рубцовой ткани на месте дефекта. По восстановленной таким образом дерме интенсивнее нарастает эпителий, он быстро дифференцируется до дефинитивного вида, начинает формировать придатки.

Различная васкуляризация грануляционной ткани и новообразованной соединительной ткани дермы подтверждается иммуногистохимически. Так при морфометрическом анализе установлено, что в центральных участках, где у большинства групп сохраняется грануляционная ткань или в виде островков, или в виде массивов при самостоятельном заживлении дефекта (вода для инъекций) количество сосудов в поле зрения составило $6,15 \pm 2,2$ (рис. 9 (А)). В группах получивших препарат в ранее указанных дозах – $8,2 \pm 2,2$ и $11,4 \pm 2,7$ соответственно. Различия по данному показателю оказались статистически значимы между контролем и группой 3 ($p = 0,038$).

Для периферической части регенерата оказалась справедлива та же закономерность, а именно, количество сосудов в поле зрения в группе контроля $5,1 \pm 1,9$; в группе 2 – $8 \pm 4,4$; в группе 3 – $7,8 \pm 1,7$ (рис. 9 (Б)). При сравнении групп 1 и 3 различия оказались статистически значимы ($p = 0,046$).

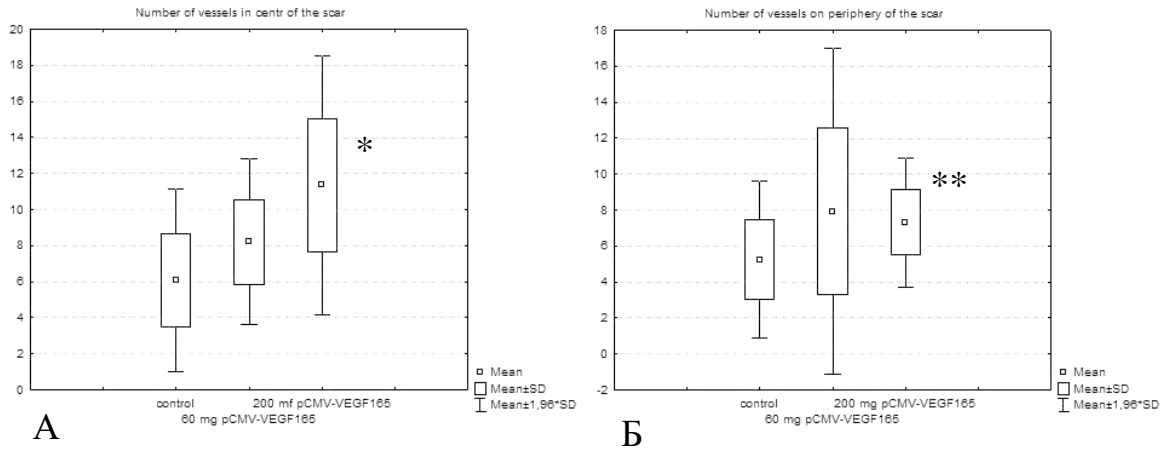


Рис. 9. Результаты морфометрической оценки развитости сосудистого русла в центральной части (А) и периферической части кожного регенерата (Б) (шт).

Различия статистически значимы при сравнении с контролем:

* - $p=0,038$; ** - $p=0,046$

Иммуногистохимическое выявление α ГМА-положительных структур в стенке сосудов позволило обнаружить сосуды различного калибра, от мельчайших – с внутреннем просветом менее диаметра эритроцита (около 5-7 мкм), до толстостенных диаметром около 100 мкм. В последних гладкомышечные клетки образуют несколько слоев в составе *t. media* (рис. 10). В тех случаях, когда срез проходил вдоль сосуда, визуализировались четкообразные увеличения его просвета, вероятно соответствующие местам отхождения многочисленных ветвей.

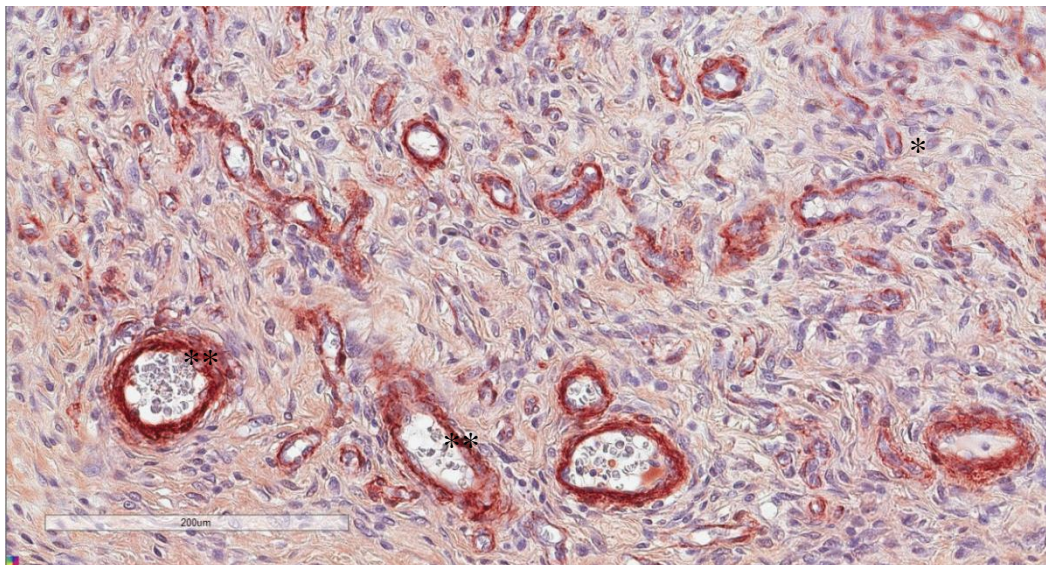


Рис. 10. Фрагмент грануляционной ткани центральной части регенерата животного контрольной группы: * - мелкие сосуды; ** - толстостенные сосуды.

Иммуногистохимическая реакция с антителами к α ГМА, докраска гематоксилином. Ув. $\times 250$

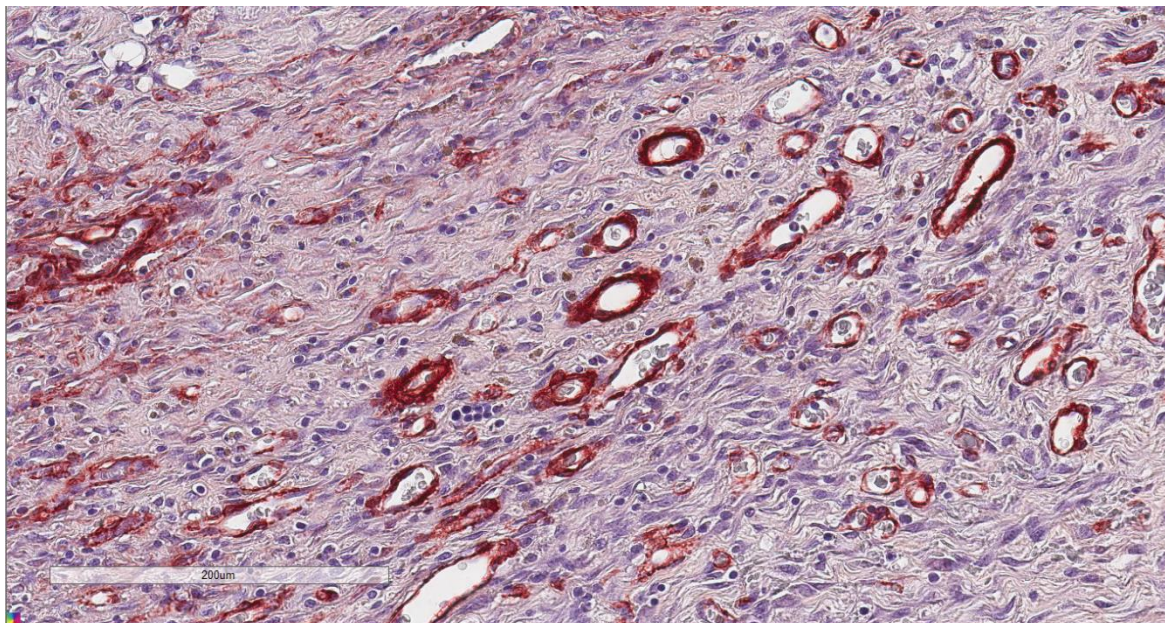


Рис. 11. Фрагмент грануляционной ткани центральной части регенерата животного 3 группы. Иммуногистохимическая реакция с антителами к α ГМА, докраска гематоксилином. Ув. $\times 250$

В экспериментальных группах отмечено более плотное расположение сосудов, причем их диаметр был в основном мельче чем при самостоятельном заживлении. Следует предположить, что интенсивнее протекающие процессы ангиогенеза обратно пропорциональны диаметру сосудов (рис. 11).

Интересной находкой стало обнаружение различий иннервации регенерата. Под воздействием плазмиды, кодирующей VEGF, рост нервных волокон оказался более выраженным, располагались они преимущественно группами, а не по одиночке как в контроле (рис. 12, 13). Морфометрический анализ показал, что и в случае роста нерва имеется дозозависимый эффект, в препаратах от животных, получивших 200 мкг рCMV-VEGF165 количество нейрофиламент-положительных структур почти в 1,5 раза превышает и контроль и показатели животных второй группы (рис. 14). Несмотря на то, что различия

оказались статистически незначимыми они демонстрируют тенденцию проявлять фактору нейротропный эффект, который, вероятно, мог бы быть выявлен достоверно при других сроках наблюдения.

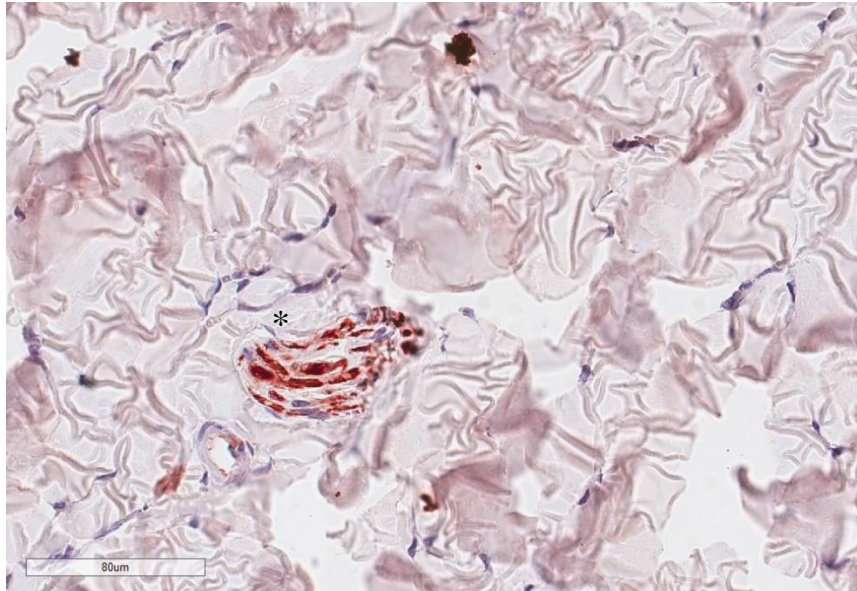


Рис 12. Участок периферической части регенерата животного контрольной группы: * одиночная ветка кожного нерва. Иммуногистохимическая реакция с антителами к нейрофиламентам. Матрикс соединительной ткани поврежден при термической обработке среза для постановки реакции. Докраска гематоксилином. Ув. ×400

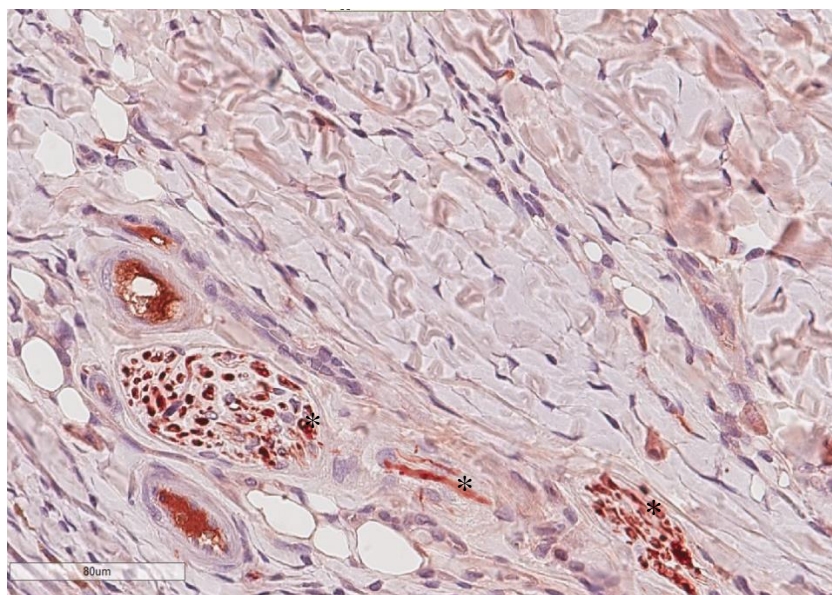


Рис 13. Участок периферической части регенерата животного 3 группы (200 мг pCMV-VEGF165): * ветви кожного нерва. Иммуногистохимическая реакция с антителами к нейрофиламентам. Матрикс соединительной ткани поврежден при термической обработке среза для постановки реакции. Докраска гематоксилином. Ув. $\times 400$

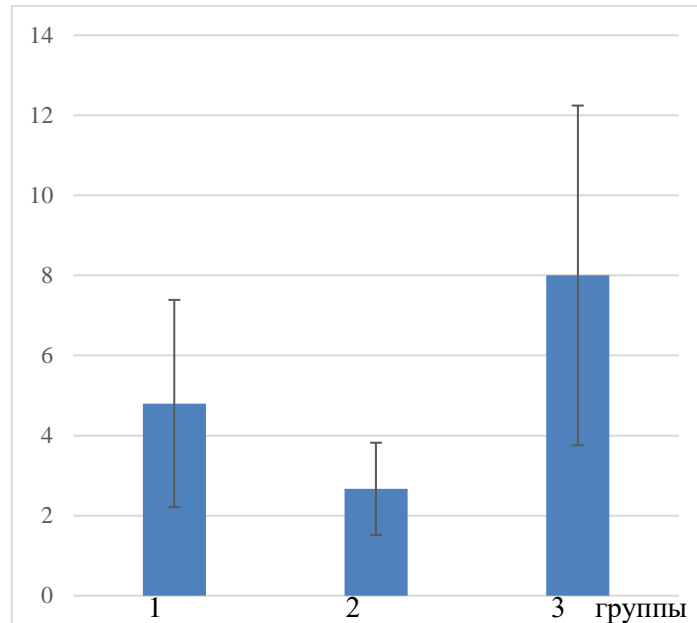


Рис. 14. Результаты морфометрической оценки количества нервов в периферической части регенерата (шт.): 1 – контроль, 2 – 2 группа, 3 – 3 группа

Таким образом, проведенное экспериментальное исследование показывает, что заживление модельного дефекта кожи на фоне гипергликемии, индуцированной аллоксановым повреждением бета клеток островков Лангерганса различается у животных не получавших и получавших препарат плазмиды, кодирующей эндотелиальный сосудистый фактор роста. Эти различия заключаются в изменении динамики основных гистогенетических процессов в ране: роста эпителиальной ткани, о чем свидетельствует изменение площади раневого дефекта, объемов и степени «зрелости» грануляционной ткани, количества и качества кровеносных сосудов и нервного аппарата кожи. Статистически значимые результаты по сравнению с контролем получены для изменения площади раны, количества кровеносных микрососудов в составе регенерата. Во всех случаях существенные различия были показаны для

животных получивших высокую дозу препарата – 200 мкг, что свидетельствует о дозозависимом эффекте при действии плазмидных конструкции. Вместе с тем, при трактовке выявленных результатов следует учесть, что исследование охватывало лишь один срок.

3.2 Результаты клинического исследования

За время клинического исследования не было зарегистрировано случаев местной или системной аллергической или воспалительной реакции. Использование препарата вызывало незначительные болезненные ощущения во время процедуры, в связи с внутримышечным введением препарата, при этом пациентам не требовалось местное обезболивание, и болевые ощущения прекращались сразу после окончания инъекции. Всем пациентам проводили общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи и анализ коагулограммы крови. За время наблюдения за пациентами не было отмечено значимых колебаний со стороны общеклинических лабораторных показателей, а так же фактов выявления новообразований при прохождении пациентами повторных осмотров (таблицы 7-10.). Таким образом, за время проведения исследования не было зарегистрировано ни одного случая серьезной нежелательной реакции и побочного явления от введения плазмиды pVEGF-165.

Таблица 7.

Средние показатели общего анализа крови.

Показатель	Норма	I группа (опер.) исходно	I группа (опер.) через 6 мес.	III группа (опер.+НВГ) исходно	III группа (опер.+НВГ) через 6 мес.	II группа (конс.) исходно	II группа (конс.) через 6 мес.	IV группа (конс.+НВГ) исходно	IV группа (конс.+НВГ) через 6 мес.
Эритроциты, $10^{12}/л$	3,7-4,7	4,2±0,09	4,2±0,08	4,4±0,07	4,3±0,08	4,1±0,09	4,2±0,11	4,1±0,87	4,1±0,64
Гемоглобин, г/л	110-150	140,2±0,81	138,5±0,71	150,4±0,78	149,2±0,6	137,6±0,59	138,8±0,54	137,1±0,61	136,9±0,78
Лейкоциты, $10^9/л$	4,0-8,8	7,6±0,87	7,1±0,78	7,9±0,34	8,2±0,51	8,4±0,64	8,1±0,58	7,7±0,44	7,8±0,59
Палочкоядерные, %	1-6	2,1 ±0,09	2,3±0,11	1,5±0,1	1,6±0,41	1,8±0,09	1,9±0,08	2,2±0,11	2,1±0,15
Сегментоядерные, %	45-70	65,4±3,1	64,1±2,9	62,2±3,21	63,1±2,91	64,5±2,31	63,1±2,11	61,7±3,12	63,1±2,02
Лимфоциты, %	18-40	21,1±1,1	22,1±1,3	25,2±1,91	23,9±1,72	23,7±1,91	25,5±2,01	23,3±2,7	24,1±2,01
Моноциты, %	2-9	4,7±1,1	4,6±1,2	5,1±0,87	5,1±0,46	5,6±0,7	5,3±0,65	4,9±0,13	4,9±0,15
СОЭ, мм/ч	1-15	13,1±1,7	12,4±1,9	14,1±0,91	13,7±0,81	12,9±0,9	13,1±0,91	11,9±0,92	11,1±0,89

Таблица 8.

Средние показатели биохимического анализа крови.

Показатель	Норма	I группа (опер.) исходно	I группа (опер.) через 6 мес.	III группа (опер.+НВГ) исходно	III группа (опер.+НВГ) через 6 мес.	II группа (конс.) исходно	II группа (конс.) через 6 мес.	IV группа (конс.+НВГ) исходно	IV группа (конс.+НВГ) через 6 мес.
Общий белок, г/л	70-90	73,1±2,11	74,5±2,15	72,1±2,11	74,5±2,14	78,1±2,97	79,1±3,01	77,2±3,15	78,1±3,62
Билирубин общий, мкмоль/л	>17	12,4±1,45	12,9±1,81	13,4±1,72	14,1±1,09	12,9±1,96	12,1±1,74	11,1±2,01	12,1±1,89
Мочевина, ммоль/л	1,7-8,3	5,5±0,91	5,4±0,97	5,9±0,45	6,1±0,78	6,9±1,01	6,7±0,97	6,5±1,01	6,3±0,95
Креатинин, мкмоль/л	65-115	92,3±4,21	91,4±3,95	89,2±3,7	90,1±3,4	94,5±4,23	93,1±4,11	95,9±3,97	96,1±3,78
Холестерин, ммоль/л	>5,2	5,11±0,97	4,9±0,95	4,9±0,78	4,8±0,64	5,12±0,91	4,8±0,87	4,9±1,11	4,7±0,9
АСТ, Ед/л	>32	26,3±1,75	24,1±1,85	24,1±1,12	23,9±1,21	23,1±1,35	24,5±1,78	23,1±1,65	23,2±1,78
АЛТ, Ед/л	>40	29,2±2,01	28,3±1,78	28,1±1,91	27,6±1,74	26,2±1,84	25,9±1,95	25,9±1,78	24,9±1,54
Глюкоза, ммоль/л*	3,3-6,4	7,2±2,01	6,9±1,87	7,2±1,02	6,8±0,99	6,9±1,45	6,7±1,26	7,1±1,36	6,7±1,14

*повышенные показатели глюкозы обусловлены наличием фонового сахарного диабета у всех пациентов, включенных в исследование.

Таблица 9.
Средние показатели коагулограммы.

Показатель	Норма	I группа (опер.) исходно	I группа (опер.) через 6 мес.	III группа (опер.+НВГ) исходно	III группа (опер.+НВГ) через 6 мес.	II группа (конс.) исходно	II группа (конс.) через 6 мес.	IV группа (конс.+НВГ) исходно	IV группа (конс.+НВГ) через 6 мес.
Фибринолитическая активность, мин*	5-10	9,8±1,1	9,2±0,97	9,5±0,78	9,3±0,84	9,1±0,78	9,1±0,64	9,7±1,69	9,3±1,44
Фибриноген, г/л*	2,0-4,0	3,9±0,34	3,7±0,42	3,8±0,64	3,7±0,54	3,7±0,71	3,6±0,64	3,7±0,98	3,6±0,87
Частично активированное тромбопластиновое время, с	24-34	32±2,11	31,1±2,01	32,2±1,98	30,5±1,56	31,1±1,15	32,1±1,34	29,8±2,02	29,5±1,88
Тромбиновое время, сек.	16-19	18,2±1,23	18,1±1,32	17,2±1,54	17,4±1,64	16,9±1,65	16,1±1,45	17,2±1,7	17,6±1,54
Протромбиновый индекс	0,9-1,05	1,003±0,02	1,002±0,03	1,002±0,02	0,998±0,02	0,996±0,01	1,001±0,02	1,003±0,02	1,001±0,03
Количество тромбоцитов, 10 ⁹ /л	250-400	261,3±4,21	270±5,12	268±5,01	280±6,09	275±5,78	278±5,35	284±4,15	281±4,01

*показатели фибринолитической активности и концентрации фибриногена, близкие к пороговому значению, могут быть обусловлены фоновым СД.

Таблица 10.
Средние показатели общего анализа мочи

Показатель	Норма	I группа (опер.) исходно	I группа (опер.) через 6 мес.	III группа (опер.+НВГ) исходно	III группа (опер.+НВГ) через 6 мес.	II группа (конс.) исходно	II группа (конс.) через 6 мес.	IV группа (конс.+НВГ) исходно	IV группа (конс.+НВГ) через 6 мес.
Удельный вес	1,003-1,020	1,014±0,001	1,012±0,002	1,013±0,003	1,014±0,002	1,016±0,003	1,015±0,002	1,017±0,002	1,015±0,001
Белок	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Глюкоза*	<0,8 ммоль/л	0,9	0,4	0,5	0,3	0,8	0,4	0,6	0,5
Ацетон	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Эпителий в п/зр	0-1-2-3	2	1-2	1-2	1-2	2	2	1-2	1-2
Лейкоциты в п/зр	0-0-1	0-1	0-1	0-0-1	0-0-1	0-1	0-1	0-0-1	0-0-1
Эритроциты в п/зр	0	0	0	0	0	0-1	0-1	0-1	0-1
Бактерии	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*превышение порогового показателя глюкозурии обусловлено неадекватностью гипогликемической терапии у пациента на момент поступления в стационар, в дальнейшем при подборе лечения, данный показатель приходил в норму.

Эффективность лечения в группах с оперативным вмешательством (I, III) оценивалось в первую очередь по числу летальных исходов и сохранности конечности в ближайшем (3, 6 мес.) и отдаленном (1 год) периоде. Дополнительными критериями эффективности служили: дистанция безболевой ходьбы, проходимость зоны реконструкции, степень компенсации кровообращения (изменение стадии заболевания) и динамика купирования клиники критической ишемии по ходу исследования.

Инструментальные методы исследования, такие как ТКНК, ЛПИ, ЛСК не были включены в оценку эффективности лечения для пациентов I и III групп в связи с достоверным приростом всех показателей после выполнения прямой реваскуляризации, не зависимо от наличия сопутствующей дополнительной терапии (в том числе и генной индукции).

Для пациентов в группах комплексного терапевтического лечения эффективность терапии оценивалась в первую очередь так же по количеству летальных исходов и сохранности конечности. Дополнительными методами для оценки эффективности лечения служили уменьшение S некрозов, степень компенсации кровообращения (стадия заболевания), показатели ТКНК, ДБХ, ЛСК, и динамика тяжести диабетической нейропатии, оцениваемая с помощью Мичиганского опросника и шкалы NSS.

Оценка причин летальных исходов и сохранности конечности.

Летальность.

Основными задачи лечения пациентов с КИНК - сохранение жизни, сохранение конечности, сохранение коленного сустава в случае неизбежности большой ампутации (уровень доказательности C (КЛАСС I)), а отдаленный прогноз для данной группы пациентов в течение 1 года сопоставим по тяжести со злокачественными новообразованиями [60], поэтому в качестве основных критериев эффективности лечения для всех групп оценивались показатели летальных исходов и сохранности конечности.

Для определения достоверности различий между сравниваемыми группами по качественным данным выполнялось построение таблиц сопряженности 2×2 с

использованием методики χ^2 с поправкой Йетса и точного критерия Фишера (таблица 11).

Таблица 11

Количество ампутаций и летальных исходов в динамике исследования

Показатель	Летальные исходы			Количество ампутаций		
	3 мес.	6 мес.	1 год	3 мес.	6 мес.	1 год.
Время наблюдения						
I (опер.) (n=45)	-	5 (11,1%)	8 (17,7%)	7 (15,6%)	13 (28,8%)	17 (37,8%)
III (опер+НВГ) (n=30)	-	1 (3,3%)	4 (13,3%)	1 (3,3%)	3 (10%)	5 (16,7%)
Статистическая значимость между группами I-III (pI-III)	1,000	0,223	0,430	0,094	0,032	0,041
II (конс.) (n=40)	3 (7,5%)	6 (15%)	10 (25%)	10 (25%)	17 (42,5%)	24 (60%)
IV (конс.+НВГ) (n=25)	1 (4%)	2 (8%)	4 (16%)	2 (8%)	5 (20%)	9 (36%)
Статистическая значимость между группами II-IV (pII-IV)	1,000	0,165	0,296	0,082	0,041	0,0496

При анализе летальных исходов в группах с хирургическим лечением получены следующие результаты. В I группе через 3 месяца летальных исходов зарегистрировано не было, через 6 месяцев наблюдения было зарегистрировано 5 летальных исходов – 11,1%, а через 1 год данный показатель составил 17,7% (8 человек). При этом в 4 случаях предварительно была выполнена ампутация конечности, еще 3 пациента имели декомпенсацию кровообращения в виде гангрены конечности, но отказывались от госпитализации. Только 1 летальный исход был не связан с патологией артерий нижних конечностей (ИМ). В III группе не было выявлено летальных исходов за первые 3 месяца наблюдения. Через 6 месяцев выявлен 1 случай - 3,3%, а через 1 год 4 случая – 13,3% (1 пациент предварительно перенес ампутацию, в 1 случае имелась гангрена ишемизированной конечности и еще в 2 случаях зарегистрирован летальный исход от кардиальной патологии) (рис. 6).

В группе стандартной консервативной терапии (II) через 3 месяца выявлено 3 летальных исхода, что составило 7,5%. Через полгода зарегистрировано 6 случаев – 15%, а через 1 год наблюдения 10 случаев – 60% (6 пациентов предварительно перенесли ампутацию, еще 3 имели гангрену

конечности, в 1 случае причиной летального исхода был ИМ). В группе комбинированной терапии (IV) зарегистрирован один летальный случай через 3 месяца от начала исследования – 4%, через 6 месяцев данный показатель составил 8% (2 человека), а через 1 год – 16% (4 человека). При этом в 2 случаях предварительно выполнялась ампутация, в 1 случае имелась гангрена ишемизированной конечности и еще 1 летальный исход зарегистрирован по причине инфаркта миокарда (рис. 15).

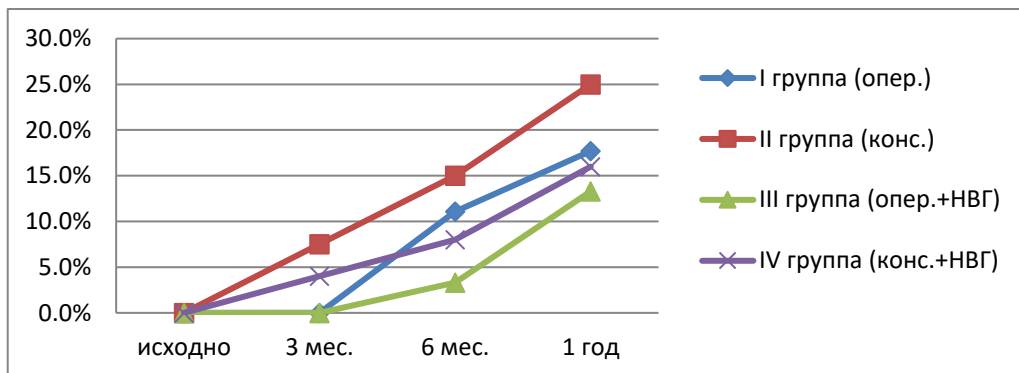


Рис. 15. Динамика летальных исходов за время исследования

При сравнении между группами не было выявлено достоверных различий по анализируемому параметру за время проведения исследования, однако, в процентном соотношении, лучшие показатели выживаемости пациентов были получены в группах с дополнительной генной индукцией (III и IV) по сравнению с аналогичными группами с хирургическим и терапевтическим подходом (таблица 11). Полученные данные напрямую коррелируют с большим количеством перенесенных ампутаций по причине прогрессирования заболевания и ухудшения кровообращения во II группе, и с большим числом ампутаций, выполненных после осложнений реваскуляризирующих оперативных вмешательств с развитием декомпенсации кровообращения в I группе.

При анализе летальных исходов необходимо обратить внимание, что суммарно из всех пациентов, включенных в исследование (n=140), осложнения, повлекшие смерть пациента, возникли в 26 случаях (18,5%). При этом 13 больных перенесли ампутацию конечности, а еще 8 имели признаки декомпенсации кровообращения в виде некрозов и гангрены конечности. То

есть в 21 случае (80,8%) из 26 имелась прямая связь с прогрессированием основного заболевания, и только 5 смертельных случаев были связаны с сопутствующей кардиальной патологией – ИМ (рис. 16).

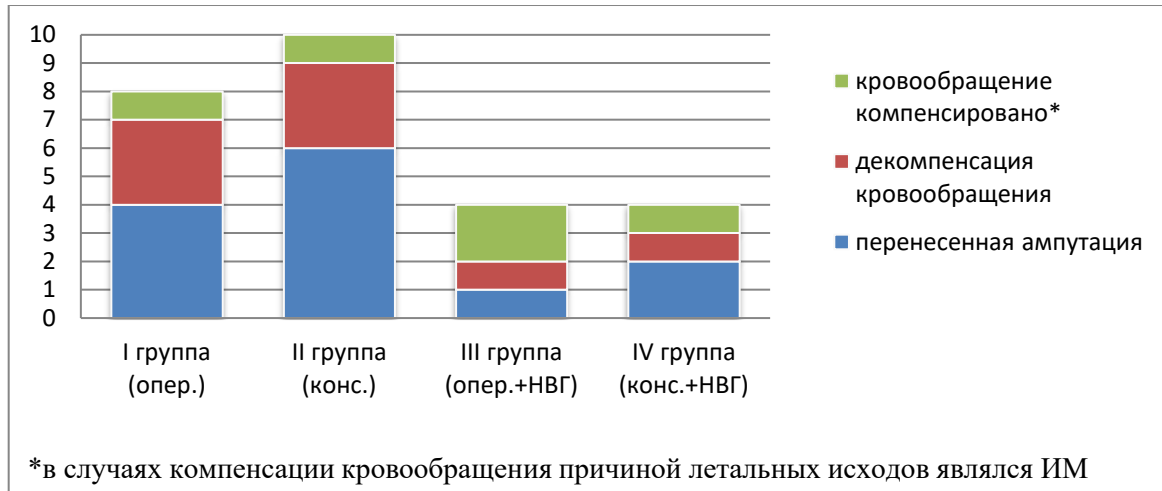


Рис. 16. Статус ишемизированной конечности при летальных исходах
Сохранность конечности.

В исследовании также проводилась оценка сохранности конечности в ближайшем и отдаленном периоде.

Для пациентов I группы (оперативное лечение) процент утраты конечности через 3 месяца наблюдения составил 15,6% (7 ампутаций), через 6 месяцев наблюдения 28,8% (13 случаев), а через 1 год – 37,8% (17 случаев). В III группе (оперативное лечение + генная индукция) через 3 месяца наблюдения зарегистрирован 1 случай ампутации – 3,3%, через 6 месяцев наблюдения процент утраты конечности составил 10% (3 ампутации), а через 1 год – 16,7% (5 случаев) (рис. 17).

В группе стандартной консервативной терапии (II) через 3 месяца наблюдения выполнено 10 ампутаций – 25%, через 6 месяцев наблюдения зарегистрировано 17 аналогичных исходов, что составило 42,5%. Через 1 год данный показатель составил 60% (24 случая). В группе комплексной терапии (IV) через 3 месяца наблюдения зарегистрировано 2 ампутации – 8%, через 6 месяцев после начала исследования утрата конечности отмечена в 5 случаях – 20%, а через 1 год было выявлено 9 аналогичных исходов – 36% (рис. 17).

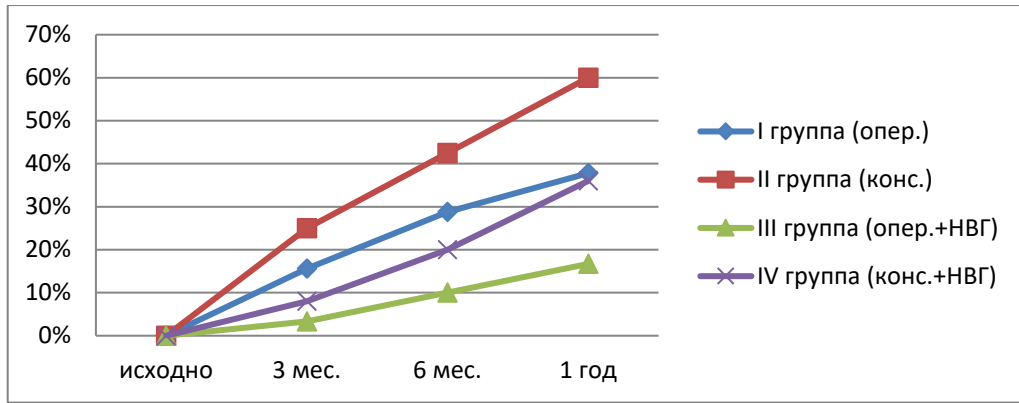


Рис. 17. Динамика количества ампутаций за время исследования

При сопоставлении полученных данных и анализе между группами пациентов с хирургическим (I и III группы) подходом была получена достоверная разница по прогнозу сохранности конечности через 6 мес. ($p=0,032$) и 1 год ($p=0,041$) наблюдения. Так же достоверные различия были получены между группами с консервативным подходом (II и IV группы) в срок 6 мес. ($p=0,041$) и 1 год ($p=0,0496$) наблюдения (таблица 11).

Отмечено, что процент ампутаций в I и IV группах сопоставим, то есть эффективность оперативного вмешательства соответствовала эффективности комбинированной консервативной терапии с дополнительной ангиогенной стимуляцией в отношении показателя сохранности конечности через 1 год наблюдения.

Таким образом, дополнительная терапевтическая индукция ангиогенеза достоверно улучшает прогноз сохранности конечности на интервале наблюдения от 6 месяцев до 1 года, как в комбинации с хирургической реваскуляризацией, так и в составе комплексной консервативной терапии. Наилучший результат сохранности конечности в течение 1 года наблюдения за больными получен в III группе комбинированного лечения (операция + генная терапия) – 90%, наиболее неблагоприятный прогноз получен в отношении II группы (стандартная консервативная терапия) – 42,5%.

Дистанция безболевого ходьбы

При оценке нормальности распределения количественного признака закону нормального распределения использовался критерий Шапиро-Уилка.

Нормальное распределение признака было получено в отношении ДБХ для I группы в срок 3 и 6 мес., для III и IV группы в срок 6 мес., в остальных случаях распределение было ненормальным (таблица 12).

Таблица 12

Соответствие вида распределения признака в каждой группе закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка для показателя ДБХ

группа	Срок наблюдения		
	исходно	3 мес.	6 мес.
р, I группа	<0,001	0,403	0,084
р, III группа	<0,001	0,041	0,067
р, II группа	<0,001	0,003	0,068
р, IV группа	<0,001	0,005	0,037

При анализе показателя дистанции безболевого ходьбы выявлен прирост для всех групп, включенных в исследование. Наиболее выраженное увеличение показателя было выявлено в группах, которым выполнялось оперативное лечение (таблица 13).

Таблица 13

Сводные данные по показателю ДБХ (м)

Группа	показатель	Срок наблюдения		
		исходно	3 мес.	6 мес.
I (опер.) (n=45)	Число наблюдений	45	38	29
	Среднее	4,6 м	126 м	151,7 м
	Медиана	0	115	150
	Нижняя-Квартиль	0	80	110
	Верхняя-Квартиль	5	170	180
	Ст.откл	7,6	68	60,2
	Станд. ошибки	1,1	10,7	10,8
внутригрупповое значение р		р 0-3 мес.<0,001	р 3-6 мес.=0,225	р 0-6 мес.<0,001
III (опер.+ НВГ) (n=30)	Число наблюдений	30	30	29
	Среднее	8,2 м	100,3 м	132,1 м
	Медиана	0	95	150
	Нижняя-Квартиль	0	50	70
	Верхняя-Квартиль	10	150	200
	Ст.откл	13,6	69,2	74,2
	Станд. ошибки	2,5	12,6	14,3
внутригрупповое значение р		р 0-3 мес.<0,001	р 3-6 мес.=0,03	р 0-6 мес.<0,001
межгрупповое значение р I-III		0,625	0,090	0,240
II (конс.) (n=40)	Число наблюдений	40	29	20
	Среднее	0 м	26,9 м	48,5 м
	Медиана	0	20	57,5
	Нижняя-Квартиль	0	0	27,5

	Верхняя-Квартиль	0	40	65
	Ст.откл	0	24,9	21,7
	Станд. ошибки	0	4,6	4,9
внутригрупповое значение р		р 0-3 мес.<0,001	р 3-6 мес.=0,009	р 0-6 мес.<0,001
IV (конс.+ НВГ) (n=25)	Число наблюдений	25	22	19
	Среднее	0 м	42,3 м	72,9 м
	Медиана	0	50	80
	Нижняя-Квартиль	0	10	50
	Верхняя-Квартиль	0	70	110
	Ст.откл	0	30,6	40,3
	Станд. ошибки	0	6,5	9,2
внутригрупповое значение р		р 0-3 мес.<0,001	р 3-6 мес.<0,001	р 0-6 мес.<0,001
межгрупповое значение р II-IV		1,000	0,084	0,032

В I группе средний показатель с $4,6 \pm 1,1$ м увеличился через 3 месяца до $126 \pm 10,7$ м, а к 6 месяцам наблюдения составил $151,7 \pm 10,8$ м. Для пациентов с дополнительной послеоперационной генной индукцией (III группа) ДБХ планомерно увеличивалась с $8,2 \pm 2,5$ м до $100,3 \pm 12,6$ м к 3 мес., и до $132,1 \pm 14,3$ м к 6 мес. наблюдения (таблица 13).

В группах с консервативным подходом изначально все пациенты имели трофические нарушения и IV стадию заболевания, поэтому показатель ДБХ в обеих группах на момент включения равнялся 0. При дальнейшем наблюдении за пациентами и переходе заболевания в III или IIБ стадию производилась его оценка. Во II группе к 3 мес. ДБХ составила $26,9 \pm 4,6$ м, а к окончанию исследования $48,5 \pm 4,9$ м. Для группы с дополнительной генной индукцией (IV) данный показатель составил $42,3 \pm 6,5$ м и $72,9 \pm 9,2$ м для 3 и 6 мес. наблюдения соответственно (таблица 13).

При внутригрупповом сравнении с помощью рангового дисперсного анализа Фридмана и конкорданции Кендалла были выявлены статистически значимые различия между тремя сроками наблюдения для всех групп ($p < 0,001$), что позволило произвести попарные внутригрупповые сравнения с использованием критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони (перерасчет уровня значимости р для множественных парных сравнений по формуле $p \cdot n$, где n – количество парных сравнений) для показателя ДБХ.

При внутригрупповом сравнении достоверность прироста безболевого ходьбы была выявлена для всех групп между моментом включения в исследование и сроками наблюдения в 3 и 6 мес. Но при оценке увеличения ДБХ между сроками наблюдения в 3 и 6 месяцев достоверный прирост получен только для консервативных групп (II и IV), в то время, как у пациентов I группы не было выявлено разницы, что говорит о моментальном влиянии операции на данный показатель, но отсутствия влияния операции для дальнейшей динамики после 3 месяцев. По сравнению с I группой, при дополнении операции генной индукцией (III группа) получен достоверный прирост ДБХ в интервале между 3 и 6 месяцами, что говорит о роли терапевтического ангиогенеза в отсроченном периоде после операции (таблица 13).

При межгрупповом сравнении с использованием рангового дисперсного анализа Краскела-Уоллиса и медианного теста для показателя ДБХ были выявлены статистически значимые различия при всех сроках наблюдения для исследуемых групп ($p < 0,001$), что позволило произвести попарные межгрупповые сравнения с использованием U-критерия Манна Уитни с поправкой Бонферрони.

При межгрупповой оценке результатов лечения пациентов, которым проводилась реваскуляризация конечности (I и III группа), не было выявлено достоверных различий по данному критерию, не зависимо от включения в схему терапии рVEGF-165 (таблица 13).

При оценке показателя ДБХ между группами с консервативным подходом к лечению (II и IV группы) был получен достоверный лучший результат прироста ДБХ при дополненной генной индукции (IV группа) на сроке в 6 мес. (таблица 13).

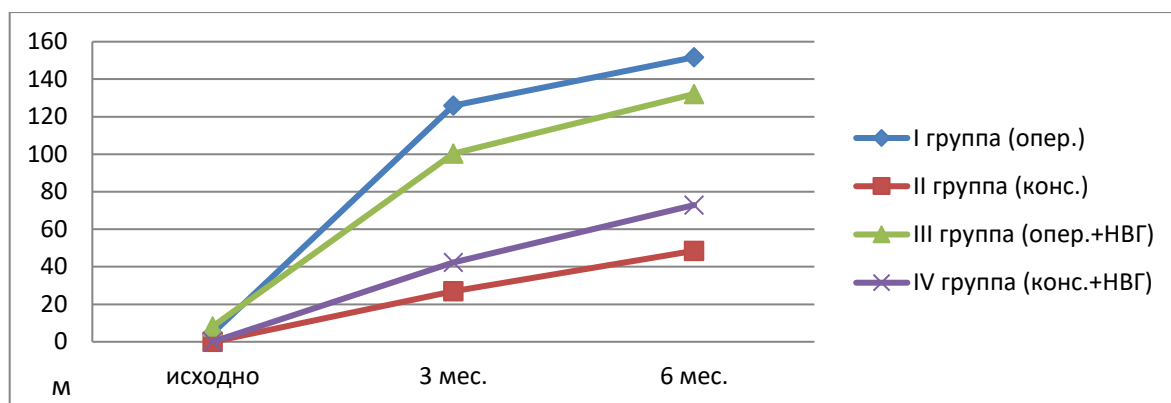


Рис. 18. Динамика изменения показателя ДБХ (м) в различных группах

В целом при проведении исследования показатель ДБХ увеличивался во всех группах (по причине выполнения ампутаций у пациентов с прогрессированием заболевания и выключения их данных при подсчете результатов), но отличительными особенностями был достоверный результат улучшения ДБХ для III группы между 3 и 6 мес. наблюдения (прирост на 31,7% за данный промежуток времени, $p=0,03$), в отличие от I группы (20,3% прирост $p=0,225$). И достоверное отличие при межгрупповом сравнении II и IV групп в пользу последней через 6 мес. исследования (прирост ДБХ с 0 до 72,9 м для IV группы, против 48,5 м для II группы $p=0,032$) (рис. 18).

Динамика заживления некрозов

При оценке соответствия вида распределения признака для показателя «площадь некроза» закону нормального распределения во всех наблюдаемых случаях было выявлено ненормальное распределение (таблица 14).

Таблица 14

Соответствие вида распределения признака в каждой группе закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка для показателя «S некроза»

группа	Срок наблюдения		
	исходно	3 мес.	6 мес.
p, II группа	<0,001	<0,001	<0,001
p, IV группа	<0,001	<0,001	<0,001

Динамика заживления некрозов оценивалась для групп с консервативным подходом (II и IV группы), все пациенты которых на момент включения имели трофические нарушения на нижних конечностях. В обеих группах получена

положительная динамика со стороны заживления некрозов (при прогрессировании заболевания и выполнении ампутации или летального исхода данные пациентов выпадали из статистического анализа) (таблица 15).

Таблица 15

Динамика заживления некрозов (мм²) сводные данные

Группа	показатель	Срок наблюдения		
		исходно	3 мес.	6 мес.
II группа (конс.) (n=40)	Число наблюдений	40	29	20
	Среднее	120,8 мм ²	61,4 мм ²	15 мм ²
	Медиана	100	20	0
	Нижняя - Квартиль	50	0	0
	Верхняя - Квартиль	150	120	0
	Ст.откл	91,6	80,3	32,8
	Станд. ошибки	14,5	14,9	7,3
внутригрупповое значение p		p 0-3 мес.=0,016	p 3-6 мес.=0,093	p 0-6 мес.<0,001
IV группа (конс.+НВГ) (n=25)	Число наблюдений	25	22	19
	Среднее	165,4 мм ²	43,7 мм ²	24,2 мм ²
	Медиана	100	0	0
	Нижняя - Квартиль	50	0	0
	Верхняя - Квартиль	150	50	0
	Ст.откл	180,6	83,8	73,2
	Станд. ошибки	36,1	17,9	16,8
внутригрупповое значение p		p 0-3 мес.=0,003	p 3-6 мес.=0,043	p 0-6 мес.<0,001
межгрупповое значение p II-IV		0,857	0,330	0,708

Во II группе площадь некроза в среднем на момент включения в исследование составляла $120,8 \pm 14,5$ мм², через 3 месяца наблюдения $61,4 \pm 14,9$ мм², и к концу исследования $15 \pm 7,3$ мм² (уменьшение площади некроза на 187% по сравнению с исходным). В группе с дополнительной генной индукцией (IV) на момент включения средний показатель площади некроза составил $165,4 \pm 36,1$ мм², при дальнейшем наблюдении к 3 и 6 месяцам показатель прогрессивно уменьшался до $43,7 \pm 17,9$ мм² и $24,2 \pm 16,8$ мм² соответственно (уменьшение на 185,3%) (таблица 15).

При внутригрупповом сравнении с помощью рангового дисперсного анализа Фридмана и конкорданции Кендалла были выявлены статистически значимые различия между тремя сроками наблюдения ($p < 0,001$), что позволило провести попарные внутригрупповые сравнения с использованием критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони для показателя S некроза (мм²).

Статистически достоверные различия по уменьшению S некрозов для II и IV групп были получены при анализе данных на момент включения, через 3 и 6 мес. наблюдения. Для IV группы, в которой дополнительно проводилась индукция ангиогенеза, кроме того, получена достоверная разница в регрессе некрозов между визитами в 3 и 6 месяцев (таблица 15).

При межгрупповом сравнении не было выявлено достоверных различий по показателю S некроза для всех временных интервалов (таблица 15).

Положительная динамика заживления некрозов и отсутствие статистической значимости при межгрупповом сравнении по изменению площади некрозов обусловлено выбыванием большого количества данных пациентов II группы, у которых при прогрессировании заболевания и отрицательной динамики выполнялась ампутация нижней конечности (n=17). Отличительным моментом является получение статистически достоверного регресса S некроза между визитами через 3 и 6 мес. у пациентов с дополнительной генной индукцией (IV группа), по сравнению с группой стандартной консервативной терапии (II), что говорит об улучшении перфузии тканей не только в первые 3 месяца после лечения, но и в последующем периоде от 3 до 6 месяцев (рис. 19).

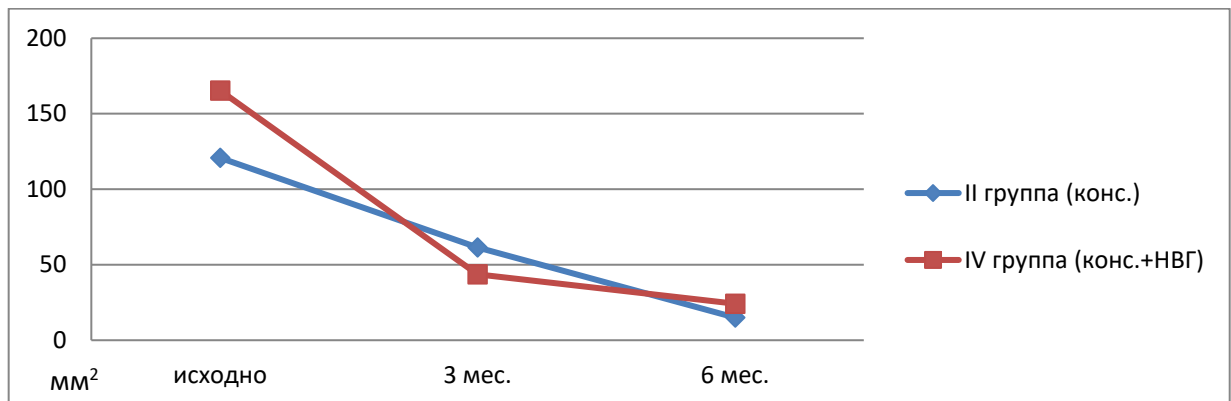


Рис. 19. Динамика уменьшения S некроза (мм²).

Оценка динамики компенсации кровообращения и перехода стадии заболевания.

На этапе включения в исследование все пациенты имели критическую ишемию нижних конечностей. Во время исследования в зависимости от

проходимости выполненной реконструкции, или от ответа на консервативное лечение происходил либо регресс степени ишемии и переход в более легкую стадию заболевания, либо ухудшение перфузии с развитием декомпенсации кровообращения с последующим выполнением ампутации (таблица 16).

Таблица 16

Динамика изменения степени компенсации кровообращения

Группа	кровообращение	3 мес	6 мес
I (опер.) (n=45)	компенсация	35 (77,8%)	29 (64,4%)
	критическая ишемия	3 (6,7%)	0
	ампутация	7 (15,6%)	13 (28,9%)
	летальность общая	0	6 (13,3%)
	летальность без ампутации	0	3 (6,7%)
III (опер.+НВГ) (n=30)	компенсация	23 (76,7%)	22 (73,3%)
	критическая ишемия	6 (20%)	5 (16,7%)
	ампутация	1 (3,3%)	3 (10%)
	летальность общая	0	1 (3,3%)
	летальность без ампутации	0	0
II (конс.) (n=40)	компенсация	12 (30%)	14 (35%)
	критическая ишемия	17 (42,5%)	6 (15%)
	ампутация	10 (25%)	17 (42,5%)
	летальность общая	3 (7,5%)	6 (15%)
	летальность без ампутации	1 (2,5%)	3 (7,5%)
IV (конс.+НВГ) (n=25)	компенсация	12 (48%)	13 (52%)
	критическая ишемия	10 (40%)	6 (24%)
	ампутация	2 (8%)	5 (20%)
	летальность общая	1 (4%)	1 (4%)
	летальность без ампутации	1 (4%)	1 (4%)

В группах с хирургической реваскуляризации явления критической ишемии купировались в полном объеме у всех пациентов с проходимой зоной реконструкции в течение 6 месяцев.

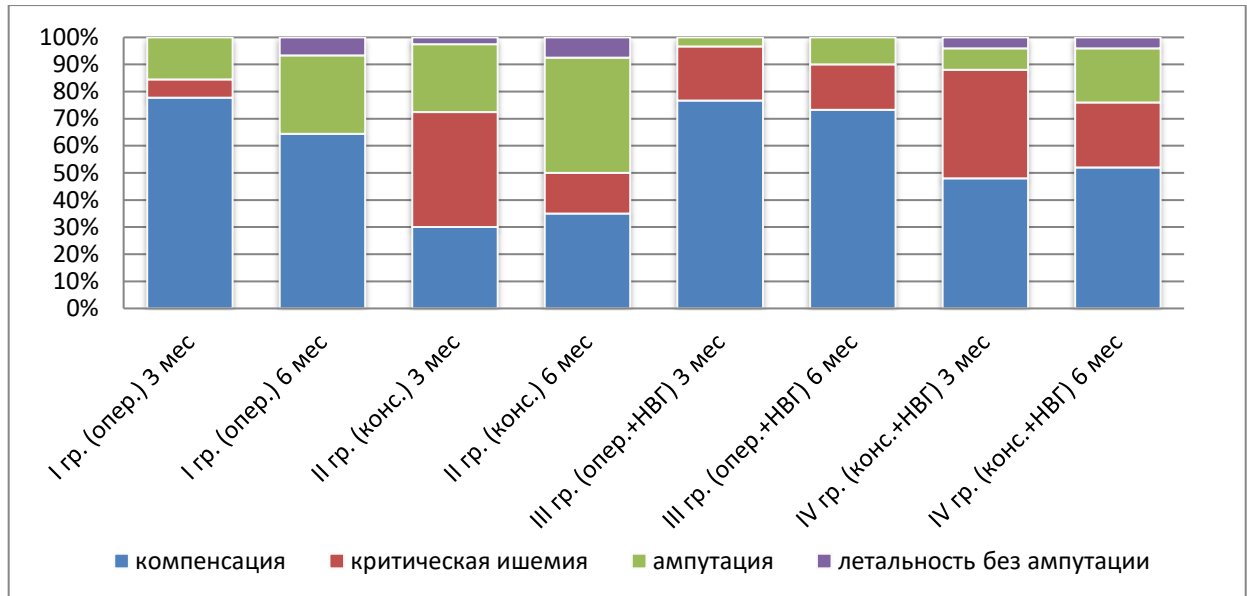


Рис. 20. Динамика изменения степени компенсации кровообращения.

В I группе к концу исследования все пациенты либо имели компенсацию кровообращения за счет перехода заболевания во IIА - IIБ стадию заболевания, либо перенесли ампутацию в случае дальнейшего ухудшения перфузии при окклюзии зоны реконструкции. В III группе 5 случаев критической ишемии (16,7%) связаны с окклюзией зоны вмешательства по причине прогрессирования заболевания или тромботических осложнений (рис. 20).

В группах с консервативным подходом динамика купирования явлений критической ишемии была сопоставима для обеих групп. При этом в IV группе наблюдался примерно равнозначный переход пациентов как во IIБ стадию заболевания, так и в сторону утраты конечности. Во II группе из 11 человек с КИНК на этапе 3 месяцев наблюдения к 6 мес. только 2 перешли во IIБ стадию, а в 9 случаях отмечена отрицательная динамика (ампутация - 7 или декомпенсация с летальным исходом - 2) (рис. 20).

Динамика перехода стадии заболевания за время наблюдения в исследуемых группах.

Стадия заболевания по классификации хронической ишемии является одним из главных показателей, который позволяет сформировать представление о степени перфузии конечности, компенсации кровообращения и определения дальнейшей тактики лечения. Во время исследования была

произведена оценка динамики перехода стадий заболевания в зависимости от результатов лечения внутри каждой группы и при межгрупповом сравнении.

Классификация хронической ишемии нижних конечностей предполагает помимо деления пациентов на числовые группы (I, II, III, IV), еще и подразделение на подгруппы с помощью буквенных обозначений (IIA, IIB). Для возможности проведения статистического анализа между группами по качественным признакам необходимо представить стадии заболевания в виде порядковых номинальных данных, для чего при дальнейшей аналитики в математических формулах IIА стадия заболевания по классификации А.В. Покровского – Фонтейна была принята за значение «1», а для IIБ стадии заболевания было принято значение «2». Третья и четвертая стадии заболевания остались при своих значениях (таблица 17).

Таблица 17

Сводные данные по показателю «стадия заболевания»

Группа	показатель	Срок наблюдения		
		исходно	3 мес.	6 мес.
I (опер.) (n – 45)	Число наблюдений	45	38	28
	Среднее	3,6	2	1,8
	Медиана	4	2	2
III (опер.+НВГ) (n – 30)	Число наблюдений	30	30	27
	Среднее	3,8	2,7	2,6
	Медиана	4	2	2
II (конс.) (n – 40)	Число наблюдений	40	29	20
	Среднее	4	3,2	2,6
	Медиана	4	3	2
IV (конс.+НВГ) (n – 25)	Число наблюдений	25	22	19
	Среднее	4	2,8	2,4
	Медиана	4	2,5	2

*для наглядности данных и возможности определения средних значений IIА стадия заболевания была принята за значение «1», IIБ стадия заболевания за значение «2».

При внутригрупповом сравнении с помощью рангового дисперсного анализа Фридмана и конкорданции Кендалла были выявлены статистически значимые различия между тремя сроками наблюдения (на момент включения и для визитов через 3 месяца $p < 0,001$ для визитов через 6 месяцев наблюдения $p = 0,026$), что позволило перейти к попарным внутригрупповым сравнениям с

использованием критерия Вилкоксона и с поправкой Бонферрони. При данном анализе получена статистически достоверная разница перехода заболевания в более благоприятную стадию внутри групп между моментом включения в исследование и 3 месяцами, включением и 6 месяцами (таблица 18).

Таблица 18

Динамика изменения стадий заболевания за время исследования

Группа	Стадия заболевания	включение	3 мес	6 мес
I (опер.) (n=45)	ПА	0	5 (11,1%)	6 (13,3%)
	ПБ	0	30 (66,7%)	23 (51,1%)
	ПШ	19 (42,2%)	2 (4,4%)	0
	IV	26 (57,8%)	1 (2,2%)	0
	ампутация	0	7 (15,6%)	13 (28,9%)
внутригрупповое значение p		p 0-3 мес. <0,001	p 3-6 мес.=0,18	p 0-6 мес. <0,001
III (опер.+НВГ) (n=30)	ПА	0	2 (6,7%)	2 (6,7%)
	ПБ	0	16 (53,3%)	20 (66,7%)
	ПШ	7 (23,3%)	0	1 (3,3%)
	IV	23 (76,7%)	11 (36,7%)	4 (13,3%)
	ампутация	0	1 (3,3%)	3 (10%)
внутригрупповое значение p		p 0-3 мес. <0,001	p 3-6 мес.=0,093	p 0-6 мес. <0,001
межгрупповое значение p I-III		0,168	0,150	0,968
II (конс.) (n=40)	ПА	0	0	0
	ПБ	0	12 (30%)	14 (35%)
	ПШ	0	4 (10%)	2 (5%)
	IV	40 (100%)	13 (32,5%)	4 (10%)
	ампутация	0	10 (25%)	17 (42,5%)
внутригрупповое значение p		p 0-3 мес.<0,001	p 3-6 мес.=0,043	p 0-6 мес. <0,001
IV (конс.+НВГ) (n=25)	ПА	0	0	0
	ПБ	0	12 (48%)	13 (52%)
	ПШ	0	3 (12%)	4 (16%)
	IV	25 (100%)	7 (28%)	2 (8%)
	ампутация	0	2 (8%)	5 (20%)
внутригрупповое значение p		p 0-3 мес. <0,001	p 3-6 мес.=0,109	p 0-6 мес. <0,001
межгрупповое значение p II-IV		1,000	0,055	0,066

При межгрупповом сравнении с использованием рангового дисперсного анализа Краскела-Уоллиса и медианного теста для показателя «стадия заболевания» были выявлены статистически значимые различия при всех 3х сроках наблюдения для исследуемых групп, в связи с этим были выполнены попарные межгрупповые сравнения с использованием U-критерия Манна Уитни с поправкой Бонферрони (таблица 18).

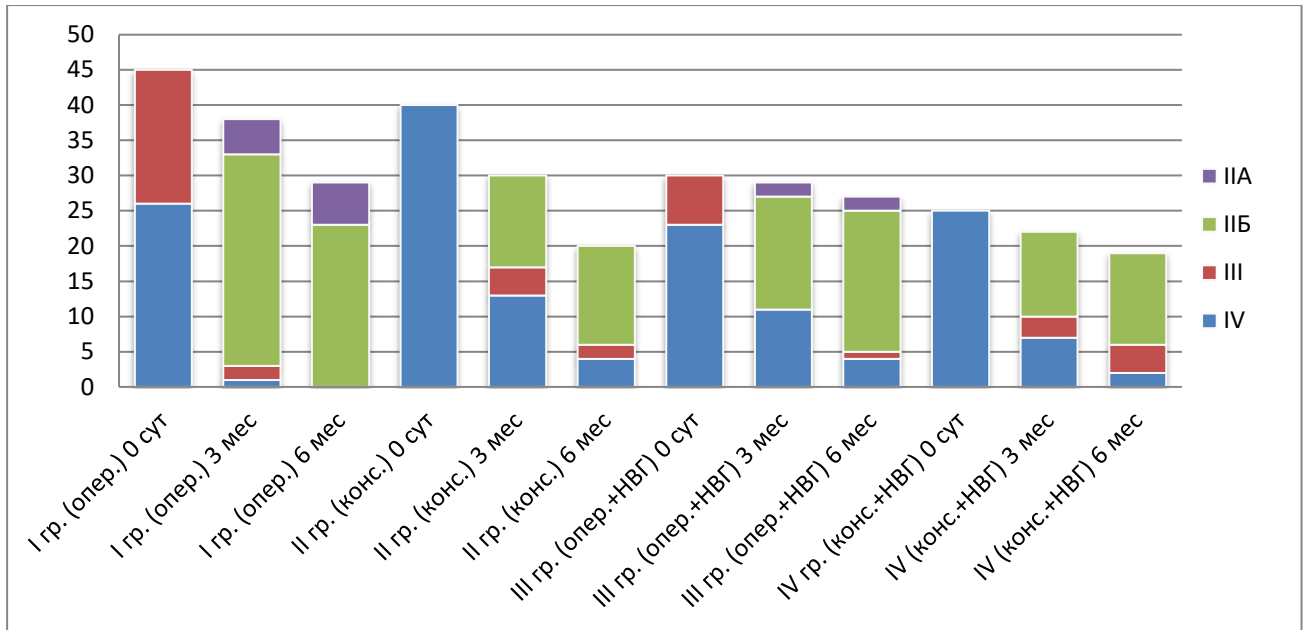


Рис. 21. Динамика изменения стадии заболевания за время исследования

Таким образом, при межгрупповых сравнениях не было выявлено достоверных отличий между группами с выполненным оперативным вмешательством (I и III), дополнительное введение генной конструкции не влияло на частоту послеоперационных осложнений, а при удовлетворительном результате реваскуляризации перфузия конечности достоверно увеличивалась в обеих группах. При межгрупповом анализе пациентов с консервативным подходом (II и IV группы), так же не было выявлено достоверной разницы между группами, хотя показатели межгруппового сравнения для 3 мес. ($p=0,055$) и 6 мес. ($p=0,066$) наблюдения были близки к критерию достоверности (рис. 21).

Проходимость зоны реконструкции и последствия ее окклюзии

Отдельно были проанализированы показатели проходимости зоны реконструкции через 6 мес. наблюдения за больными в группах с оперативным подходом и ее связь со степенью компенсации кровообращения нижних конечностей.

Проходимость зоны оперативного вмешательства составила для пациентов I группы 66,7% (30 человек) и 70% (21 человек) для второй группы.

При сопоставлении данных не было выявлено статистически достоверной разницы между группами с хирургическим подходом по проходимости зоны реконструкции (таблица 19).

Таблица 19

Проподимость зоны реконструкции и исходы при ее окклюзии через 6 мес

Показатель	I группа (опер.) (n=45)	III группа (опер+НВГ) (n=30)	Статистическая значимость между группами I-III (pI-III)
Проподимость зоны реконструкции	30 (66,7%)	21 (70%)	0,482
Исход при окклюзии зоны реконструкции	n - 15	n - 9	
Ампутация	13 (86,7%)	3 (33,3%)	0,013
Гангрена конечности	2 (13,3%)	-	
Регресс к IV стадии	-	4 (44,4%)	
Регресс к III стадии	-	1 (11,1%)	
ИБ стадия	-	1 (11,1%)	

По имеющимся литературным данным терапевтическая индукция ангиогенеза при помощи pVEGF-165 в клинических исследованиях показывает статистически достоверные положительные результаты у пациентов с ПА – III стадией заболевания по А.В. Покровскому - Фонтейну по сравнению с группами контроля начиная с 3-х месяцев наблюдения. Эффект терапевтического ангиогенеза усиливается к 6 мес. наблюдения и сохраняется на протяжении 2 лет [29, 30, 93].

Учитывая вышеизложенные данные, в исследовании была проведена оценка зависимости степени компенсации кровообращения и количества выполненных ампутаций после окклюзии зоны реконструкции для пациентов I и III группы через 6 мес. наблюдения.

В I группе из 15 пациентов, с неработающей зоной реконструкции у 13 была выполнена ампутация конечности – 86,7%. И 2 пациента с клиникой регресса ишемии конечности к IV стадии заболевания отказались от госпитализации, с последующим летальным исходом.

В III группе из 9 пациентов, было выполнено 3 ампутации (33,3%). Из остальных 6 случаев у одного пациента появилась клиника критической ишемии, периферическое сосудистое русло признано нереконструктабельным, проведен курс консервативной терапии с положительной динамикой. Еще в

четырёх случаях отмечен регресс заболевания к IV стадии с появлением некрозов (в 3 случаях проведены курсы консервативной терапии, в одном случае повторное оперативное вмешательство с положительной динамикой со стороны некрозов и клиникой критической ишемии). В третьем случае не смотря на отсутствие работающего кондуита кровообращение в ишемизированной конечности у пациента было компенсировано (IIБ стадия) (рис. 22).

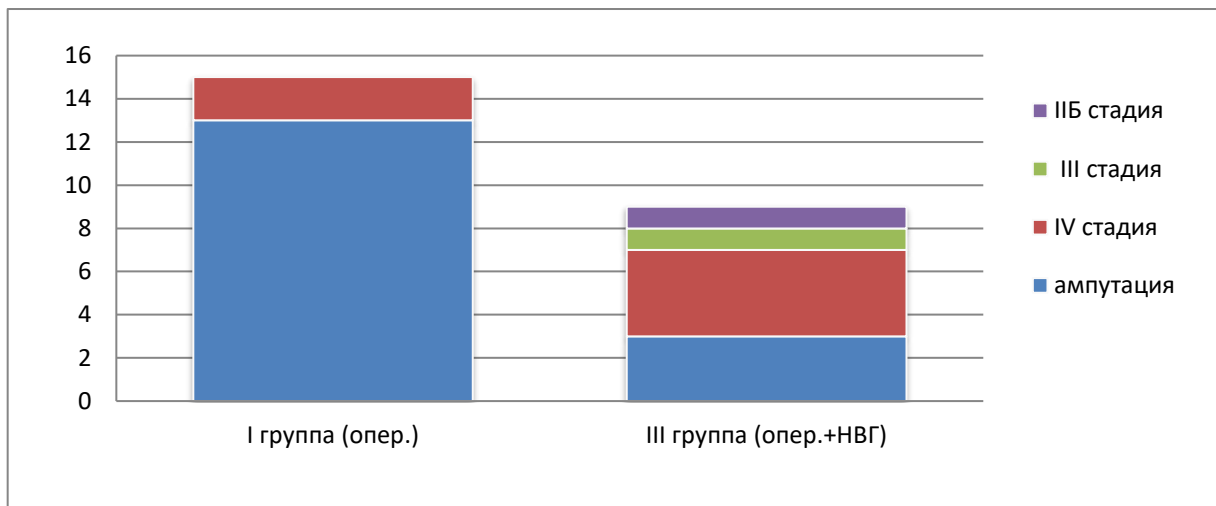


Рис. 22. Исход при окклюзии зоны оперативного вмешательства

При межгрупповом сравнении исходов при непроходимости зоны реконструкции через 6 мес. наблюдения была выявлена статистически достоверная разница между сравниваемыми группами.

Проходимость зоны реконструкции для пациентов с КИНК атеросклеротического генеза с фоновым сахарным диабетом за период наблюдения 6 мес. не является удовлетворительной 66,7% и 70% для I и III группы соответственно. Дополнение к оперативному лечению в виде генной индукции ангиогенеза не влияет на проходимость зоны оперативного вмешательства в течение 6 мес. ($p=0,482$), однако достоверно улучшает прогноз по сохранности конечности и компенсации кровообращения при непроходимости зоны реконструкции: 86,7% ампутаций при окклюзии зоны вмешательства в I группе и 33,3% в III группе ($p=0,013$) (таблица 19).

Лодыжечно-плечевой индекс

При оценке соответствия вида распределения закону нормального распределения для показателя лодыжечно-плечевого индекса во II группе ненормальное распределение признака получено для срока наблюдения в 3 мес. и на момент включения в исследование. Для IV группы получено нормальное распределение для всех сроков наблюдения (таблица 20).

Таблица 20

Соответствие вида распределения признака в каждой группе закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка для показателя ЛПИ

группа	Срок наблюдения		
	исходно	3 мес.	6 мес.
p, II группа	0,011	0,008	0,091
p, IV группа	0,963	0,858	0,357

Изменение показателя лодыжечно-плечевого индекса во время исследования было сопоставимо в обеих группах, прирост среднего значения ЛПИ для II группы составил 0,11 за время исследования (0,36±0,03 на момент включения, 0,4±0,04 через 3 мес. и 0,47± 0,04 через 6 мес. наблюдения). В IV группе прирост показателя составил 0,1 (0,4±0,04 на момент включения, 0,5±0,05 через 3 мес. и 0,5±0,06 через 6 мес.) (таблица 21).

Таблица 21

Динамика ЛПИ сводные данные

Группа	показатель	Срок наблюдения		
		исходно	3 мес.	6 мес.
II группа (конс.) (n=40)	Число наблюдений	40	29	20
	Среднее	0,36	0,40	0,47
	Медиана	0,34	0,35	0,45
	Нижняя - Квартиль	0,24	0,25	0,32
	Верхняя - Квартиль	0,48	0,50	0,55
	Ст.откл	0,21	0,24	0,20
	Станд. ошибки	0,03	0,04	0,04
внутригрупповое значение p		p 0-3 мес.=0,005	p 3-6 мес.=1,000	p 0-6 мес.=0,002
IV группа (конс.+НВГ) (n=25)	Число наблюдений	25	21	19
	Среднее	0,40	0,50	0,50
	Медиана	0,42	0,5	0,5
	Нижняя - Квартиль	0,25	0,38	0,30
	Верхняя - Квартиль	0,57	0,61	0,61
	Ст.откл	0,21	0,22	0,26
	Станд. ошибки	0,04	0,05	0,06

внутригрупповое значение p	p 0-3 мес.=0,002	p 3-6 мес.=1,000	p 0-6 мес.<0,001
межгрупповое значение p II-IV	0,274	0,077	0,569

При внутригрупповом сравнении с помощью рангового дисперсного анализа Фридмана и конкорданции Кендалла были выявлены статистически значимые различия между тремя сроками наблюдения ($p=0,003$), в связи с этим были выполнены попарные внутригрупповые сравнения с использованием критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони для II группы. Учитывая нормальность распределения признака показателя ЛПИ для всех трех сроков наблюдения в IV группе, было проведено внутригрупповое сравнение с использованием t - критерия Стьюдента для зависимых групп с поправкой Бонферрони.

При внутригрупповых сравнениях в обеих группах получен достоверный прирост показателей при сравнении данных на момент включения в исследование с 3 и 6 мес. наблюдения. Между сроками наблюдения в 3 и 6 мес. статистически достоверных отличий не выявлено (таблица 21).

Так же не было выявлено достоверных различий и при межгрупповых сравнениях пациентов исследуемой и контрольной групп по показателю ЛПИ (таблица 21).

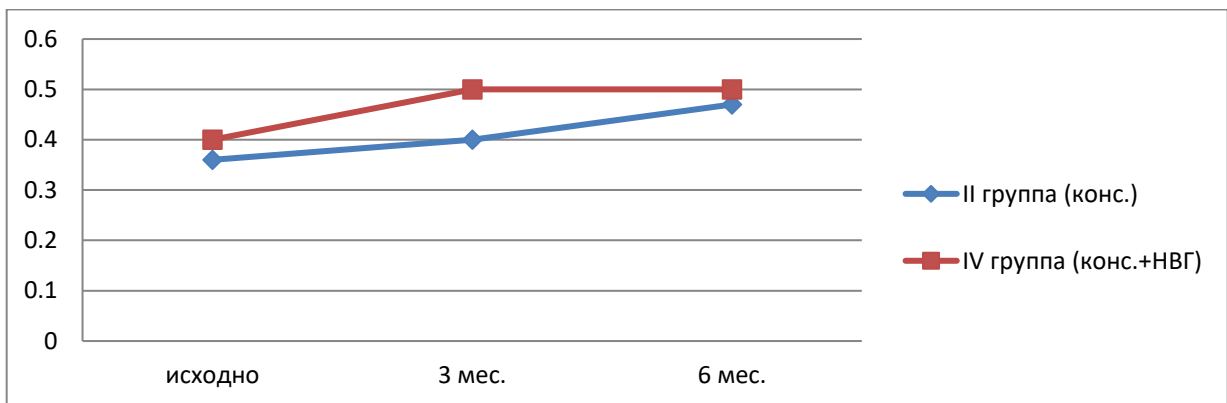


Рис. 23. Динамика показателя ЛПИ

Динамика показателя лодыжечно-плечевого индекса в целом была сопоставима в обеих группах исследования, при этом получены статистически достоверное увеличение ЛПИ при внутригрупповой оценке для сроков наблюдения в 3 и 6 месяцев как во II, так и в IV группе (рис. 23).

Транскутантное напряжение кислорода

При оценке соответствия вида распределения закону нормального распределения для показателя транскутантного напряжения кислорода во II группе ненормальное распределение признака получено для срока наблюдения в 3 мес. и на момент включения в исследование. Для IV группы получено нормальное распределение для всех сроков наблюдения (таблица 22).

Таблица 22

Соответствие вида распределения признака в каждой группе закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка для показателя ТКНК

группа	Срок наблюдения		
	исходно	3 мес.	6 мес.
p, II группа	0,013	0,008	0,010
p, IV группа	0,078	0,611	0,932

Показатель транскутантного напряжения кислорода является одним из основных показателей насыщения тканей кислородом и имеет более 60% достоверности для диагностики состояния кровотока в нижних конечностях.

За время проведения исследования транскутантное напряжение кислорода в обеих группах имело тенденцию к увеличению. Прирост ТКНК для II группы к окончанию исследования составил 17,2%. В начале исследования средний показатель ТКНК составил $33,7 \pm 0,6$ мм.рт.ст., далее наблюдалось его увеличение до $36,8 \pm 0,8$ мм.рт.ст. к 3 мес. наблюдения (прирост 9,2%) и до $39,5 \pm 0,8$ мм.рт.ст. к окончанию исследования (прирост 7,3%) (таблица 23).

В IV группе общий прирост показателя ТКНК составил 32,4%. Его динамика за время исследования выглядела следующим образом: в начале исследования – $33,3 \pm 1,2$ мм.рт.ст; через 3 мес. – $41,2 \pm 1,4$ мм.рт.ст. (23,7% прироста); через 6 мес. $44,1 \pm 1,6$ мм.рт.ст. (7% прироста) (таблица 23).

Таблица 23

Динамика ТКНК (мм.рт.ст.) сводные данные

Группа	показатель	Срок наблюдения		
		исходно	3 мес.	6 мес.
II группа (конс.) (n=40)	Число наблюдений	40	29	20
	Среднее	33,7 мм.рт.ст.	36,8 мм.рт.ст.	39,5 мм.рт.ст.
	Медиана	33,5	37	40

	Нижняя - Квартиль	30,5	28	37
	Верхняя - Квартиль	37	42	43
	Ст.откл	3,6	6,5	3,4
	Станд. ошибки	0,6	1,2	0,8
	внутригрупповое значение p	p 0-3 мес.<0,001	p 3-6 мес.=0,117	p 0-6 мес.<0,001
IV группа (конс.+НВГ) (n=25)	Число наблюдений	25	22	19
	Среднее	33,3 мм.рт.ст.	41,2 мм.рт.ст.	44,1 мм.рт.ст.
	Медиана	36	41	44
	Нижняя - Квартиль	32	36	40
	Верхняя - Квартиль	42	47	50
	Ст.откл	6	6,7	7,1
	Станд. ошибки	1,2	1,4	1,6
	внутригрупповое значение p	p 0-3 мес. <0,001	p 3-6 мес.<0,001	p 0-6 мес.<0,001
	межгрупповое значение p II-IV	0,061	0,023	0,028

При внутригрупповом сравнении с помощью рангового дисперсного анализа Фридмана и конкорданции Кендалла были выявлены статистически значимые различия между тремя сроками наблюдения ($p < 0,001$), в связи с чем были выполнены попарные внутригрупповые сравнения с использованием критерия Вилкоксона с поправкой Бонферрони для II группы. Учитывая нормальность распределения признака в IV группе для показателя ТКНК, было проведено внутригрупповое сравнение с использованием t - критерия Стьюдента для зависимых групп с поправкой Бонферрони.

При внутригрупповых сравнениях были получены статистически достоверные результаты увеличения показателей ТКНК для обеих групп между моментом включения 3 и 6 мес. наблюдения. Так же для группы с добавлением pVEGF-165 достоверный прирост показателя ТКНК был зафиксирован между 3 и 6 мес. наблюдения (таблица 23).

При межгрупповом анализе были выявлены достоверные различия показателя ТКНК на сроках наблюдения в 3 ($p = 0,023$) и 6 мес. ($p = 0,028$) (таблица 23).

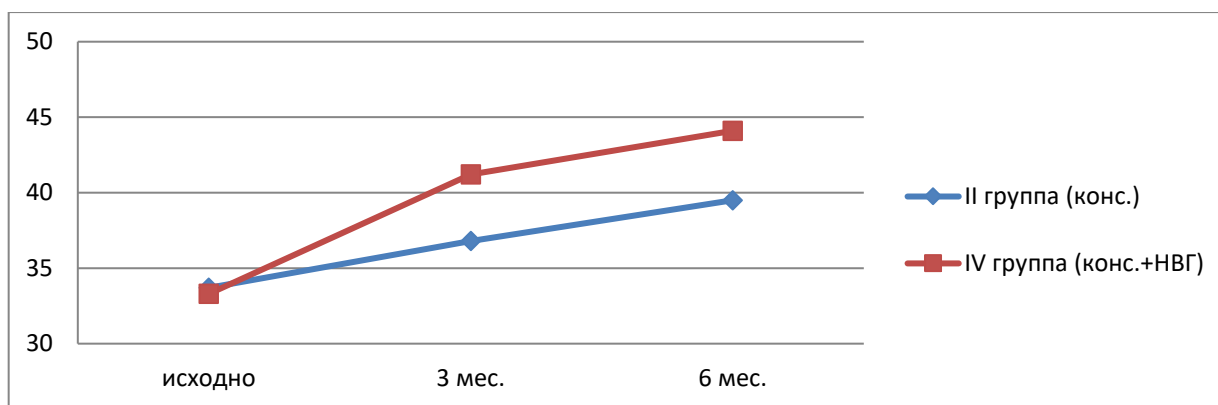


Рис. 24. Динамика показателя ТКНК (мм.рт.ст.)

Изменение показателя транскутантного напряжения кислорода в обеих группах имело положительный характер, однако динамика была различна. Во II группе суммарный прирост показателя к 6 мес. наблюдения составил 17,2%, в то время, как прирост показателя ТКНК для IV группы к окончанию исследования составил 32,4%, при этом статистически достоверная положительная динамика выявлена между всеми тремя визитами пациентов (рис. 24).

Линейная скорость кровотока

При оценке соответствия вида распределения признака закону нормального распределения для показателя «линейная скорость кровотока» во всех наблюдаемых случаях было выявлено ненормальное распределение (таблица 24).

Таблица 24

Соответствие вида распределения признака в каждой группе закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка для показателя ЛСК

группа	Срок наблюдения	
	исходно	6 мес.
р, II группа	0,001	0,218
р, IV группа	0,004	0,001

Линейная скорость кровотока во II группе за время исследования имела тенденцию к незначительному увеличению с $15,1 \pm 0,6$ см/с до $15,7 \pm 0,8$ см/с к окончанию исследования (прирост 4%). В IV группе на момент включения в

исследование средний показатель ЛСК составлял $19,9 \pm 2,2$ см/с, а через 6 мес. $32,9 \pm 9$ см/с (прирост показателя 65,3%) (таблица 25).

Таблица 25

Динамика показателя ЛСК (см/с) сводные данные

Группа	показатель	Срок наблюдения	
		исходно	6 мес.
II группа (конс.) (n=40)	Число наблюдений	40	20
	Среднее	15,1 см/с	15,7 см/с
	Медиана	14	15
	Нижняя - Квартиль	12	12,5
	Верхняя - Квартиль	17,5	19,5
	Ст.откл	4,1	3,8
	Станд. ошибки	0,6	0,8
внутригрупповое значение p			p 0-6 мес.=0,179
IV группа (конс.+НВГ) (n=25)	Число наблюдений	25	19
	Среднее	19,9 см/с	32,9 см/с
	Медиана	18	19,1
	Нижняя - Квартиль	12	12,1
	Верхняя - Квартиль	25	38
	Ст.откл	11,2	39,4
	Станд. ошибки	2,2	9,0
внутригрупповое значение p			p 0-6 мес.=0,003
межгрупповое значение p II-IV		0,072	0,047

Учитывая ненормальность распределения признака для показателя линейной скорости кровотока для II и IV группы, были проведены внутригрупповые сравнения с использованием критерия Вилкоксона.

При внутригрупповом сравнении был получен статистически достоверный прирост скорости кровотока для пациентов с генной индукцией и отсутствие значимой динамики со стороны ЛСК для пациентов группы стандартной консервативной терапии (таблица 25).

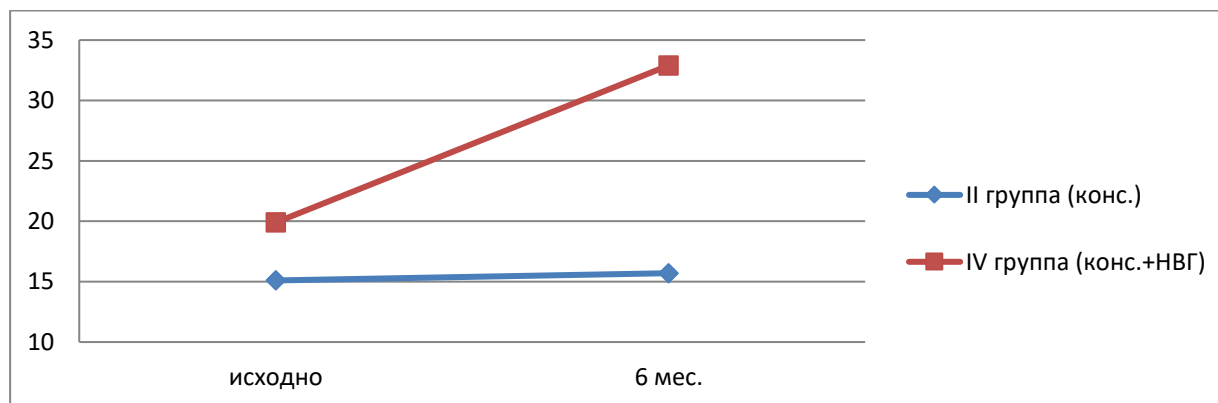


Рис. 25. Динамика показателя ЛСК (см/с)

Показатель линейной скорости кровотока по результатам исследования при межгрупповых сравнениях был достоверно выше в группе с генной индукцией ангиогенеза по результатам 6 мес. наблюдения за пациентами. Прирост показателя ЛСК для IV группы составил 65,3% через 6 мес (во II группе 4%) ($p=0,047$) (рис. 25).

Оценка динамики диабетической нейропатии

Анализ данных Мичиганского опросника

При оценке соответствия вида распределения закону нормального распределения для Мичиганского опросника в группе стандартной консервативной терапии (II) выявлено ненормальное распределение признака. Для группы с дополнительной генной индукцией (IV) получено нормальное распределение для всех сроков наблюдения (таблица 26).

Таблица 26

Соответствие вида распределения признака в каждой группе закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка для Мичиганского опросника

группа	Срок наблюдения	
	исходно	6 мес.
p, II группа	0,001	0,014
p, IV группа	0,454	0,165

Учитывая ненормальность распределения признака во II группе, было выполнено внутригрупповое сравнение с использованием критерия Вилкоксона. Учитывая нормальность распределения признака в IV группе, было проведено внутригрупповое сравнение с использованием t - критерия Стьюдента для зависимых групп.

Диабетическая нейропатия, оцененная с помощью заполнения пациентами специального Мичиганского опросника, в начале и в конце исследования, напрямую коррелировала со степенью компенсации кровообращения. При заживлении некрозов, купировании явлений критической ишемии была отмечена так же положительная динамика и со стороны самостоятельной оценки пациентами снижения интенсивности и частоты появления характерных симптомов (таблица 27).

Таблица 27

Оценка скрининга нейропатии (баллы) сводные данные

Группа	показатель	Срок наблюдения	
		исходно	6 мес.
II группа (конс.) (n=40)	Число наблюдений	40	20
	Среднее	8,65 баллов	7,4 балла
	Станд. ошибки	0,2	0,3
внутригрупповое значение p			p 0-6 мес.<0,001
IV группа (конс.+НВГ) (n=25)	Число наблюдений	25	19
	Среднее	8 баллов	6,3 балла
	Станд. ошибки	0,4	0,3
внутригрупповое значение p			p 0-6 мес.<0,001
межгрупповое значение p II-IV		0,093	0,009

При внутригрупповом сравнении данных Мичиганского опросника, достоверно выявлена положительная динамика в обеих группах через 6 мес. наблюдения ($p < 0,001$). Анализируя результаты межгруппового сравнения через 6 мес. наблюдения, выявлены достоверные различия по снижению клинических симптомов нейропатии в группе с генной индукцией ангиогенеза (IV), по сравнению с контрольной группой (II) ($p = 0,009$) (таблица 27).

Анализ шкалы неврологических симптомов (NSS)

По показателю шкалы NSS ненормальное распределение признака выявлено во II группе на момент начала исследования. Для IV группы распределение признака было нормальным (таблица 28).

Таблица 28

Соответствие вида распределения признака в каждой группе закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка для показателя шкала NSS

группа	Срок наблюдения	
	исходно	6 мес.
p, II группа	0,001	0,150
p, IV группа	>0,050 (0,05004)	0,221

Учитывая ненормальность распределения признака, во II группе было выполнено внутригрупповое сравнение с использованием критерия Вилкоксона, распределения признака в IV группе было нормальным, поэтому, внутригрупповое сравнение проводилось с использованием t - критерия Стьюдента для зависимых групп.

При оценке изменения динамики неврологических симптомов по шкале NSS выявлено снижение клинических проявлений нейропатии у пациентов, с удовлетворительными результатами лечения и улучшением перфузии ишемизированной конечности (таблица 29).

Таблица 29

Динамика неврологических симптомов (баллы) сводные данные

Группа	показатель	Срок наблюдения	
		исходно	6 мес.
II группа (конс.) (n=40)	Число наблюдений	40	20
	Среднее	6,4 балла	6 баллов
	Станд. ошибки	0,1	0,3
внутригрупповое значение p			p 0-6 мес.=0,359
IV группа (конс.+НВГ) (n=25)	Число наблюдений	25	19
	Среднее	5,7 баллов	4,9 балла
	Станд. ошибки	0,3	0,3
внутригрупповое значение p			p 0-6 мес.=0,004
межгрупповое значение p II-IV		0,105	0,044

При анализе показателя шкалы NSS достоверно лучшие результаты купирования нейропатии получены в группе с дополнительной генной индукцией ангиогенеза (IV), как при внутригрупповом ($p=0,004$), так и при межгрупповом сравнении ($p=0,044$) (таблица 29).

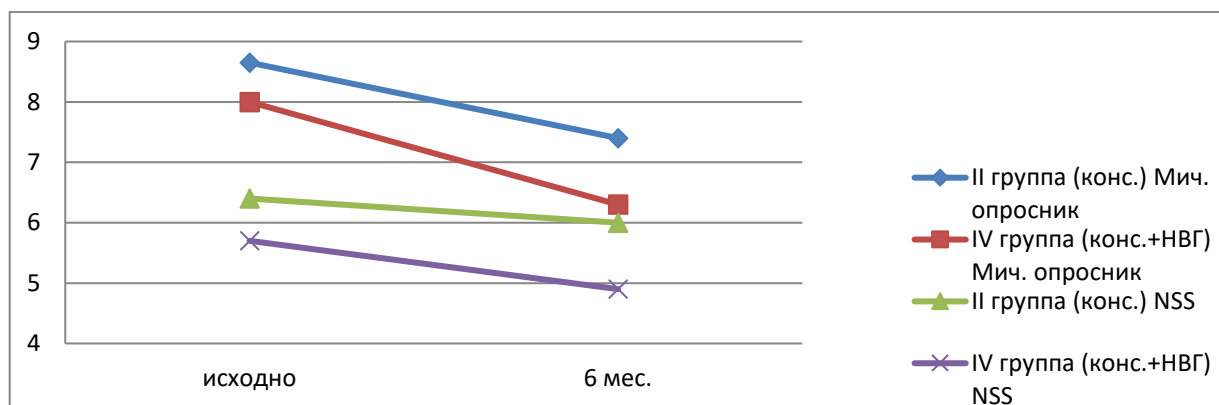


Рис. 26. Динамика течения нейропатии по данным Мичиганского опросника и шкалы NSS (баллы)

На момент включения в исследование пациенты двух группы были сопоставимы по клиническим проявлениям нейропатии, через 6 месяцев наблюдения выявлено достоверное различие между группами по данному признаку. В IV группе наблюдалась клинически и статистически лучшая

динамика купирования нейропатии, как при заполнении пациентами Мичиганского опросника для скрининга нейропатии, так и при оценке шкалы неврологических симптомов (NSS), что напрямую связано с лучшими показателями компенсации кровообращения при дополнительной генной индукции ангиогенеза (IV группа) по сравнению со стандартной консервативной терапией (II группа) (рис. 26).

3.3 Обсуждение полученных результатов и сопоставление их с данными других исследований

В доклинических исследованиях получены сведения, что препарат «Неоваскулген®» имеет низкую токсичность, не обладает местно-раздражающим действием на кожу и аллергизирующими свойствами. Не влияет на функциональную активность, морфологическую структуру внутренних органов экспериментальных животных, так же не было выявлено эмбриотоксических, мутагенных и канцерогенных свойств [100].

В предыдущих исследованиях была показана способность препарата стимулировать пролиферацию клеток эндотелия человека, наравне с рекомбинантным фактором роста эндотелия сосудов, а также влиять на рост кровеносных сосудов мышцы [28].

При сопоставлении результатов экспериментальной части исследования с данными аналогичных работы можно сформулировать следующие основные тенденции: генная стимуляция ангиогенеза позволяет улучшить процессы репарации за счет улучшения основных гистогенитических процессов в ране, а именно: росте эпителиальной ткани, увеличения количества и зрелости кровеносных сосудов, зрелости соединительной ткани.

В рамках оценки результатов клинического исследования основной упор был сделан на следующие сравнения:

1. Эффективность лечения между пациентами контрольной группы, которым проводилось оперативное лечение (I группа) с пациентами комбинированного подхода (III группы), которым дополнительно проводилась генная индукция ангиогенеза.

Проблемы хирургического лечения связаны, прежде всего, с высокой частотой ранних тромботических (сдвиг параметров гемостаза в сторону гиперкоагуляции, поражение дистальных отделов со снижением качества потей оттока), и поздних не тромботических осложнений (прогрессирование заболевания, дисфункция эндотелия и гиперплазия неоинтимы). Вследствие данных причин пациенты часто подвергаются повторным безрезультатным

вмешательствам, приводящим в итоге к ампутации конечности. Учитывая системность атеросклеротического поражения, пациенты данных групп часто имеют сопутствующий атеросклероз коронарных артерий и клинику стенокардии, либо перенесенный в анамнезе инфаркт миокарда. В связи с вышеизложенными данными в разы повышается риск летального исхода при многократных оперативных вмешательствах.

2. Эффективность лечения между пациентами контрольной группы стандартной консервативной терапии (II группа) с пациентами комплексного подхода (IV группа), которым консервативная терапия дополнялась генной индукцией ангиогенеза.

Для консервативной терапии основной проблемой является отсутствие лекарственных препаратов, способных в кратчайшие сроки значительно увеличить объем крови, притекающей к нижним конечностям. Пациенты с КИНК в отличие, от пациентов со ПА – ПБ стадией заболевания не имеют времени для хронизации процесса и планомерного увеличения перфузии в течение длительного периода времени. Появление клиники КИНК говорит о декомпенсации кровотока, накоплении токсичных и недоокисленных метаболитов, продуктов анаэробного распада, кислородного голодания, гибели клеток. При отсутствии улучшения перфузии конечности, заболевание прогрессирует, приводя в итоге к необходимости выполнения ампутации, а системная интоксикация увеличивает риски летального исхода.

3. Сравнение всех 4 подходов к лечению производилось для подбора оптимального алгоритма ведения пациента с КИНК и СД.

Основные исследования препарата на основе pVEGF-165 были направлены на улучшение перфузии конечности у пациентов с субкомпенсацией кровообращения (ПА-III стадия заболевания), при этом подробно производилась оценка инструментальных показателей перфузии, а не возможность утраты конечности, в то время, как первостепенной задачей лечения пациентов с КИНК атеросклеротического генеза с фоновым сахарным

диабетом является сохранение ишемизированной конечности и жизни пациента в ближайшем и отдаленном периоде.

При анализе результатов нашего исследования наилучшие показатели сохранности конечности получены для пациентов, которым проводилась реваскуляризация, при этом в группе с дополнительной генной индукцией доля ампутаций была ниже (I группа 37,8%, III группа 16,7%) через 1 год наблюдения. Неблагоприятный прогноз за тот же период в отношении сохранения конечности определен для групп, которым проводилась консервативная терапия, при этом в исследуемой группе процент ампутаций был меньше практически в 2 раза (IV группа 36% ампутаций, во II группе 60%).

Показатели летальности были напрямую связаны с развитием ранних или поздних тромботических осложнений, потребовавших повторного вмешательства для прооперированных пациентов (17,7% в I группе; 13,3% в III) и с прогрессированием основного заболевания и развитием декомпенсации кровообращения для пациентов в консервативных группах (25% во II группе; 16% в IV). Всего за 1 год наблюдения было зарегистрировано 26 летальных исходов (18,6%), из них в 13 случаях предварительно выполнялась ампутация, а в 8 случаях пациенты имели трофические нарушения на нижних конечностях. Только 5 летальных исходов не были связаны с основным заболеванием.

Исследования безопасности и клинической эффективности препарата на основе rVEGF-165, в составе комплексной консервативной терапии для пациентов с ПА-III стадией заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна проходили одновременно в трёх клинических центрах: отделение сосудистой хирургии ГБУ РО «Областной клинический кардиологический диспансер»; отделение сосудистой хирургии, ГБУЗ ЯО «Областная клиническая больница»; ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского.

Основные данные, которые были получены при оценке результатов лечения пациентов с ХИНК, были сопоставимы между центрами по первичным и вторичным критериям эффективности, в связи, с чем логичнее обратить

внимание именно на суммарный анализ данных всех пациентов, находившихся в исследовании.

Обобщенные результаты наблюдения за пациентами в течение 6 месяцев из трех клинических центров показали достоверные улучшения в группах с дополнительной генной индукцией, по сравнению с контролем по улучшению локального статуса (жалобы на онемение, похолодание и атрофию мышц конечности). Из инструментальных данных стоит отметить, что по показателю ДБХ для клинической группы был получен прирост на 149,47 м, в то время, как в контрольной группе он снизился на 1,42 м. Прирост ТКНК в клинической группе составил 12,4% против 2,1% в группе контроля. ЛПИ в исследуемой группе прирос на 0,057, в контрольной группе уменьшился на 0,02. ЛСК прирост на 8,24 см/с для исследуемой группы, 1,3см/с для контроля. Так же для 80% пациентов, которым выполнялись контрольные ангиограммы, был установлен рост сосудов на макроскопическом уровне за счет коллатералей, или, возможно, ранее не функционировавших сосудов. Успешные результаты лечения, оцененные по совокупности первичных и вторичных критериев эффективности терапии, в исследуемой группе составили 94%, а в контрольной группе 37,5%. Так же были получены положительные результаты в изменении стадии ишемии и характеристики качества жизни.[93]. Отличительной особенностью был достоверный прирост инструментальный показателей при внутригрупповых сравнениях в динамике наблюдения для исследуемой группы после 3 месяцев наблюдения, в отличие от контроля.

При последующем мультицентровом анализе данных по наблюдению за пациентами в течение 1 года были получены следующие результаты. Относительно ДБХ через 1 год наблюдения оставалась тенденция к росту, прирост за 1 год суммарно составил 167,2%, достигнув средней цифры 226,3м. При углубленном анализе наибольший клинический ответ по ДБХ зафиксирован у пациентов с 3 ст. заболевания (547,5%), а также у больных с многоэтажным поражением сосудов (269,1%). Показатель ТКНК к 1 году наблюдения давал прирост в 20,4% в исследуемой группе, в то время, как в

группе контроля не было достигнуто достоверных различий. По показателю ЛПИ не было достигнуто статистической разницы, как при сравнении внутри группы, так и при межгрупповых сравнениях. ЛСК в обеих группах за второе полугодие наблюдения имело тенденцию к снижению, но при этом для исследуемой группы данный показатель через 1 год оставался выше исходного. При оценке ангиографического исследования усиление сосудистого рисунка на голени отмечено в 75% случаев [30].

За время отсроченного наблюдения в течение 3 лет, так же основным показателем для оценки эффективности лечения являлась ДБХ, которая увеличилась на 290% с 99,5м до 390м в исследуемой группе и сократилась на 27% в группе контроля (среднее значение – 87м). При этом стоит отметить, что в исследуемой группе наилучшая динамика прироста ДБХ была зафиксирована в промежутке времени до 1 года, далее увеличение было незначительным, в то время как в контрольной группе ДБХ постепенно снижалась на всем промежутке наблюдения. При внутригрупповом анализе наиболее значимые изменения отмечены для пациентов с III стадией заболевания. Среднее увеличение ТКНК составило 10 мм. рт. ст. (прирост 14%) для клинической группы, при этом динамика отмечена лишь до конца 1 года наблюдения, с последующей стабилизацией в течение 2 лет. В контрольной группе показатель ТКНК постепенно снижался на 4 мм. рт. ст. и в итоге снижение достигло 18%. При оценке ЛПИ не было выявлено достоверной динамики и различий между группами [27].

Эффективность генной индукции ангиогенеза прослежена и через 5 лет после включения пациентов в исследование на базе отделения сосудистой хирургии ГБУЗ ЯО «Областная клиническая больница». При котором были выявлены хорошие показатели эффективности лечения в отдаленном периоде для пациентов со IIБ стадией заболевания (91% стабилизации стадии заболевания в течение 5 лет; 95% сохранности конечности) и III стадией (регресс степени ишемии в 78% случаев, 22% ампутаций при 75% выживаемости больных). Стоит отметить, что все пациенты, включенные в

исследование в течение 5 лет, либо перешли на стадию ПХ, либо перенесли ампутацию [89].

Помимо основных инструментальных показателей, приведенных выше, на базе ФГБНУ РНЦХ имени академика Б.В. Петровского так же был проведен анализ улучшения микроциркуляции и функционального резерва кровообращения путем измерения мышечной перфузии с помощью радиоизотопной сцинтиграфией и времени восстановления исходных параметров кровотока при нагрузочном тесте. Прирост мышечной перфузии у пациентов с КИНК для исследуемой группы составил 105%, а для контрольной 20% ($p < 0,001$). Время восстановления исходных параметров кровотока так же было достоверно ниже для исследуемой группы ($p < 0,05$) [43].

Использование генной индукции в лечение пациентов с КИНК проводилось на базе Ростовского государственного медицинского университета. По данным Кательницкого И.И. с соавторами при использовании препарата, кодирующего VEGF-165, помимо клинического улучшения получены инструментальные доказательства эффективности препарата. Так при исходно сниженной концентрации радиофармпрепарата при ангиосцинтиграфии в капиллярах голени ($392 \pm 12,6$ импульса) уже через 1 месяц в месте введения число импульсов увеличилось до $965 \pm 31,4$, а через 3 месяца данный показатель составил $5466 \pm 87,8$. Стоит обратить внимание, что на контралатеральной конечности данный индекс значительно не менялся. Прирост количества функционирующих капилляров на голени составил $142,9 \pm 6,2\%$ через 3 месяца. Таким образом, исходно сниженные показатели активности на пораженной конечности, уже через 3 месяца превышали условно здоровую, как на уровне голени, так и в сосудистом русле бедер. Так же улучшение перфузии было получено с помощью лазерной доплеровской флоуметрии, по данным которой прирост кровотока составил от 87,5% до 250% в зависимости от исходной степени ишемии и уровня поражения сосудистого русла [44, 102].

На базе отделения хирургии сосудов ФГБНУ Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского проводилась оценка влияния генной индукции в составе комплексной терапии и в сочетании с хирургическими методами лечения.

По данным академика Гавриленко А.В., при дополнении прямой реваскуляризации конечности генной индукцией результаты лечения значительно превышают группу контроля по всем анализируемым в исследовании параметрам (ДБХ, максимально проходимая дистанция, динамика ЛПИ, ЛСК по тиббиальным артериям, прирост мышечной перфузии, время восстановления исходных параметров кровотока). Данные показатели отражают не только клиническую эффективность лечения, но и функциональный резерв микроциркуляции. Анализ результатов по стандарту оценки хирургического лечения по шкале Rutherford так же показал лучшие результаты для группы с комбинированным подходом. При анализе результатов исходов заболевания в отношении проходимости шунтов и вероятности отрицательного исхода (ампутация, некротические изменения, летальный исход), несмотря на статистически недостоверную разницу, в абсолютных цифрах лучший прогноз имели пациенты исследуемой группы, особенно при КИНК [31].

При сравнении пациентов в группе с дополнением непрямой реваскуляризации генной индукцией и группой контроля были получены сопоставимые данные. Отдельно стоит отметить, что в данном исследовании статистически значимые различия по инструментальным данным были получены после 3 месяцев наблюдения, и при внутригрупповой оценке динамики основных показателей. Так же лучшие результаты получены при оценке результатов хирургического лечения по шкале Rutherford и для частоты отрицательных исходов [31].

В целом по исследованию, показано, что генная стимуляция ангиогенеза практически не изменяет ближайшие результаты хирургического лечения, однако значительно повышает ее эффективность в отдаленном периоде (после 3

месяцев наблюдения) и соответственно улучшает отдаленные результаты лечения [31].

Червяков Ю.В. с соавторами так же провел сравнение результатов лечения пациентов со IIБ – III стадией заболевания с использованием терапевтического ангиогенеза и при выполнении операций непрямо́й реваскуляризации конечности (ПСЭ, РОТ) на протяжении 3 лет наблюдения. В данном исследовании был получен достоверно лучший результат по приросту ДБХ и ЛСК у пациентов с КИНК в группе генной терапии в течении всего исследования, в то время, как прирост ДБХ и ЛСК после РОТ сохранялся в течение 2 лет, после ПСЭ – 1 год. При этом сохранность конечности на протяжении всего периода наблюдения составила: после генной индукции 78%, после РОТ – 54%, после ПСЭ – 47% [88].

При сопоставлении результатов проведенной работы с данными других клинических исследований можно сформулировать основные тенденции.

Хирургическая реваскуляризация конечности является обязательным элементом при наличии у пациента КИНК при возможности ее выполнения, по причине объективно худших результатов консервативного лечения.

Дополнение оперативного лечения генной индукцией не влияет на ближайшие результаты вмешательства, однако при анализе отдаленных результатов группы с комбинированным подходом показывают лучшие результаты, как по инструментальным показателям, так и по сохранности конечности и летальности после перенесенной ампутации, что объясняется временем, необходимым для формирования новых сосудистых петель и взросления новых капилляров. Генная индукция не влияет на проходимость зоны реконструкции, но позволяет достоверно снизить процент ампутации после ее окклюзии в отдаленном периоде, за счет формирования коллатерального кровообращения, достаточного для сохранения конечности. Подтверждение данного факта является достоверная положительная динамика показателей ЛСК, ТКНК, ДБХ в интервале между 3 и 6 месяцами наблюдения, в отличие от контрольных групп, в которых улучшение кровообращения

подтверждается после проведения реваскуляризации в срок до 3 месяцев, но отсутствует в отсроченном периоде.

При сравнении консервативных методов лечения обращает на себя внимание, что в группах с генной индукцией, тенденция к улучшению инструментальных показателей имеется на протяжении всего исследования, а по данным других авторов сохраняется далее в течение 1 года со стабилизацией к 3 годам наблюдения. В то время как в контрольных группах после 3 месяцев наблюдения данные показатели либо остаются на месте, либо имеют тенденцию к регрессу. Наиболее достоверные различия между группами, коррелирующие с клиникой получены в отношении ТКНК и ЛСК, в то время как показатель ЛПИ во многих исследованиях не имел достоверных отличий, как для групп с оперативным вмешательством, так и для групп, которым проводилась консервативная терапия.

Клинический пример №1

Пациент С., 1951 г.р. поступил в ГБУ РО ОККД 20.03.2016 с диагнозом: облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, бедренно-подколенная окклюзия с обеих сторон, IV стадия заболевания справа. Сахарный диабет II типа, уровень гликемии корригировался препаратами длинного инсулина (утром 10 ед.) и короткого инсулина (4 ед. утром, 6 ед. в обед 4 ед. вечером) инсулина по поводу сахарного диабета II типа. При поступлении пациент предъявлял жалобы на боли в икроножных мышцах при ходьбе, которые начинаются практически с первого шага, боль в области первого пальца правой стопы, снижению чувствительности в правой стопе. Со слов больного боли в нижних конечностях при нагрузке беспокоят в течении длительного времени (5-7 лет), однако ухудшение стал замечать в течении последних 6 месяцев, а за 1 месяц до момента госпитализации обратил внимания на появление некроза на большом пальце правой стопы (рис. 27А).

Объективно на обеих нижних конечностях пульсация на бедренных артериях удовлетворительная, на подколенных артериях не определяется. Имеет место незначительная термоасимметрия правой нижней конечности,

умеренное снижение поверхностной чувствительности, глубокая чувствительность сохранена, активные и пассивные движения в полном объеме. При глубокой пальпации мышцы голени умеренно болезненны справа. Местно: на дистальной фаланге 1 пальца правой стопы определяется наличие сухого некроза размером 20x21,5 мм (430 мм²) с незначительным перифокальным воспалением (рис. 27А).

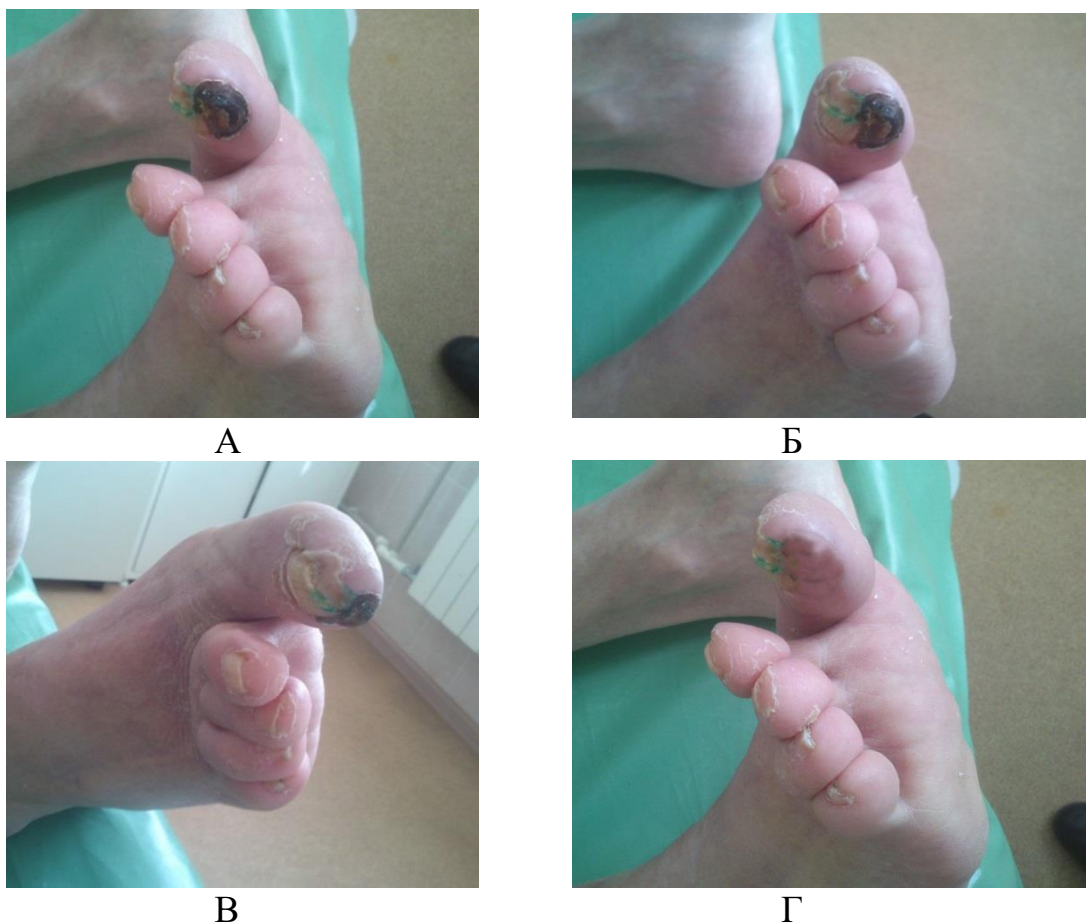


Рис. 27. Стопа пациента при поступлении (А), через 3 мес. наблюдения (Б, В), через 6 мес. наблюдения (Г)

При инструментальном обследовании: линейная скорость кровотока справа 46 см/с; ЛПИ (справа/слева) 0,1/0,6; ТКНК справа 24 мм.рт.ст., при ангиографии артерий нижних конечностей справа поверхностная бедренная артерия (ПБА) окклюзирована от устья, постокклюзионные отделы заполняются по коллатералям начиная с границы средней и нижней трети. В подколенной артерии (ПкА) выше уровня щели коленного сустава локальная атеросклеротическая бляшка (АСБ), стенозирующая просвет на 70-80%, передняя большеберцовая артерия (ПББА) проходима в верхней трети. Задняя

большеберцовая артерия (ЗББА) и межберцовая артерия стенозированы в устье до 70%, далее проходимы до н/3 голени с диффузным стенозом до 50% (рис. 28 (А-Г)), что по классификации путей оттока по R.V. Rutherford составило 5 баллов.

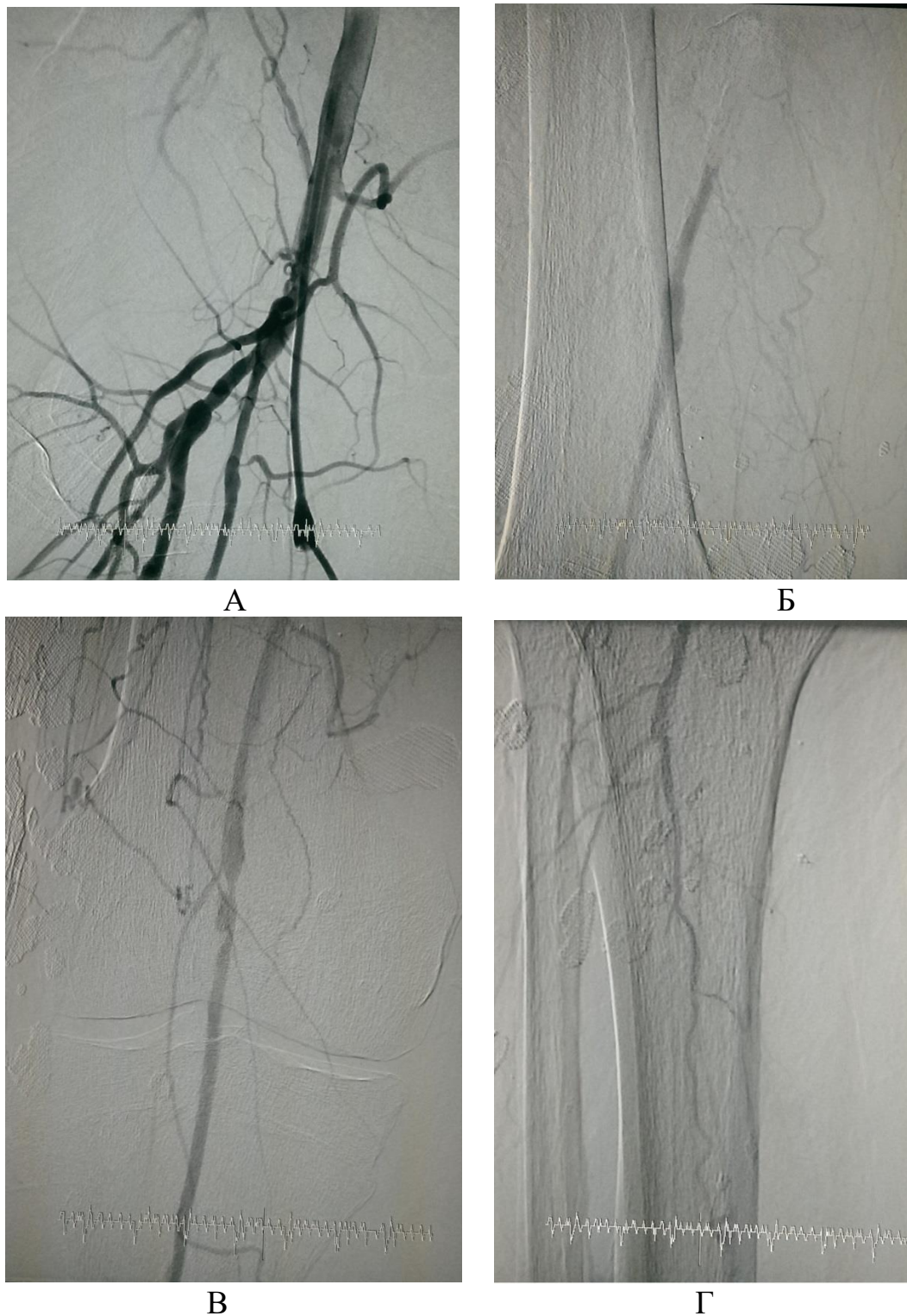


Рис. 28. Ангиограммы артерий правой нижней конечности: А – бедренный сегмент, Б – бедренно-подколенный сегмент, В – подколенный сегмент, Г – подколенно-берцовый сегмент

После предоперационной подготовки 26.03.2016 пациенту выполнено гибридное оперативное вмешательство – рентгенэндоваскулярная дилатация подколенной и берцовых артерий, бедренно-подколенное протезирование выше щели коленного сустава синтетическим протезом справа. Во время госпитализации в послеоперационном периоде пациент получал стандартную инфузионную (рефортан 6% - 250,0 №7; актовегин 10% - 250,0 №10), антикоагулянтную, антиагрегантную, гиполипидемическую и антибиотикотерапию. Послеоперационное течение без осложнений, удовлетворительная пульсация на подколенной артерий справа, ЛПИ-0,5/0,65. На 7-е сутки после операции выполнено введение геннотерапевтической конструкции pVEGF-165, в дозе 1.2 мг, в мышцы правой голени. Заживление послеоперационных ран первичным натяжением. Пациент выписан с положительной динамикой, с рекомендациями по дальнейшему амбулаторному лечению.

Через 2 недели пациенту проведено повторное введение конструкции pVEGF-165, в дозе 1.2 мг, в мышцы правой голени.

На контрольном визите через 3 мес. после лечения отмечается положительная динамика: пульс на подколенной артерий справа сохраняется, ЛПИ (справа/слева)-0,75/0,6; ТКНК справа - 44 мм.рт.ст., ДБХ до 100 метров, некроз незначительно уменьшился, имеются признаки краевой эпителизации (площадь некроза 360 мм²) (рис. 27 (Б, В)).

При контрольном визите через 6 мес. от начала лечения пациент отметил, что в течение последних двух недель заметил уменьшение проходимого без боли расстояние, чувство похолодания правой нижней конечности. При объективном осмотре пульсация справа на подколенной артерии отсутствует, ЛПИ 0,45/0,54, ТКНК справа 40 мм.рт.ст., дистанция безболевого ходьбы 40 метров. Некрозов нет. При УЗДС общая (ОБА) и глубокая бедренная артерия (ГБА) проходимы, без гемодинамически значимых стенозов. Шунт окклюзирован от устья (заполнен тромботическими массами) на всем протяжении. В проксимальном отделе подколенной артерии концентрическая

АСБ, пролонгированная, стенозирующий эффект 70%. Дистальный отдел окклюзирован. Далее кровоток идет в a.suralis. ПББА окклюзирована, по ЗББА кровоток не определяется. ЛСК по ПББА в нижней трети 9 см/с. (рис. 27Г).

Учитывая данные дополнительных методов исследования и компенсацию кровообращения, от оперативного лечения решено воздержаться. Проведен курс консервативной терапии с положительным эффектом. Пациент выписан с компенсацией кровообращения на амбулаторное лечение.

При последующих сроках наблюдения (1,5 года) пациент регулярно проходит курсы консервативной терапии (1 раз в 6 мес.), боли покоя не беспокоят, ДБХ до 100 м.

Таким образом, не смотря на окклюзию кондуита в отдаленном послеоперационном периоде, у пациента сформировалась коллатеральное кровообращение в объеме, достаточном для компенсации кровообращения и хронизации заболевания во ПБ стадию.

Клинический пример №2

Пациент М. 1974 г.р. поступил в отделение сосудистой хирургии ГБУ РО ОКЖД 28.08.2016 с диагнозом облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, бедренно-подколенная окклюзия с обеих сторон, IV стадия заболевания слева. Состояние после рентгенэндоваскулярной дилатации (РЭД) наружной подвздошной артерии (НПА) слева. Сахарный диабет II типа. При поступлении пациент предъявлял жалобы на боль в области некрозов на левой стопе в покое, боли в икроножных мышцах слева при физической нагрузке. Анамнез заболевания длительный, впервые ограничения физической нагрузки возникли более 3 лет назад, в 2013 году выполнялась РЭД НПА слева по причине ее критического стеноза. Так же у пациента длительный анамнез наличия сахарного диабета II типа (более 10 лет), по поводу чему пациент получает препараты метформина в дозировке 850 мг 2 раза в день. Появление некрозов на левой стопе отмечает в течение последних двух месяцев (рис. 29).

Объективно пульс на бедренных артериях определяется с обеих сторон, слева ослабленный. Имеется снижение поверхностной чувствительности и

термоасимметрия левой стопы. Местно на левой стопе имеются 3 некроза, наиболее крупный и глубокий из которых на дистальной фаланге 1 пальца площадью 750 мм^2 , второй некроз на тыле стопы 400 мм^2 , так же имеется некроз в области медиальной лодыжки 300 мм^2 (рис. 29 (А, Б)).



А

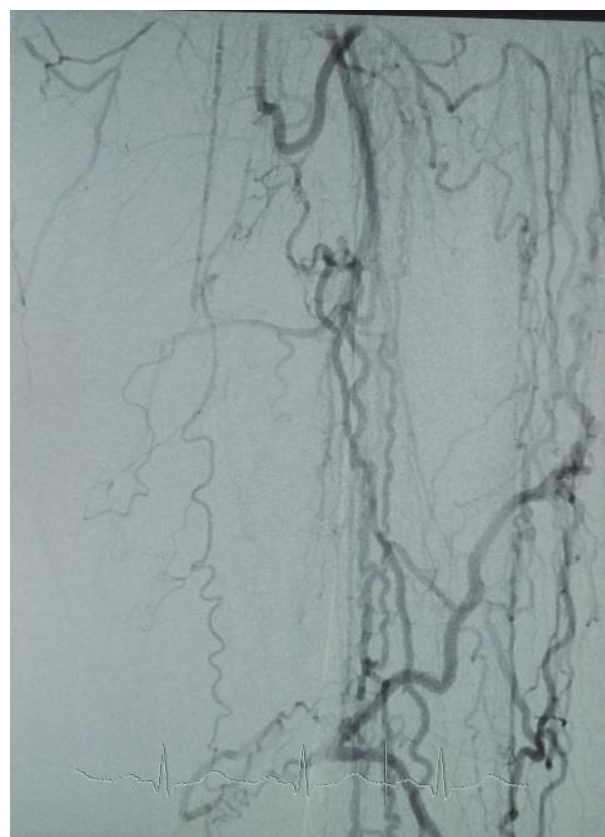
Б

Рис. 29 (А, Б). Стопа пациента на момент включения в исследование

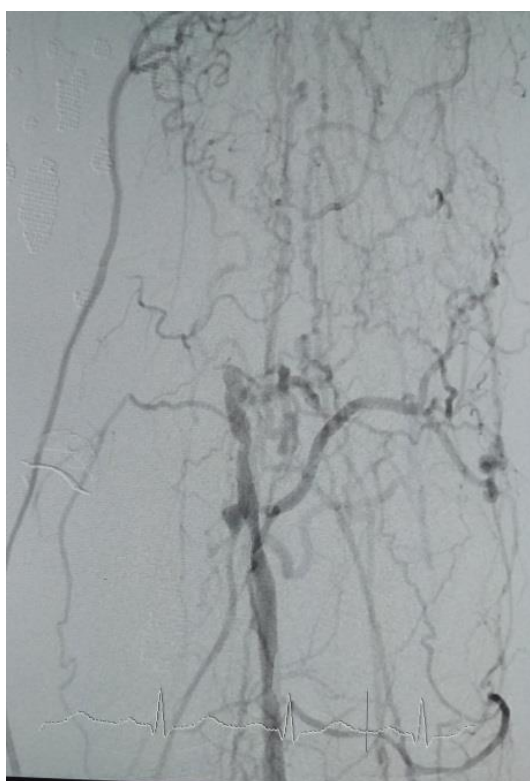
При инструментальном обследовании ТКНК – 32 мм.рт.ст., ЛСК по ПБА – 14см/с, ЛПИ – 0,6/0,15. При ангиографии артерий нижних конечностей: слева подвздошный сегмент проходим. В проксимальной части ОБА визуализируется АСБ, стенозирующая просвет на 90%. ПБА окклюзирована от устья на всем протяжении, ГБА заполняется дистальнее устья по коллатералям на всем протяжении, что по классификации путей оттока по R.V. Rutherford составило 7 баллов. ПкА заполняется выше щели коленного сустава, диффузно стенозирована до 70%, ЗБА окклюзирована, ПББА заполняется в верхней трети, диффузно стенозирована до 60%, при этом выявлено большее количество коллатеральных сосудов на левой голени (рис. 30 (А-Д)).



А



Б



В



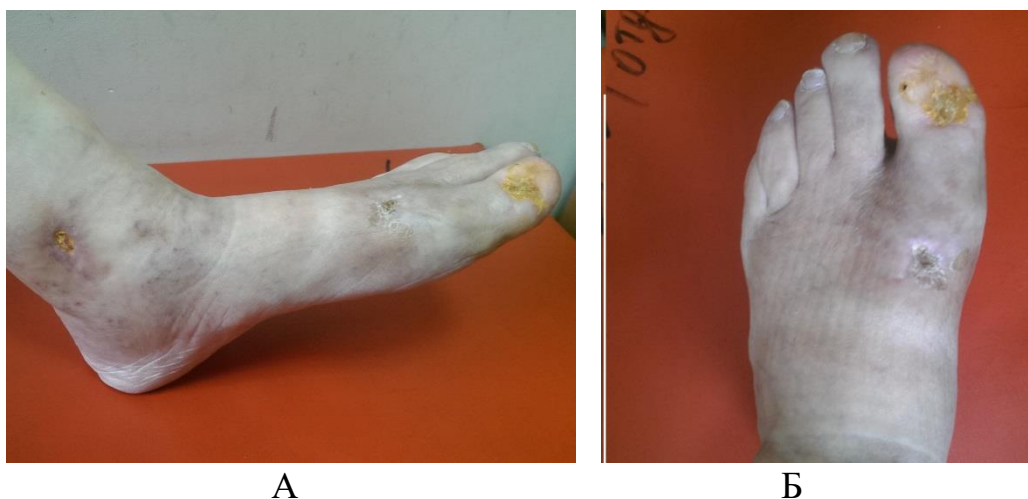
Г

Рис. 30. Ангиограммы артерий левой нижней конечности: А – подвздошно-бедренный сегмент, Б – бедренный сегмент, В- бедренно – подколенный сегмент, Г – подколенно-берцовый сегмент

После проведения предоперационной подготовки пациенту 05.09.2016 выполнена аутовенозная пластика ОБА с тромбэндартерэктомией из общей бедренной артерии слева. В послеоперационном периоде пациент получал стандартную инфузионную (сулодексид 600ЛЕ №10; актовегин 10% - 250,0 №10), антикоагулянтную, антиагрегантную, гиполипидемическую и антибиотикотерапию.

В послеоперационном периоде удовлетворительная пульсация на ОБА слева, ЛПИ-0,69/0,38. На 7-е сутки после операции выполнено первое введение геннотерапевтического препарата rVEGF-165, в дозе 1.2 мг, в мышцы левой голени. Заживление послеоперационных ран первичным натяжением. Пациент выписан с положительной динамикой, с рекомендациями по дальнейшему амбулаторному лечению. Через 2 недели произведена повторная инъекция препарата для терапевтического ангиогенеза.

На контрольном визите через 3 мес. сохраняется положительная динамика, пациент отмечает субъективное улучшение состояния, пульс на ОБА слева удовлетворительный. Площадь некрозов уменьшилась (500 мм² на 1 пальце, по 200 мм² на тыле стопы и у лодыжки). При инструментальном обследовании ЛПИ – 0,73/0,53; ТКНК слева - 47 мм.рт.ст. (рис. 31 (А, Б)).



А
Б
Рис. 31 (А, Б). Стопа пациента через 3 мес. наблюдения

В дальнейшем пациент приходил на осмотр через 4,5 мес., где так же была отмечена положительная динамика со стороны уменьшения некрозов, субъективных ощущений пациента.

При визите через 6 мес. наблюдения больной предъявил жалобы на отек левой стопы и увеличение размеров некрозов на левой стопе. При объективном осмотре ослабленный пульс слева определяется над уровнем Пупартовой связки, ниже пульсация отсутствует, некроз 550 мм² на 1 пальце, 250 мм² у медиальной лодыжки (рис. 32 (А, Б)).



Рис. 32 (А, Б). Стопа пациента через 6 мес. наблюдения при повторном поступлении в стационар

Пациент был госпитализирован. При инструментальном обследовании ЛПИ - 0,6/0,26; ЛСК слева по ПББА - 12 см/с; ТКНК слева - 50 мм.рт.ст. При аортоартериографии выявлен стеноз в НПА слева, суживающий просвет более чем на 90%, Зона аутовенозной пластики проходима, стеноз до 40%, ГБА проходима (рис. 33 А).



Рис. 33. Ангиография артерий нижних конечностей: А – стеноз НПА слева при повторном поступлении пациента, Б – контрольный снимок после стентирования НПА слева

Пациент был госпитализирован в стационар, где после предоперационной подготовки 17.02.2017 выполнено стентирование ОПА слева с удовлетворительным клиническим и ангиографическим эффектом (полное восстановление просвета баз остаточных стенозов) (рис. 33 Б).



Рис. 34 (А, Б). Стопа пациента через 8 мес. наблюдения

При последующем наблюдении за пациентом через 8 мес. кровообращение в левой нижней конечности компенсировано, площадь некрозов прогрессивно уменьшается, имеется тенденция к эпителизации (рис. 34 (А, Б)).

Таким образом, у данного пациента прогрессирование заболевания на уровне подвздошного сегмента (рестеноз в зоне РЭД НПА от 2013 г.) привело к

снижению уровня перфузии конечности (жалобы на боль при ходьбе, незначительное увеличение площади некрозов), при этом ухудшение местного статуса происходило в течение нескольких недель и было не выраженным, что могло быть обусловлено большим количеством коллатеральных сосудов, видимых на макроскопическом уровне, по сравнению с картиной на момент включения пациента в исследование (рис. 35 (А, Б)).

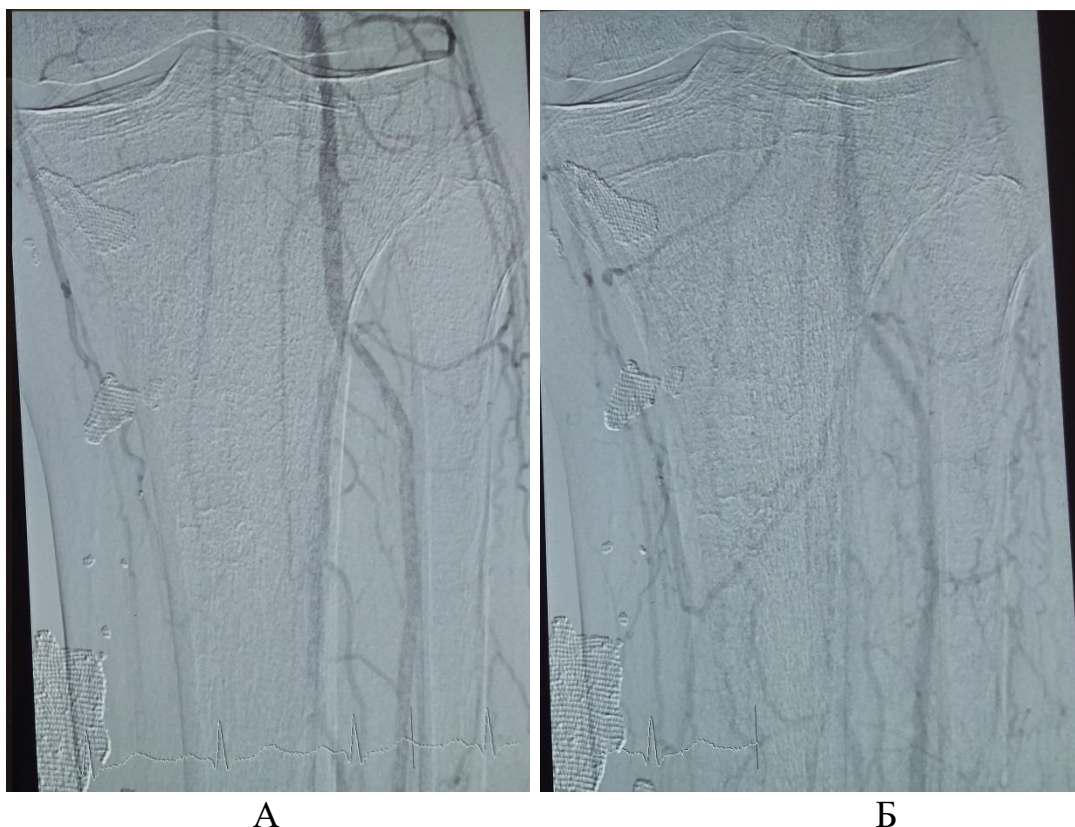


Рис. 35. Ангиография артерий подколенно-берцового сегмента пациента: А – исходно, Б – при повторном поступлении через 6 мес

Клинический случай №3

Пациент А., 69 лет, поступил в ГБУ РО ОККД 28.09.2015г. с диагнозом: облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, бедренно-подколенная окклюзия с обеих сторон, IV стадия заболевания слева. Сахарный диабет II типа, по поводу которого пациент принимает таблетированный гипогликемический препарат (состоящий из производного сульфонилмочевины II поколения и бигуанида).

При поступлении больной предъявлял жалобы на боли в нижних конечностях при незначительной физической нагрузке, боли покоя и наличие

участков некрозов в 3 и 4 межпальцевых промежутках на левой нижней конечности. Из анамнеза впервые боли в нижних конечностях при ходьбе появились несколько лет назад, некрозы в межпальцевых промежутках начали беспокоить в течение последнего месяца.

Объективно пульс на ОБА с обеих сторон удовлетворительный, симметричный. Мышцы голени безболезненны при пальпации, с обеих сторон снижена поверхностная чувствительность, движения в полном объеме.

Местно на левой нижней конечности имеются участки мацерации кожных покровов с некрозами в области 3 и 4 межпальцевых промежутков с переходом на тыл стопы, размером 100 мм² и 400 мм² соответственно (рис. 36 (А, Б)).



Рис. 36 (А, Б). Внешний вид стопы больного при поступлении

При инструментальном обследовании: по данным ангиографии артерий нижних конечностей слева ОБА, ГБА проходимы. ПБА кальцинирована, диффузно атеросклеротически изменена на всем протяжении, в средней трети протяженный стеноз до 90%. Подколенная артерия окклюзирована на уровне щели коленного сустава. По ПББА в верхней трети и средней трети кровотоков не определяется, в нижней трети - коллатеральный. По ЗББА кровотоков не определяется, по малоберцовой артерии (МБА) кровотоков определяется только в дистальной части голени, ПББА заполняется через МБА, что по классификации

путей оттока по R.V. Rutherford составило 10 баллов. ЛСК слева – 20,8 см/с. УЗДГ: ЛПИ 0,5 /0,5; ТКНК слева - 35 мм рт ст. (рис. 37 (А-В)).

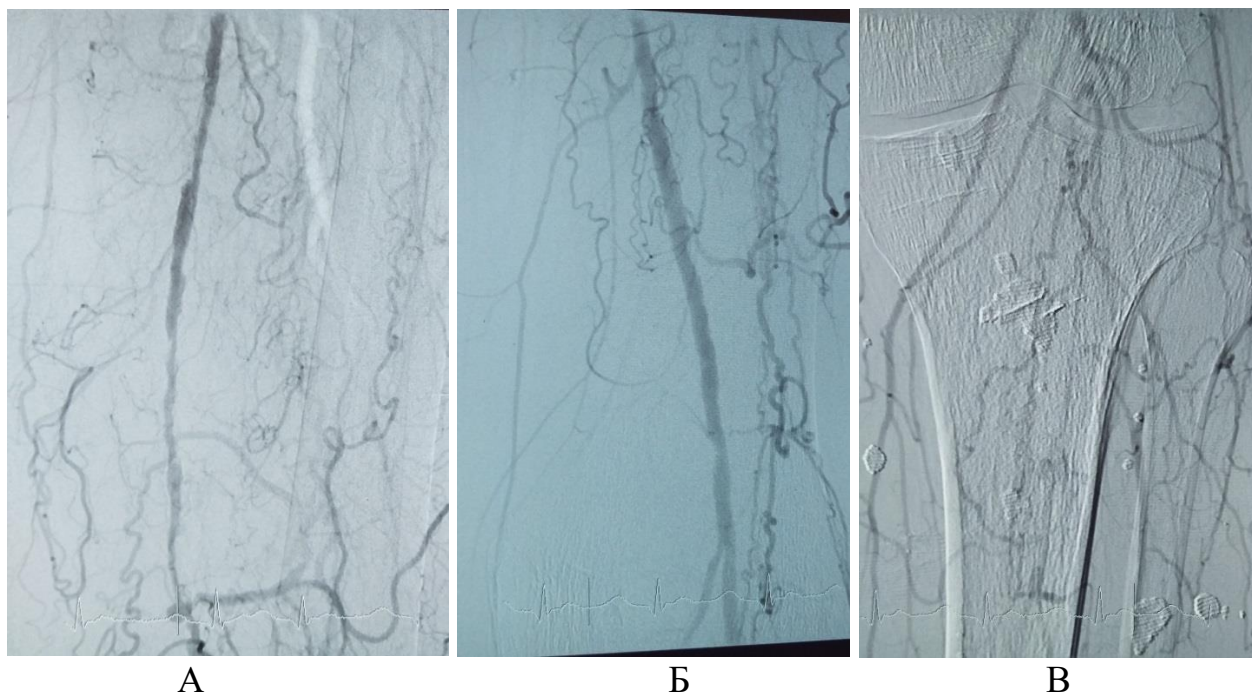


Рис. 37 (А-В). Ангиография артерий левой нижней конечности: а – бедренный сегмент, б – бедренно–подколенный сегмент, в – подколенный сегмент

Учитывая данные дополнительных методов обследования периферическое сосудистое русло признано нереконструктабельным и в связи с высоким ампуционным риском оперативного вмешательства было решено провести курс консервативной терапии, включающий в себя: парентеральное введение простагландина Е1 в дозировке 200 мкг в сутки, сулодексида в дозировке 600 ЛЕ в сутки, октолипена 600 мг в сутки, антиагрегантную, гиполипидемическую терапию, местное лечение участков некрозов. Так же проведен курс антибиотикотерапии по причине инфицирования зоны некроза.

Курс консервативной терапии был дополнен инъекциями препарата для терапевтического ангиогенеза в дозировке 2,4 мг. Первое введение препарата проводилось в конце прохождения курса консервативной терапии, повторное введение препарата происходило через 2 недели.

Во время госпитализации отмечена положительная динамика со стороны общего самочувствия пациента, снижение болей в покое и ночью. После проведения курса антибиотикотерапии и местного лечения некрозы очистились

от нагноения. Пациент был выписан в удовлетворительном состоянии под наблюдение сосудистого хирурга.

Через 3 мес. наблюдения кожные покровы левой стопы обычной окраски, пульсация на ОБА с обеих сторон удовлетворительная. Некроз в 3 межпальцевом промежутке полностью эпителизировался. Участок некроза в 4 межпальцевом промежутке уменьшился до 50 мм²., боли в покое и ночью не беспокоят, ТКНК слева - 40 мм.рт.ст., ЛПИ 0,42/0,38 (рис. 38 (А, Б)).



А

Б

Рис. 38 (А, Б). Внешний вид стопы больного через 3 мес. наблюдения

Через 6 мес., состояние удовлетворительное, пульсация на ОБА с обеих сторон, мышцы голени безболезненны, ночные боли и боли в покое не беспокоят. Некрозы эпителизировались. ДБХ – 30 метров, ТКНК слева – 40 мм.рт.ст., ЛПИ 0,37/0,37, ЛСК слева 17,5 см/с. Пациент отмечает субъективное улучшение состояния и качества жизни (рис. 39 (А, Б)).



Рис. 39 (А, Б). Внешний вид стопы больного через 6 мес. наблюдения

При последующем наблюдении (2 года) пациент регулярно проходит курсы консервативной терапии (1 раз в 6 мес.), боли покоя не беспокоят, ДБХ – 50-70 м. У пациента удалось достигнуть стабильной хронизации процесса во IIБ стадии заболевания на протяжении длительного времени без применения оперативного лечения.

Клинический пример №4

Пациентка Г. 1947 г.р. поступила отделение сосудистой хирургии ГБУ РО ОККД 25.09.2016 с диагнозом облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, бедренно-подколенная окклюзия с обеих сторон, IV стадия заболевания справа. Сахарный диабет II типа.

При поступлении в клинику пациентка предъявляла жалобы на боль в правой нижней конечности при ходьбе, наличие некроза на большом пальце правой стопы. Из анамнеза: клиника перемежающейся хромоты беспокоит в течение 5 лет, некроз появился за 2 месяца до момента обращения к сосудистому хирургу. У пациентки имеется сахарный диабет II типа, коррекция уровня гликемии достигается с помощью препаратов инсулина (12 ед. длительного действия утром, короткого действия 6 ед. утром, 10 ед. в обед, 8 ед. вечером).

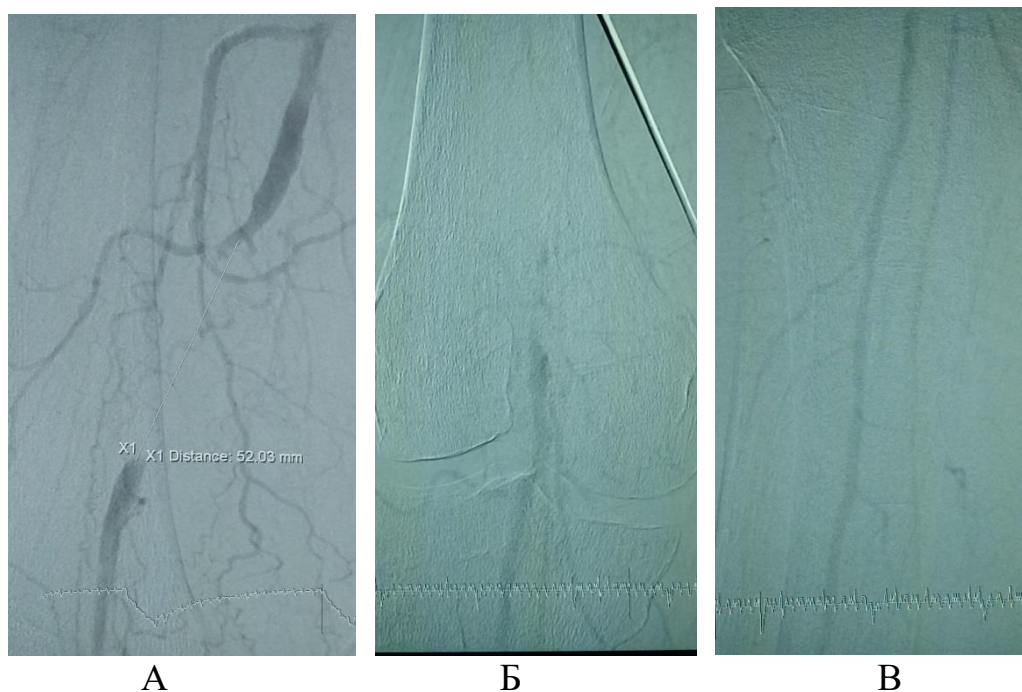
Объективно пульсация на бедренных артериях с обеих сторон удовлетворительная, мышцы голени безболезненны при пальпации,

незначительная термоасимметрия правой нижней конечности. Местно: на большом пальце правой стопы имеется сухой некроз площадью 400 мм², без явлений перифокального воспаления (рис. 40 (А, Б)).



Рис. 40 (А, Б). Стопа пациентки на момент включения в исследование

При инструментальном исследовании: ЛПИ – 0,26/0,66; ЛСК – 13см/с; ТКНК – 34 мм.рт.ст. По данным ангиографии справа подвздошный сегмент проходим, ОБА, ГБА с неровными контурами, ПБА в нижней трети имеет короткую окклюзию (5-6 см) с последующим коллатеральным заполнением ПкА, которая диффузно стенозирована до 70% на всем протяжении, ПББА и ЗББА заполняются в верхней и средней трети голени, что по классификации путей оттока по R.V. Rutherford составило 4 балла (рис. 41 (А-В)).



А Б В
Рис. 41 (А-В). Ангиография правой нижней конечности пациента

Учитывая ангиографическую картину поражения сосудистого русла после предоперационной подготовки 04.10.2016 – пациентке была проведена РЭД ПБА и ПкА справа с удовлетворительным ангиографическим и клиническим эффектом. В послеоперационном периоде пациентке назначалась стандартная консервативная терапия и проводилась геннотерапевтическая индукция ангиогенеза по тому же принципу, что был описан выше. При выписке пульс на ПкА, ЛПИ 0,84/0,76. (рис. 42 (А-В)).

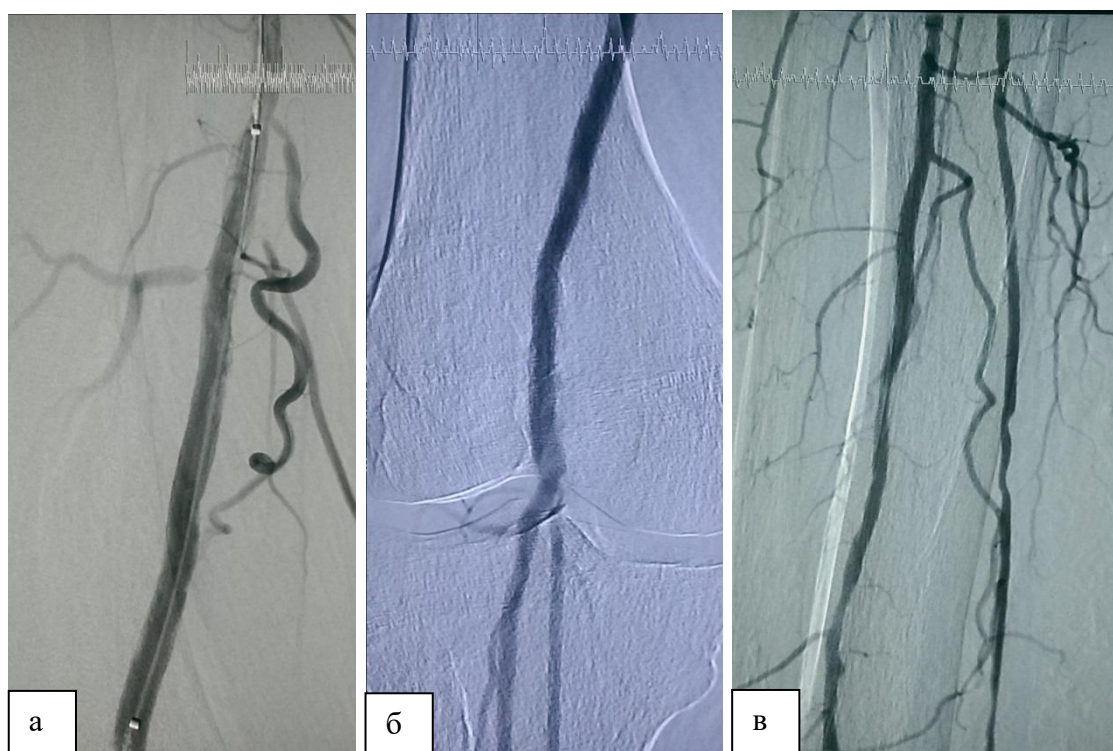


Рис. 42 (А-В). Контрольные ангиограммы пациентки после РЭД ПБА, ПКА справа

При контрольном визите через 3 мес. исследования пациента отмечает субъективное улучшение самочувствия, Во время осмотра отмечена хорошая динамика со стороны заживления некроза (200 мм^2), пульс на ПКА справа сохраняется, мышцы голени безболезненны, ЛПИ – $0,93/0,6$, ТКНК справа – 55 мм.рт.ст. (рис. 43 (А, Б)).



Рис. 43 (А, Б). Стопа пациентки через 3 мес. наблюдения

Через 6 мес. наблюдения пульс на ПкА справа удовлетворительный. Некроз эпителизировался, пациентка не испытывает каких либо ограничений со стороны правой нижней конечности. ЛПИ 1,0/0,68, ТКНК справа – 59 мм.рт.ст., ДБХ – 150 метров. По данным УЗДС зона РЭД ПБА, ПкА справа проходима, без значимых рестенозов, ЛСК справа – 32 см/с. (рис. 44 (А, Б)).



А

Б

Рис. 44 (А, Б). Стопа пациентки через 6 мес. наблюдения

Таким образом, за полгода наблюдения у пациентки произошел полный регресс проявлений клиники критической ишемии, компенсация кровообращения, заживление некрозов. Достигнутый после лечения эффект сохраняется и в отдаленном периоде (1 год) наблюдения.

3.2.10. Алгоритм лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета

На основании полученных в ходе исследования данных был составлен алгоритм ведения пациентов с подтвержденным диагнозом критической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза при наличии фонового сахарного диабета (рис. 45).

Согласно данному алгоритму при поступлении пациента в стационар для точной верификации диагноза, определения топики поражения сосудистого русла и дальнейшей тактики лечения необходимо провести обследование в следующем объеме:

- общеклинические лабораторные методы исследования (ОАК, БХ, ОАМ, коагулограмма, гликемическая кривая)
- инструментальные методы исследования (ангиография периферического сосудистого русла, УЗДС с определением ЛСК, ЛПИ, ТКНК, ДБХ)

Кроме того, всем пациентам показано определение тяжести течения периферической диабетической нейропатии с помощью Мичиганского опросника и шкалы NSS.

Решение вопроса о возможности проведения реваскуляризации конечности должно совместно проводиться сосудистым и рентгенэндоваскулярным хирургом после оценки данных ангиографии с дополнением данного исследования УЗДС периферических артерий. Для определения состояния путей оттока необходимо использовать классификацию R.V. Rutherford, при этом пригодным для реконструкции артериальным руслом считать от 1 до 7 баллов включительно.

При наличии удовлетворительного периферического русла (≤ 7 баллов), выбор метода реваскуляризации (открытая операция или эндоваскулярное вмешательство) должен осуществляться в соответствии с классификацией TASC-II в зависимости от уровня и характера поражения артериального русла.

В послеоперационном периоде, при отсутствии ранних тромботических осложнений, показана генная стимуляция индукции ангиогенеза на 7 – 10 сутки после вмешательства, как при открытом, так и при эндоваскулярном подходе.

Пациентам, не имеющим пригодного для реконструкции периферического русла, с неглубокими и необширными некрозами на нижних конечностях (0-1 стадия по Вагнеру, S некроза менее 300 мм²) при медленном прогрессировании ишемии, показано проведение комбинированной консервативной терапии согласно Национальным рекомендациям с дополнительной геннотерапевтической индукцией ангиогенеза. Курс комбинированной консервативной терапии включает в себя: антиагрегантные (ацетилсалициловая кислота 100 мг в сутки), гиполипидемические препараты (статины), пентоксифиллин (1200 мг в сутки), сулодексид (600 ЛЕ в сутки), депротенинизированный гемодериват (2000 мг в сутки), 6% гидроксипропилированный крахмала (250 мл в сутки); простагландины E1 или I2 (50-200 мкг в сутки); тиоктовая (α -липоевой) кислота (600 мг в сутки), неоваскулген (2,4 мг).

Всем пациентам, с трофическими нарушениями, при инфицировании раны, необходимо выполнять посев на микрофлору из раны с определением чувствительности к антибиотикам с последующим подбором антибактериальной терапии, и местным лечением участков некроза (ежедневные перевязки).

Независимо от выбранной тактики лечения всем пациентам показано наблюдение эндокринолога с подбором оптимальной гипогликемической терапии для достижения целевых значений гликозилированного гемоглобина.

При отсутствии возможности прямой реваскуляризации, обширных и глубоких некротических поражениях (2-5 стадия по Вагнеру, S некроза более 3 см²), а так же быстром проградентном ухудшении состояния перфузии конечности показана первичная ампутация конечности с целью сохранения жизни больного.

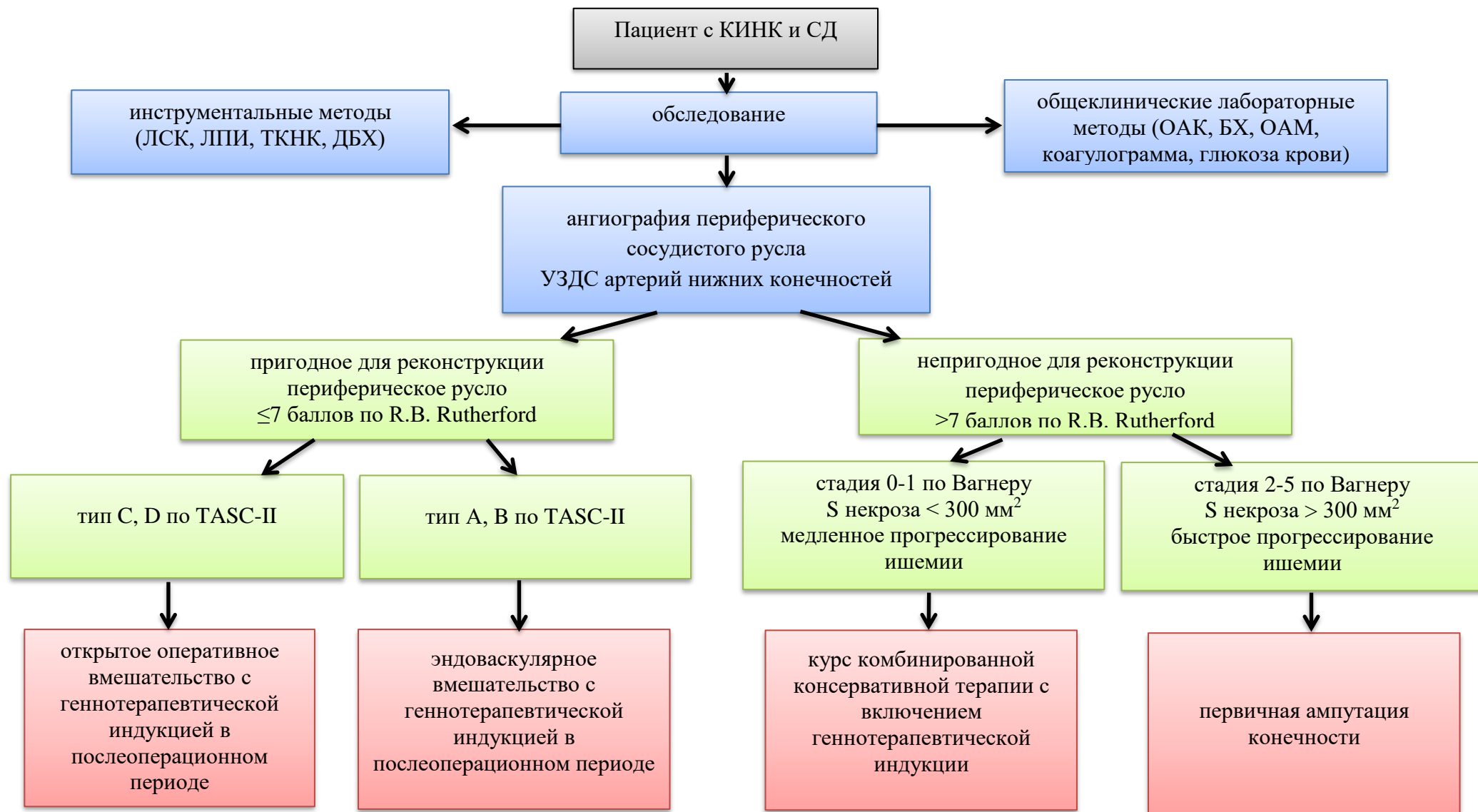


Рис. 45. Алгоритм ведения пациентов с КИНК и СД

Заключение

Атеросклеротическое поражение артерий нижних конечностей является основным заболеванием, приводящим к значительному ограничению физической активности, утрате трудоспособности. Планомерно прогрессирующий характер поражения сосудов, ухудшение перфузии тканей нижних конечностей при отсутствии адекватного лечения в итоге приводят к декомпенсации кровообращения и необходимости выполнения ампутации нижних конечностей по жизненным показаниям. Таким образом актуальной проблемой лечения ишемии нижних конечностей является и со стороны инвалидизации населения и экономических затрат на реабилитацию после перенесенной ампутации.

Сахарный диабет является самостоятельным распространенным заболеванием, имеющим тенденцию к неуклонному росту среди населения земного шара. Одно из проявлений СД - диабетическое поражение сосудов (макро и микроангиопатия), приводящее к развитию осложнений сосудистого характера у пациентов с СД.

Таким образом, ОААНК и СД являются двумя самостоятельными заболеваниями, суммарно оказывающими негативное влияние на состояние периферического кровотока. СД повышает риск развития заболеваний артерий нижних конечностей в 2-4 раза, имеется у 12-20% пациентов с сосудистой патологией, а так же служит фактором, ухудшающим отдаленные результаты артериальных реконструкций при ишемии конечности [22]. Кроме того, диабетическая нейропатия, часто маскирует клиническую картину нарушения кровообращения, в связи с чем, пациенты с фоновым СД приходят на первичный осмотр сосудистого хирурга при запущенных стадиях основного заболевания.

При отсутствии ранней диагностики поражения сосудистой системы и адекватного лечения у пациентов возникают боли не только при физической нагрузке, но и в покое, а так же возможно присоединение трофических нарушений, что говорит о декомпенсации кровотока в конечности – появления

состояния КИНК, которое требует решения вопроса об оперативном вмешательстве.

Хирургическая реваскуляризация позволяет уменьшить, либо купировать клинические проявления ишемии и должна проводиться у всех пациентов, имеющих соответствующую клиническую картину, показания и отсутствие противопоказаний к операции. Без проведения реваскуляризации пациенты с КИНК в большинстве случаев обречены на выполнение высоких ампутаций [60]. Существует множество различных вариантов реваскуляризации и методов лечения, которые зависят не столько от тяжести течения заболевания, сколько от локализации сосудистого поражения [93].

Результаты хирургических операций у пациентов с КИНК на фоне СД являются неудовлетворительными. Пациенты данной группы часто имеют большое сопротивление периферического русла по причине скудного развития капилляров и плохих возможностей дистальной перфузии (увеличивается риск послеоперационных тромбозов). У больных с дистальным типом поражения развивается компенсаторная сеть коллатералей, снижая ОПСС, однако этого не происходит при наличии диабетической микроангиопатии. Микроциркуляторная дисфункция ухудшает и без того недостаточную доставку нутриентов к клеткам и тканям, за счет снижения скорости обменных процессов непосредственно в капиллярах.

При этом на ведущие роли выходит использование эндоваскулярных методов лечения и гибридных операций, однако специфические проявления диабетической макроангиопатии (медиакальциноз Менкеберга, протяженные мягкие бляшки) приводят к увеличению процента рестенозов и диссекций у пациентов при баллонной ангиопластики.

В настоящее время внедряются методы использования индукции ангиогенеза в лечении данной группы пациентов. Наиболее изученным методом терапевтического ангиогенеза является генная стимуляция. Использование плазмидных векторов, несущих генетически измененные факторы роста показывает удовлетворительные результаты лечения. При

анализе данных многих клинических исследований можно сделать вывод, что препараты rVEGF-165 лидируют по безопасности и обладают эффективным преимуществом по сравнению с генами других ангиогенных факторов [60, 88, 100].

Использование препарата на основе rVEGF-165 у пациентов II- III стадии заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна продемонстрировали хорошие результаты со стороны увеличения ДБХ, ТКНК, ЛСК [30]. Наличие трофических нарушений кожных покровов нижних конечностей в таких исследованиях являлось критерием исключения. Таким образом, ранее терапевтический ангиогенез не использовался в составе комбинированной или комплексной терапии для лечения КИНК на фоне СД. Нет сравнения эффективности между оперативным лечением или конвенциональной сосудистой терапией в моно компоненте и сочетания данных подходов к лечению с индукцией ангиогенеза.

С учетом вышеизложенных фактов, была определена цель, сформированы задачи и дизайн настоящего исследования. В диссертационной работе проведено исследование ангиогенных свойств, эффективности и безопасности терапевтического ангиогенеза конструкцией rVEGF-165, для лечения пациентов с критической ишемией атеросклеротического генеза при фоновом сахарном диабете.

Исследование было разделено на экспериментальную и клиническую часть.

Экспериментальная часть исследования выполнена с целью установления изменений в динамике заживления язвенных дефектов кожи (язв) на фоне нарушения углеводного обмена под воздействием конструкции rVEGF-165 у лабораторных животных (крысы).

В рамках данного исследования использовались белые крысы линии Wistar в количестве 24 штук, содержащихся в условиях вивария с соблюдением всех правил гуманного обращения с животными, с поставленной моделью аллоксанового сахарного диабета. На 21 день с начала развития гипергликемии

крысам наносили хирургическую рану кожи размером 8×8 мм в межлопаточной области. Животным контрольной группы в края раны вводили 200 мкл воды для инъекций (n=8). Крысам экспериментальных групп в края раны внутрикожно вводился 60 или 200 мкл раствора плазмиды pCMV-VEGF165 в 200мкл воды для инъекции. Далее всем животным осуществляли планиметрию. Фрагменты тканей фиксировали 10% нейтральным формалином.

Результаты экспериментального исследования показали, что заживление модельного дефекта кожи на фоне гипергликемии, индуцированной аллоксановым повреждением бета клеток островков Лангерганса различается у животных не получавших и получавших препарат плазмиды, кодирующей эндотелиальный сосудистый фактор роста. Эти различия заключаются в изменении динамики основных гистогенетических процессов в ране. Происходят заметные изменения гистологического строения заживающей раны на сроке 10 суток, отмечается более интенсивное образование и дифференцировка грануляционной ткани, что приводит к раннему формированию молодой рубцовой ткани на месте дефекта. Интенсивнее нарастает эпителий, он быстро дифференцируется до дефинитивного вида, начинает формировать придатки роста эпителиальной ткани, о чем свидетельствует изменение площади раневого дефекта, объемов и степени «зрелости» грануляционной ткани, количества и качества кровеносных сосудов и нервного аппарата кожи. Статистически значимые результаты по сравнению с контролем получены для изменения площади раны, количества кровеносных микрососудов в составе регенерата ($p=0,038$ для центральной части реагента и $p=0,046$ для периферической части). Во всех случаях существенные различия были показаны для животных получивших высокую дозу препарата – 200 мг, что свидетельствует о дозозависимом эффекте при действии плазмидных конструкции. Вместе с тем, при трактовке выявленных результатов следует учесть, что исследование охватывало лишь срок в 10 суток наблюдения.

В клиническую часть исследования было включено 140 пациентов с КИНК и фоновым СД, разделенных на 4 группы. В I группу (n=45) были включены пациенты, которым было проведено лечение с помощью открытого или эндоваскулярного вмешательства. Пациентам III группы (n=30) после проведенного оперативного вмешательства на 7-е и 21-е сутки вводился препарат для генной индукции ангиогенеза в дозировке 2,4мг в мышцы голени. Во II (n=40) и IV (n=25) группе пациенты получали стандартную консервативную терапию согласно Национальным рекомендациям по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией, по причине невозможности, высокого ампутационного риска, либо самостоятельного отказа пациента от оперативного лечения. Пациентам IV группы дополнительно в конце курса консервативной терапии проводилась индукция ангиогенеза в две процедуры с интервалом 14 дней по методике, описанной выше. Пациенты всех групп были сопоставимы по полу, возрасту, тяжести заболевания и сопутствующей патологии.

Всем пациентам, при включении в исследование, производились лабораторные (общий и биохимический анализ крови, коагулограмма, общий анализ мочи) и инструментальные обследования (измерение S некроза, ДБХ, ЛПИ, ТКНК, ЛСК, УЗДС или ангиографическое исследование, оценка нейропатии) в динамике лечения.

Период наблюдения за пациентами составил 1 год. За время исследования основные изменения в течение заболевания оценивались при сравнении контрольных точек момента рандомизации, через 3, 6 мес и 1 год лечения.

Использование препарата вызывало незначительные болезненные ощущения во время процедуры, связанные со способом введения (в/м инъекция) и не требовало дополнительного обезболивания. За время проведения исследования не было зарегистрировано ни одного случая серьезной нежелательной реакции и побочного явления от введения плазмиды pVEGF-165.

Оценка результатов исследования проводилась по качественным (летальные исходы, процент сохранности конечности, купирование клиники

критической ишемии, переход стадии заболевания, качество реконструкций и последствия окклюзии зоны операции) и инструментальным показателям (S некроза, ТКНК, ЛПИ, ДБХ, ЛСК, нейропатия).

При оценке показателей сохранности конечности и летальности были получены достоверно лучшие результаты для групп с дополнительной генной индукцией по сравнению с группами контроля. Так в III группе составила 90% по сравнению с 64,4% в I группе. Худший показатель по сохранению конечности был выявлен у II группы (50%), в то время, как при дополнении терапии генной индукцией сохранность конечности составила 76%.

Количество летальных исходов было напрямую сопряжено с последствиями осложнений оперативного лечения или развитием декомпенсации кровообращения при консервативной терапии (II группа - 15%, I группа - 11,1%, IV группа - 4%; III группа - 3,3%). Суммарно из всех пациентов, включенных в исследование (n-140), осложнения, повлекшие смерть пациента возникли в 13 случаях (9,3%). При этом 6 больных перенесли ампутация конечности, а еще 4 имели признаки декомпенсации кровообращения в конечности. То есть в 10 случаях (76,9%) из 13 имелась прямая связь с прогрессированием основного заболевания, и только 3 смертельных случая не были связаны с другими причинами. Между I и III группами не было выявлено различий по проходимости зоны реконструкции, однако получена достоверная разница по лучшей сохранности конечности после окклюзии места оперативного вмешательства для исследуемой группы, по сравнению с контрольной (86,7% в III группе, 33,3% в I группе). Среди пациентов, которым выполнялось оперативное лечение как в исследуемой, так и в контрольной группе была отмечена достоверная положительная динамика по купированию явлений критической ишемии, и по переходу стадии заболевания уже через 3 месяца наблюдения, при этом достоверных различий между группами выявлено не было. При сравнении этих же показателей для групп с консервативным лечением выявлена лучшая динамика перехода стадии заболевания в более легкую после 3 месяцев наблюдения для IV группы.

По показателю ДБХ больший прирост выявлен у прооперированных пациентов с $4,6 \pm 1,1$ м до $151,7 \pm 10,8$ м в I группе; с $8,2 \pm 2,5$ м до $132,1 \pm 14,3$ м в III группе. В группах консервативной терапии ДБХ с 0 достигла показателя в $48,5 \pm 4,9$ м для II группы и $72,9 \pm 9,2$ для IV группы. Результаты были сопоставимы при сравнении консервативных групп между собой и групп с оперативным лечением между собой. Однако при внутригрупповом сравнении между 3 и 6 месяцами наблюдения достоверные различия по приросту ДБХ были получены только для III группы.

При углубленном анализе групп пациентов получавших консервативное лечение (II и IV) с помощью инструментальных методов исследования достоверно лучшие показатели были получены в динамике для IV группы.

Динамика заживления некрозов была достоверно лучше в IV при внутригрупповом сравнении визитов через 3 и 6 месяцев (с $43,7 \pm 17,9$ мм² до $24,2 \pm 16,8$ мм²). Динамика заживления по остальным датам и при межгрупповом сравнении была сопоставима.

Не было выявлено достоверных различий по динамике показателя ЛПИ между группами.

Прирост ТКНК во II группе составил 17,2% (с $33,7 \pm 0,6$ мм.рт.ст до $39,5 \pm 0,8$ мм.рт.ст. за 6 месяцев наблюдения). Для IV группы показатели прироста ТКНК были достоверно лучше как относительно динамики во время исследования после 3 месяцев, так и при межгрупповом сравнении - 32,4% прироста к концу наблюдения (с $33,3 \pm 1,2$ мм.рт.ст до $44,1 \pm 1,6$ мм.рт.ст.). Также достоверные различия между группами были выявлены по показателю ЛСК как при оценке в динамике исследования, так и при внутригрупповом сравнении. Прирост 4% (с $15,1 \pm 0,6$ см/с до $15,7 \pm 0,8$ см/с) во II группе, прирост 65,3% (с $19,9 \pm 2,2$ см/с до $32,9 \pm 9$ см/с) в IV группе.

Отдельно стоит отметить получение достоверного снижения явлений диабетической нейропатии при межгрупповых сравнениях II и IV групп по результатам Мичиганского опросника и шкалы NSS.

Таким образом, в работе доказана эффективность и безопасность применения геннотерапевтической конструкции рVEGF-165 для пациентов с КИНК и СД как в комбинации с реваскуляризацией конечности, так и в составе комплексной терапии при невозможности проведения оперативного вмешательства в краткосрочном (3, 6 месяцев) и отдаленном (1 год) периоде.

Применение препарата рVEGF-165 является безопасным в отношении местных и системных воспалительных реакции и не вызывает развития нежелательных побочных явлений краткосрочном периоде (6 месяцев) после проведенного лечения.

Наиболее эффективным подходом к лечению пациентов данной группы по качественным показателям и инструментальным методам обследования является комбинированный подход, включающий в себя реваскуляризацию конечности с последующим включением генной индукции ангиогенеза в послеоперационном периоде. Стандартная консервативная терапия является наиболее неблагоприятным подходом, как в отношении прогноза сохранности конечности, так и в отношении летальных осложнений основного заболевания.

Терапевтическая индукция ангиогенеза позволяет достоверно улучшить результаты лечения как в комбинации с оперативным лечением, так и в составе комплексной терапии.

Выводы

1. Применение препарата pVEGF-165 для лечения модельных дефектов кожи у животных на фоне гипергликемии через 10 сут. приводит к статистически значимому уменьшению площади кожной раны ($p=0,038$), увеличению количества кровеносных сосудов грануляционной ткани в центральной ($p=0,038$) и периферической части кожного регенерата ($p=0,046$) при применении высокой дозы препарата (200 мкг).

2. Проведение стандартной конвенционной терапии у пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета в течение одного года заканчивается ампутацией в 60% случаев и в 25% случаев летальным исходом.

3. Реваскуляризирующая операция в сочетании с генной индукцией ангиогенеза является наиболее эффективным методом лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета и ведет к сохранению конечности в 83,3% случаев ($p=0,041$) в отдаленном периоде (1 год).

4. Геннотерапевтическая индукция ангиогенеза плазмидной конструкцией pVEGF-165 не вызывает развития местных, системных воспалительных реакций и нежелательных побочных явлений и является безопасным методом лечения

5. Использование геннотерапевтической индукции ангиогенеза позволяет достоверно улучшить результаты лечения пациентов, как в комбинации с оперативным лечением (по показателям сохранности конечности и компенсации кровообращения), так и в составе комплексной терапии, при невозможности проведения прямой реваскуляризации (по показателям сохранности конечности, купировании критической ишемии и диабетической нейропатии, ДБХ, ТКНК, ЛСК)

6. Сформулированный алгоритм ведения пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета позволяет выбрать оптимальную тактику ведения и улучшить ближайшие и отдаленные результаты лечения.

Практические рекомендации

1. Всем пациентам с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза (III – IV стадия заболевания по классификации А.В. Покровского-Фонтейна) и фоновым СД первоначально показан поиск вариантов для оперативного лечения (прямой реваскуляризации конечности).

2. Для пациентов с критической ишемией нижних конечностей и фоновом сахарном диабете при выполнении оперативного вмешательства целесообразным является генная стимуляция ангиогенеза в послеоперационном периоде.

3. При невозможности проведения реваскуляризирующей операции рациональным является включение генной индукции ангиогенеза в состав конвенционной консервативной терапии.

4. При невозможности выполнения своевременной реваскуляризирующей операции, наличии глубоких и обширных трофических нарушений (2-5 стадия по Вагнеру, S некроза >300 мм²) и прогрессировании ишемии показана первичная ампутация конечности.

Список литературы

1. Азизов, Г.А. Особенности микроциркуляции у больных облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей по данным лазерной доплеровской флоуметрии [Текст] / Г.А. Азизов, В.А. Дуванский, Е.Н. Гагарин, А.В. Стешин // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: материалы конф. – М., 2011. – С. 15-16.
2. Азизов, Г.А. Оценка микроциркуляции у больных облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей [Текст] / Г.А. Азизов, В.А. Дуванский, Е.Н. Гагарин, О.Б. Тамразова // Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология: материалы Междунар. науч. конф. – Ярославль, 2011. - С. 30.
3. Астамирова, Х. Настольная книга диабетика. Пятый вариант [Текст] / Х. Астамирова, М. Ахманов. — М.: Эксмо, 2010. – 400 с.
4. Беляев, А.Н. Внутриаартериальная тромболитическая терапия ишемических осложнений диабетической ангиопатии конечностей [Текст] / А.Н. Беляев, А.Г. Павелкин, А.Н. Родин // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – Т. 18. - 313-317.
5. Бокерия, Л.А. Актуальные проблемы хирургического лечения больных с критической ишемией нижних конечностей – пути решения (состояние проблемы) [Текст] / Л.А. Бокерия, М.Б. Темрезов, В.И. Коваленко [и др.] // Анналы хирургии. - 2011. – 1. – С. 5–9.
6. Бокерия, Л.А. Клеточные и интерактивные технологии в лечении врожденных и приобретенных пороков сердца и ишемической болезни сердца [Текст] / Л.А. Бокерия, Г.П. Георгиев, Е.З. Голухова [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2004. – №9.– С.48-55.
7. Бокерия, Л.А. Лечение хронической ишемии нижних конечностей с использованием стимуляторов неоангиогенеза [Текст] / Л.А. Бокерия, М.В. Еремеева, В.С. Аракелян, О.А. Демидова // Клиническая физиология кровообращения. – 2013. - №1. – С.55-60.

8. Боклин, А.А. Применение урокиназы в лечение ран диабетической стопы [Текст] / А.А. Боклин, Е.П. Кривошеков, А.В. Вавилов, П.В. Мачехин // Всероссийская конференция хирургов, посвященная 10-летию медицинского центра им. Р.П. Аскерханова, сборник научных трудов. - Махачкала, 2012. – С. 44-46.
9. Васильченко, Е.М. Показатели выживаемости пациентов с заболеваниями периферических артерий недиабетического генеза после ампутации нижней конечности. Популяционное исследование [Текст] / Е.М. Васильченко, Г.К. Золоев // Анналы хирургии. - 2012. - №3. - С. 48-53
10. Гавриленко, А.В. Комплексное лечение больных с критической ишемией нижних конечностей в сочетании с сахарным диабетом [Текст] / А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов, А.Э. Котов, Д.А. Лоиков // Анналы хирургии. - 2014. - № 3. - С. 41-46.
11. Гавриленко, А.В. Комплексное лечение пациентов с ХИНК с использованием генных индукторов ангиогенеза: ближайшие и отдаленные результаты [Текст] / А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов, Н.Л. Бочков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, №3 (4). – С. 84-88.
12. Гавриленко, А.В. Методы лечения больных облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей при наличии поражения дистального русла. Часть I [Текст] / А.В. Гавриленко, А.А. Егоров, С.Н. Молокопой, А.С. Мамухов // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2011. - Т. 17, № 3. - С. 121–125.
13. Гавриленко, А.В. Методы хирургического лечения больных облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей с поражением дистального русла (часть II) [Текст] / А.В. Гавриленко, А.А. Егоров, А.Э. Котов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 17, № 4. - С. 115-119.
14. Гавриленко, А.В. Применение поясничной симпатэктомии в лечении облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей - современный взгляд на проблему [Текст] / А.В. Гавриленко, Е.П. Кохан, А.В.

Абрамян [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. -2004. - Т. 10, № 3. - С. 90-96.

15. Гавриленко, А.В. Результаты комплексного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных технологий стимуляции ангиогенеза (часть 1) [Текст] / А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. - Том 21, №3. - С. 1-8

16. Гавриленко, А.В. Результаты комплексного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных технологий стимуляции ангиогенеза (часть 2) [Текст] / А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. - Том 21, №3. - С. 9-15

17. Гавриленко, А.В. Сочетание реконструктивных сосудистых операций с генно-инженерными технологиями стимуляции ангиогенеза: современная стратегия улучшения отдаленных результатов лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей [Текст] / А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов, Б.А. Константинов, Н.П. Бочков // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 14, №4. – С. 49-53.

18. Гавриленко, А.В. Хирургическое лечение больных с критической ишемией нижних конечностей при поражениях артерий бедренно-подколенно-берцового сегмента [Текст] / А.В. Гавриленко, С.И. Скрылев // Хирургия. - 2004. - № 8. - С. 36–42.

19. Гавриленко, А.В. Хирургическое лечение критической ишемии нижних конечностей у больных сахарным диабетом [Текст] / А.В. Гавриленко, А.Э. Котов, Д.А. Лоиков // Анналы хирургии. - 2012. - №2. - С.10-15.

20. Галстян, Г.Р. Заболевания артерий нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом: состояние проблемы и перспективы лечения [Текст] / Г.Р. Галстян, А.Ю. Токмакова, О.Н. Бондаренко [и др.] // Сахарный диабет. - 2011. - №1. - С. 74

21. Глухов, А.А. Патофизиология длительно незаживающих ран и современные методы стимуляции раневого процесса [Текст] / А.А. Глухов, М.В. Аралова // Новости хирургии. – 2015. - №23 (6). - С: 673-679

22. Гольцова, Е.Е. Отдаленные результаты аорто-бедренных реконструкций у больных сахарным диабетом 2 типа [Текст] / Е.Е. Гольцова, А.Н. Лебедева // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2010. – 16 (1). – Р. 48–52.
23. Григорян, А.С. Возможные молекулярные механизмы функционирования плазмидных конструкций, содержащих ген VEGF [Текст] / А.С. Григорян, К.Г. Шевченко // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2011. – Т. 6, №3 (4). – С. 24-28.
24. Груздева, О.В. Тромбоцитарный гемостаз и показатели углеводного метаболизма у больных с сочетанием сахарного диабета 2-го типа и артериальной гипертензии [Текст] / О.В. Груздева, С.В. Кремено, Т.Е. Сулова, Е.А. Левашкина // *СМЖ*. - 2008. - №4. – С. 28-30.
25. Дедов, И.И. Диабет как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний [Текст] / И.И. Дедов // *Сердечная недостаточность*. - 2003. - 1. - С. 12–15.
26. Дедов, И.И. Поражения нижних конечностей при сахарном диабете: атлас для врачей [Текст] / И.И. Дедов // М.: Институт проблем управления здравоохранения, 2009. - 56 с.
27. Деев, Р.В. Отдаленные результаты применения р1-VEGF165 при хронической ишемии нижних конечностей вследствие облитерирующего атеросклероза [Текст] / Р.В. Деев, Р.Е. Калинин, Ю.В. Червяков [и др.] // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. – 2015. – 8 (4). – С. 43-49
28. Деев, Р.В. Патогистологические изменения скелетных мышц при хронической артериальной недостаточности нижних конечностей [Текст] / Р.В. Деев, Н.Д. Мжаванадзе, М.О. Мавликеев // *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова*. – 2015. - Т. 10, №2. – С. 18-21
29. Деев, Р.В. Результаты применения генотерапевтического препарата «Неоваскулген» у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: 1 год наблюдений [Текст] / Р.В. Деев, Р.Е. Калинин, Ю.В. Червяков // *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова*. – 2011. – Т. 6, №4. - С. 20-25

30. Деев, Р.В. Эффективность применения гена VEGF165 в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей 2А-3 стадии [Текст] / Р.В. Деев, И.Я. Бозо, Н.Д. Мжаванадзе [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 20, №2 (4). – С.38-48.

31. Джафф, М.Р. Заболевания периферических артерий [Текст] / М.Р. Джафф, Э.Р. Молер // - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 224 с.

32. Дибиров, М.Д. Дистальные реконструкции при критической ишемии нижних конечностей у больных старших возрастных групп [Текст] / М.Д. Дибиров, А.А. Дибиров, Р.У. Гаджимурадов [и др.] // Хирургия. - 2009. - № 1. - С. 49–52.

33. Дибиров, М.Д. Роль реконструктивных сосудистых операций у больных диабетической ангиопатией [Текст] / М.Д. Дибиров, Б.С. Брискин, Ф.Ф. Хамитов [и др.] // Хирургия. - 2009. – 2. – С. 59–63.

34. Дуданов, И.П. Комплексное лечение атеросклеротических поражений абдоминального сегмента аорты, периферических артерий с критической ишемией нижних конечностей у больных преклонного и старческого возраста [Текст] / И.П. Дуданов, А.В. Карпов, М.Ю. Капутин // Медицинский академический журнал. - 2007. - 7 (1). – С. 166–172.

35. Затевахин, И.И. Баллонная ангиопластика при ишемии нижних конечностей [Текст] / И. И. Затевахин, В. Н. Золкин. - М. : Медицина, 2004. – 158 с.

36. Затевахин, И.И. Лечение пациентов с синдромом диабетической стопы и имеющих трофические язвы низкими дозами урокиназы [Текст] / И.И. Затевахин, В.Н. Золкин, И.Н. Коротков // Ангиология и сосудистая хирургия. - Приложение (Материалы 23 (XXVII) Международной конференции г. Санкт-Петербург). – 2012. - Т18, №2. – С. 135-136.

37. Затевахин, И.И. Отдаленные результаты ангиопластики с использованием баллонов с лекарственным покрытием при поражении бедренно-подколенного сегмента [Текст] / И.И. Затевахин, В.Н. Шиповский,

С.Б. Турсунов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия.– 2014. – Т. 20, №4 (4). – С. 64-68.

38. Зусманович, Ф.Н. Реваскуляризирующая остеотрепанация в лечении хронической критической ишемии конечностей [Текст] / Ф.Н. Зусманович // Хирургия. - 1999. - № 4. - С. 10–12.

39. Исмаилов, Н.Б. Лечебная и диагностическая тактика при атеросклеротическом окклюзионно-стенотическом поражении артерий нижних конечностей у геронтологических больных [Текст] / Н.Б. Исмаилов, А.В. Веснин // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. –Т. 14, №4 (4). – С. 27-30.

40. Калинин, Р.Е. Коррекция эндотелиальной дисфункции [Текст] / Р.Е. Калинин. - Saarbrucken, Germany: LAP Lambert Academic Publishing, 2012. –128 с.

41. Калинин, Р.Е. Коррекция эндотелиальной дисфункции как компонент в лечении облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей [Текст] / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, А.С. Пшенников // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 20, №3 (4). – С. 17-22.

42. Калинин, Р.Е. Методы стимуляции секреции оксида азота у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей с позиции коррекции эндотелиальной дисфункции [Текст] / Р.Е. Калинин, А.С. Пшенников // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2011. - № 3. - С. 12-16.

43. Карпов, Р.С. Современные проблемы атеросклероза: взгляд клинициста [Текст] /Р.С. Карпов // Актовая лекция. Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – №.1.

44. Кательницкий, И.И. Количественная оценка состояния сосудистого русла у больных облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей на фоне применения методики терапевтического ангиогенеза [Текст] / И.И. Кательницкий, И.И. Кательницкий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. - Том VIII, № 4. - С. 74-76

45. Ким, А.Ю. Особенности течения раневого процесса при I и II типе сахарного диабета [Текст] / А.Ю. Ким, О.А. Гольдберг, Ю.И. Морозов // Хирургия. – 1998. – № 5.– С. 46-47.
46. Коваленко, В.И. Возможности лечения больных с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей [Текст] / В.И. Коваленко, И.М. Калитко, М.Б. Темрезов [и др.] // Врач. 2010. - №3. – С. 55-58.
47. Коненков В.И. Ангиогенез и васкулогенез при сахарном диабете: новые концепции патогенеза и лечения сосудистых осложнений [Текст] / В.И. Коненков, В.В. Климонтов // Сахарный диабет. – 2012. - №4. - С. 17-27.
48. Константинов, Б.А. Хирургическое лечение критической ишемии нижних конечностей при несостоятельности дистального сосудистого русла [Текст] / Б.А. Константинов, Н.О. Миланов, А.В. Гавриленко // Грудная и серд.-сосуд. хир. - 2001. - № 3. - С. 58–63.
49. Кузин М.И. Раны и раневая инфекция: рук. для врачей [Текст] / М.И. Кузин, Б.М. Костюченко. – М.: Медицина, 1990. – 592 с.
50. Кузнецов, М.Р. Сравнительная оценка антиагрегантной эффективности ацетилсалициловой кислоты и клопидогреля при периферическом атеросклерозе [Текст] / М.Р. Кузнецов, Н.А. Сергеева, В.М. Кошкин [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014. – Т. 20, №1 (4). – С. 8-13.
51. Кунгурцев, В.В. Реконструктивные операции при критической ишемии у лиц пожилого и старческого возраста с бедренно-подколенно-берцовой окклюзией [Текст] / В.В. Кунгурцев, М.Д. Дибиров, А.И. Шиманко // Ангиология и сосудистая хирургия. - 1998. - № 2. - С. 180.
52. Кунгурцев, В.В. Хирургическое лечение окклюдированных поражений артерий голени [Текст] / В.В. Кунгурцев, Д.Г. Киртадзе, М.Д. Дибиров // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. - 1996. - № 6. - С. 317.
53. Липницкий, Е.М. Лечение трофических язв нижних конечностей / Е.М. Липницкий. – М. : Медицина, 2001. – 160 с.

54. Лисин, С.В. Состояние микроциркуляции при IV стадии хронической артериальной недостаточности нижних конечностей атеросклеротического генеза [Текст] / С.В. Лисин, А.П. Чадаев, А.И. Крупаткин [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 14, № 1.– С. 21-28.

55. Макаревич, П.И. Новые плазмидные конструкции, предназначенные для терапевтического ангиогенеза и несущие гены ангиогенных факторов роста – VEGF, HGF и ангиопоэтина-1 [Текст] / П.И. Макаревич, А.Я. Шевелев, И.Н. Рыбалкин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, №1 (4). – С. 47-52.

56. Маслова, О.В. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений [Текст] / О.В. Маслова, Ю.И. Сунцов // Сахарный диабет. - 2011. - №3. - С. 6-11

57. Межобщественный согласительный документ по ведению пациентов с заболеванием периферических артерий (ЗПА) (TASC II), 2007г.

58. Мжаванадзе, Н.Д. Реалии и перспективы применения генной терапии в сердечно-сосудистой хирургии [Текст] / Н.Д. Мжаванадзе, И.Я. Бозо, Р.Е. Калинин, Р.В. Деев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7, №2 (4). – С. 58-62.

59. Морозов, К.М. Микрососудистая и пластическая хирургия - синергисты в комплексном лечении пациентов с поражениями артерий дистального русла (реконструктивные операции и трансплантация свободных мягкотканых лоскутов) [Текст] / К.М. Морозов, К.Г. Абалмасов, А.В. Быстров [и др.] // Сердечно – сосудистые заболевания: бюл. науч. центра сердечно - сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН. - 2006. - Т. 7, № 2. - С. 16-32.

60. Национальные рекомендации по ведению пациентов с патологией артерий нижних конечностей [Текст] // Ангиология и сосудистая хирургия.– 2013. – Т. 19, № 2 (Прил.). – С. 1-67.

61. Парфенова, Е.В. Влияние гипергликемии на ангиогенные свойства эндотелиальных и прогениторных клеток сосудов [Текст] / Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук // Вестник РАМН. - 2012. - №1. - С. 38-44.

62. Парфенова, Е.В. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы [Текст] / Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук // Кардиологический вестник. – 2007. – Т. 2. – С. 5-15.
63. Пасхалова, Ю. С. Стратегия хирургического лечения нейроишемической формы синдрома диабетической стопы [Текст] / Ю.С. Пасхалова, В.А. Митиш, С.Л. Соколов [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке. - 2009. – 11 (12). – С. 502-503.
64. Повещенко, А.Ф. Механизмы и факторы ангиогенеза [Текст] / А.Ф. Повещенко, В.И. Коненков // Успехи физиологических наук. – 2010. - Т. 41, № 2. - С. 68-89
65. Покровский, А.В. Артериализация венозного кровотока стопы в спасении конечности от ампутации у больных облитерирующим тромбангиитом с окклюзией артерий голени и стопы при критической ишемии [Текст] / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.В. Чупин // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2000. - Т. 6, № 4. - С. 86–99.
66. Покровский, А.В. Клиническая ангиология: руководство: в 2-х т. [Текст] / А.В. Покровский. - М.: Медицина, 2004. – Т. 1 – 2.
67. Покровский, А.В. Можно ли предсказать исход реконструктивной операции у больных с ишемией нижних конечностей на основании дооперационных исследований? [Текст] / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.В. Чупин, А.Ф. Харазов // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2002. - № 3. – С. 102-109.
68. Покровский, А.В. Состояние сосудистой хирургии в России в 2014 году [Текст] /А.В. Покровский, В.Н. Гонтаренко // Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов. – Москва, 2015.
69. Покровский, А.В. Состояние сосудистой хирургии в России в 2016 году [Текст] /А.В. Покровский, А.С. Ивандаев // Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов.– Москва, 2017.

70. Покровский, А.В. Что изменилось в терапии сосудистых больных (роль статинов и бета-адреноблокаторов) [Текст] / А.В. Покровский, А.Л. Головюк // *Ангиология и сосудистая хирургия.* – 2010. – Т. 16, №2 (4). – С. 7-11.
71. Покровский, А.В. Хирургическое лечение критической ишемии нижних конечностей [Текст] / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.В. Чупин [и др.] // *Ангиология и сосудистая хирургия.* - 1998. - № 2 (Прил.). - С. 198–199.
72. Почепцова, Е.Г. Атеросклероз артерий нижних конечностей и ишемическая болезнь сердца [Текст] / Е.Г. Почепцова, Л.Н. Яковлева // *Фармакотерпія.* – 2014. – №9(185). –С.62-68.
73. Савельев, В.С. Критическая ишемия нижних конечностей [Текст] / В.М. Савельев, В.С. Кошкин – М.: Медицина, 1997. – 160 с.
74. Савельев, В.С. Критическая ишемия как следствие неадекватного лечения больных хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей на амбулаторном этапе [Текст] / В.С. Савельев, В.М. Кошкин, А.С. Кунижев // *Ангиология и сосудистая хирургия.* - 2004. - № 1. -С. 7-10.
75. Самодай, В.Г. Нестандартная хирургия критической ишемии нижних конечностей [Текст] / В.Г. Самодай, Ю.А. Пархисенко, А.А. Иванов. - М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2009. - 240 с.
76. Сафарова, Г.Л. Региональная дифференциация показателей старения населения России [Текст] / Г.Л. Сафарова, Н. Косолапенко, В. Арутюнов // *Успехи геронтологии.* – 2005.– Т. 16. – С. 7 – 13.
77. Смолянинов, А. Б. Клеточные технологии в лечении терминальной стадии хронической ишемии нижних конечностей [Текст] / А.Б. Смолянинов, Е.В. Пыхтин, Д.В. Булгин [и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2007. – Т. 2, №3 (4). – С. 40-46.
78. Спасов, А.А. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 [Текст] / А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л. Снигур [и др.]// *Биомедицина.* - 2011. - № 3.- С. 12-18.

79. Струков, А.И. Патологическая анатомия [Текст] / А.И. Струков, В.В. Серов, В.С. Паукова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 880 с.
80. Сударев, А.М. Лечение хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей [Текст] / А.М. Сударев // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013. – Т.19, №1 (4). – С. 26-31.
81. Талицкий, К.А. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей [Текст] / К.А. Талицкий, О.С. Булкина, Т.И. Арефьева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, №3 (4). –С. 89-98.
82. Терещенко, С.Н. Антитромботическая терапия как основа профилактики сердечно-сосудистых осложнений. Фокус на ацетилсалициловую кислоту [Текст] / С.Н. Терещенко, Н.А. Джиани // Трудный пациент. – 2008; – Т. 11, №6.
83. Троицкий, А.В. Результаты реконструктивных операций у больных с поражением артерий голени [Текст] / А.В. Троицкий, Е.Р. Лысенко, Р.И. Хабазов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2003. - № 1. – С. 102-108.
84. Уоткинс, П.Дж. Сахарный диабет [Текст] / П.Дж. Уоткинс. — М.: Бином, 2006. — 134 с.
85. Фаттахов, В.Л. Влияние кислотно-основного состояния среды на течение раневого процесса при сахарном диабете [Текст] / В.Л. Фаттахов, Ю.С. Винник, О.В. Теплякова // Сибирское медицинское обозрение. - 2009. - №6. - С. 35-38.
86. Харазов, А.Ф. Рандомизированные плацебо-контролируемые исследования илопроста при лечении критической ишемии нижних конечностей [Текст] / А.Ф. Хазов // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2010. – Т. 16, №3 (4). – С. 27-32.
87. Хрупкин, В.И. Дерматопластика раневых дефектов [Текст] / В.И. Хрупкин, В.Ф. Зубрицкий, А.Н. Ивашкин [и др.]. – М. : ГЕОТАР-Медиа, 2009. – 192 с.

88. Червяков, Ю.В. Отдаленные результаты лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей методами непрямой реваскуляризации и генной терапии [Текст] / Ю.В. Червяков, И.Н. Староверов, О.Н. Власенко [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. –2016. – Т. 22, №1 (4). – С. 29-37.

89. Червяков, Ю.В. Пятилетние результаты лечения больных хронической ишемией нижних конечностей с использованием генной терапии [Текст] / Ю.В. Червяков, И.Н. Староверов, О.Н. Власенко [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2016. - Т. 22, № 4. - С. 38-45

90. Червяков, Ю.В. Современные возможности лечения хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей в амбулаторных условиях [Текст] / Ю.В. Червяков, И.Н. Староверов, О.Н. Власенко // Трудный пациент. - 2017. - Том 15, №3. - С. 32-37.

91. Чуканова, Г.Н. Моделирование сахарного диабета 2 типа для изучения лекарственных средств с антидиабетической активностью [Текст] / Г.Н. Чуканова, М. Дворацка, С.С. Исакова, Е.Ж. Курмамбаев // Наука и здравоохранение. - 2014. - №4. - С. 4-8.

92. Швальб, П.Г. Влияние перемежающейся пневмокомпрессии на выработку оксида азота как основного маркера эндотелиальной дисфункции у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей [Текст] / П.Г. Швальб, Р.Е. Калинин, А.С. Пшенников, И.А. Сучков // Новости хирургии. - 2011. - № 3. – С. 77-81.

93. Швальб, П.Г. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулген» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIb-III фаза клинических испытаний) [Текст] / П.Г. Швальб, А.В. Гавриленко, Р.Е. Калинин [и др.] // Гены и клетки. - 2011. - №3. - С. 76-83

94. Шевченко, Ю.Л. Клеточные технологии в сердечно-сосудистой хирургии / Ю.Л. Шевченко, С.А. Матвеева // М.: Медицина, 2005. – 156 с.

95. Шестакова, В. Г. Интенсивность ангиогенеза при заживлении кожных ран у крыс на фоне введения плазмидной ДНК VEGF 165 [Текст]/ В.Г. Шестакова, Р.В. Деев, В.В. Банин // Морфология. – 2016. – № 3. – С. 239 .

96. Шор, Н.А. Состояние микроциркуляции в нижних конечностях при облитерирующем атеросклерозе в стадии критической ишемии до и после восстановительных операций [Текст] / Н.А. Шор, А.А. Тютюнник // Методология флоуметрии. - 2002. - № 6. - С. 69-76.

97. Ведущие причины смерти в мире. Информационный бюллетень №310 [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – 2014 . - Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/>

98. Всемирный атлас профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и борьбы с ними. Политика, стратегия и меры борьбы. [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – 2013 . - Режим доступа: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/ru/

99. Глобальный доклад по диабету [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – 2016 . - Режим доступа: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204874/4/WHO_NMH_NVI_16.3_rus.pdf?ua=1&ua=1

100. Деев, Р.В. Теоретические и практические аспекты применения препарата на основе нуклеиновой кислоты, кодирующей эндотелиальный сосудистый фактор роста («Неоваскулген») [Электронный ресурс] / Р.В. Деев, Ю.В. Червяков, Р.Е. Калинин, А.А. Исаев // Электронный журнал ANGIOLOGIA.ru. - 2011. – Режим доступа: http://www.angiologia.ru/journal_angiologia/001_2011

101. Диабет. Информационный бюллетень [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – 2016 . - Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/ru/>

102. Кательницкий, И.И. Методы лечения больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей при критической ишемии [Электронный ресурс] / И.И. Кательницкий, Е.С. Ливадня // Электронный

научный журнал. Современные проблемы науки и образования. – 2014.- № 3. –
Режим доступа: <http://www.scienceeducation.ru/ru/article/view?id=13206>

103. Клинические рекомендации: Заболевания артерий нижних конечностей. - [Электронный ресурс]. – 2016. - Режим доступа: <https://racvs.ru/clinic/files/2016/Diseases-lower-limb-arteries.pdf>

104. Новости медицины и фармации [Электронный ресурс] / Новостной сайт Remedium. – 2015. – Режим доступа: <http://remedium.ru/news/detail.php?ID=62225>.

105. Распространенность, эпидемиология, статистика заболеваний периферических артерий [Электронный ресурс] / Медицинский сайт Surgeryzone. – 2010. – Режим доступа: <http://surgeryzone.net/info/info-hirurgia/rasprostranennost-epidemiologiya-statistika-zabolevanijperifericheskix-arterij.html>.

106. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утв. Главным государственным санитарным врачом СССР 06.04.1973 N 1045-73) (вместе с "Правилами гуманного обращения с лабораторными животными") [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://legalacts.ru/doc/sanitarnye-pravila-po-ustroistvu-oborudovaniiu-i-soderzhaniuu/>

107. Сердечно-сосудистые заболевания. Информационный бюллетень №317 [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – 2015. - Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/ru/>

108. Цилостазол, нафтидрофурил оксалат, пентоксифиллин и инозитола никотинат в терапии перемежающейся хромоты у пациентов с болезнью периферических артерий [Электронный ресурс] / Медицинский сайт Eskopharma. - 2011. – Режим доступа: eskopharma.ru/pdf/angiologia2.pdf

109. Adam, D.J. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multi-centre, randomized controlled trial [Text] / D.J. Adam, J.D. Beard, T. Cleveland [et al.] // Lancet. - 2005. - № 366. - P. 1925–1934.

110. Aghdam, S.Y. Vascular endothelial insulin/IGF-1 signaling controls skin wound vascularization [Text] / S.Y. Aghdam, S.A. Eming, S. Willenborg [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012. – 421 (2). – P. 197–202.
111. Agrotis, A. Transforming growth factor-beta, cell signaling and cardiovascular disorders [Text] / A. Agrotis, N. Kalinina, A. Bobik // *Curr Vasc Pharmacol*. – 2005. - 3(1). – P. 55-61.
112. Ajroud-Driss, S. Phase 1/2 open-label dose-escalation study of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with painful diabetic peripheral neuropathy [Text] / S. Ajroud-Driss, M. Christiansen, J.A. Allen // *Mol Ther*. – 2013. – 21 (6). – P. 1279-1286.
113. Akopyan, Zh.A. The influence of high glucose concentration on the ability of mesenchymal stromal cells to stimulate blood vessel growth [Text] / Zh.A. Akopyan, G.V. Sharonov, T.N. Kochegura [et al.] // *Diabetes mellitus*. – 2011.- 3. – P. 32-36.
114. Albiero, M. Defective recruitment, survival and proliferation of bone marrow-derived progenitor cells at sites of delayed diabetic wound healing in mice [Text] / M. Albiero, L. Menegazzo, E. Boscaro [et al.] // *Diabetologia*. – 2011. – 54 (4). - P. 945-953.
115. Armstrong, D.G. Guest editorial: are diabetes-related wounds and amputations worse than cancer? [Text] / D.G. Armstrong, J. Wrobel, J.M. Robbins [et al.] // *Int Wound J*. – 2007. – 4 (4). – P. 286-287.
116. Ascher, E. Haimovici's vascular surgery [Text] / E. Ascher. - 5th ed.- New York: Wiley-Blackwell, 2004. - 1260 p.
117. Belch, J. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia [Text] / J. Belch, W.R. Hiatt, I. Baumgartner // *Lancet*. – 2011. – Vol. 377, № 9781. – P. 1929-1937.

118. Berlanga-Acosta, J. Diabetic lower extremity wounds: the rationale for growth factors-based infiltration treatment [Text] / J. Berlanga-Acosta // *International Wound Journal*. – 2011. – 8 (6). – P. 612-620.
119. Biscetti, F. Glycaemic variability affects ischaemia-induced angiogenesis in diabetic mice [Text] / F. Biscetti, D. Pitocco, G. Straface [et al.] // *Clin Sci (Lond)*. – 2011. – 121 (12). – P. 555-564.
120. Bobkiewicz-Kozłowska, T. Hypoglycaemic effect of quinolizidine alkaloids — lupanine and 2-thionosparteine on non-diabetic and strep-tozotocin-induced diabetic rats [Text] / T. Bobkiewicz-Kozłowska, M. Dworacka, S. Kuczyński [et al.] // *European Journal of Pharmacology* -2007.- 565.- P. 240–244
121. Bourne, R.R. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis [Text] / R.R. Bourne, G.A. Stevens, R.A. White [et al.] // *Lancet Global Health*. – 2013. – 1. - P. 339-349
122. Brindle, N.P. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection [Text] / N.P. Brindle, P. Saharinen, K. Alitalo // *Circ Res*. – 2006. –Vol. 98. – P. 1014–1023.
123. Brunner, S. Circulating angiopoietic cells and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus, with or without macrovascular disease [Text] / S. Brunner, F. Hoellerl, K.E. Schmid-Kubista [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2011. –52 (7). – P. 4655-4662.
124. Calzi, L.S. Endothelial progenitor dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy: treatment concept to correct diabetes-associated deficits [Text] / S. Li Calzi, M.B. Neu, L.C. Shaw, M.B. Grant // *EPMA J*. – 2010. – 1 (1). – P. 88-100.
125. Catalano, M. Epidemiology of critical limb ischaemia: North Italian data [Text] / M. Catalano // *Eur. J. Med*. – 1993. – Vol. 2, № 1. – P. 11–14.
126. Cavanagh, P.R. Treatment for diabetic foot ulcers [Text] / P.R. Cavanagh, B.A. Lipsky, A.W. Bradbury [et al.] // *The Lancet*. – 2005. – 366 (9498). – P. 1725–1735.

127. Chatzigeorgiou, A. The use of animal models in the study of diabetes mellitus [Text] / A. Chatzigeorgiou, A. Halapas, K. Kalafatakis, E. Kamper // *In Vivo*. – 2009. – 23(2). – P. 245-258.
128. Churdchomjan, W. Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control [Text] / W. Churdchomjan, P. Kheolamai, S. Manochantr [et al.] // *BMC Endocr Disord*. – 2010. – 7. – P. 10-15.
129. Creager, M.A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I [Text] / M.A. Creager, T.F. Lüscher, F. Cosentino, J.A. Beckman // *Circulation*. – 2003. – 108. – P. 1527–1532.
130. Creager, M.A. Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication [Text] / M.A. Creager, J.W. Olin, J.F. Belch [et al.] // *Circulation*. – 2011. – Vol. 124, № 16. – P. 1765—1773.
131. Creutzig, A. Meta-analysis of randomized controlled prostaglandin E 1 studies in peripheral arterial occlusive disease stages III and IV [Text] / A. Creutzig, W. Lehmacher, M. Elze // *VASA*. – 2004. – 33. – P. 137–144.
132. Dong, C. Endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease [Text] / C. Dong, P. J. Goldschmidt-Clermont // *J Interv Cardiol*. – 2007. – Vol. 20, № 2. – P. 93–99.
133. Dorros, G. Tibioperonral (outflow lesion) angioplasty can be as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: fiveyear follow-up [Text] / G. Dorros, M.R. Jaff, A.M. Dorros [et al.] // *Circulation*. – 2001. – № 104. – P. 2057–2062.
134. Fadini, G.P. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus [Text] / G.P. Fadini, M. Miorin, M. Facco [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. – 2005. – 45(9). – P. 1449-1457.
135. Fadini, G.P. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes [Text] / G.P. Fadini, E. Boscaro, S. de Kreutzenberg [et al.] // *Diabetes Care*. – 2010. – 33 (5). – P. 1097-1102.

136. Frykberg, R.G. The high risk foot in diabetes mellitus [Text] / R.G. Frykberg — New York: Churchill Livingstone, 1991. — 569 p.
137. Gao, Y. Nebivolol: an endothelium-friendly selective β 1-adrenoceptor blocker [Text] / Y. Gao, P. M. Vanhoutte // *J Cardiovasc Pharmacol.* — 2012. — Vol. 59, № 1. — P. 16-21.
138. Gianni-Barrera, R. Long-term safety and stability of angiogenesis induced by balanced single-vector co-expression of PDGF-BB and VEGF164 in skeletal muscle [Text] / R. Gianni-Barrera, M. Burger, T. Wolff [et al.]// *Sci Rep.* — 2016. — 17 (6). — P. 21546
139. Giacco, F. Oxidative stress and diabetic complications [Text] / F. Giacco, M. Brownlee // *Circ Res.* — 2014. — 107 (9). — P. 1058–1070.
140. Goligorsky, M.S. Review article: endothelial progenitor cells in renal disease [Text] / M.S. Goligorsky, M.C. Kuo, D. Patschan, M.C. Verhaar // *Nephrology (Carlton).* — 2009. — 14 (3). — P. 291-297.
141. Gregg, E.W. Trends in the prevalence and ratio of diagnosed to undiagnosed diabetes according to obesity levels in the U.S. [Text] / E.W. Gregg, B.L. Cadwell, Y.J. Cheng // *Diabetes Care.* — 2004. - 27 (12). — P. 2806–2812.
142. Gurtner, G.C. Wound repair and regeneration [Text] / G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon [et al.] // *Nature.* — 2008. — 453 (7193). — P. 314–321.
143. Harold, B. Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing [Text] / B. Harold, A. Kodra, M.S. Golinko [et al.] // *J. of Investigative Dermatology.* — 2009. — 129. — P. 2275 – 2287.
144. Huang, N. Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF165 gene therapy for augmentation of skin flap viability [Text] / N. Huang, A. Khan, H. Ashrafpour [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* — 2006. — 291. — P. 127-137.
145. Islam, M.S. Experimentally induced ro-dent models of type 2 diabetes [Text] / M.S. Islam, R.D. Wilson // *Methods Mol Biol.* - 2012.-933. - P.161-174.

146. Jawien, J. Angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist ameliorates progress of atherosclerosis in apoE-knockout mice [Text] / J. Jawien, J. Toton-Zuranska, M. Gajda [et al.] // *J Physiol Pharmacol.* – 2012. – Vol. 63, № 1. – P. 77-85.

147. Jazwa, A. Combined vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor 4 gene transfer improves wound healing in diabetic mice [Text] / A. Jazwa, P. Kucharzewska, J. Leja [et al.] // *Genetic Vaccines Therapy.* – 2010. – 8. – P. 1-16.

148. Jazwa, A. Limb ischemia and vessel regeneration: Is there a role for VEGF? [Text] / A. Jazwa, U. Florczyk, A. Grochot-Przeczek, [et al.] // *Vascul Pharmacol.* – 2016. – 86. - P. 18-30.

149. Kang, L. Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in diabetes [Text] / L. Kang, Q. Chen, L. Wang [et al.] // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2009. - 36(10). – P. 47-56.

150. Kessler, J.A. Double-blind, placebo-controlled study of HGF gene therapy in diabetic neuropathy [Text] / J.A. Kessler, A.G. Smith, B.S. Cha [et al.] // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2015. – 2 (5). – P. 465-478.

151. Kim, H.S. In vitro and in vivo epidermal growth factor gene therapy for diabetic ulcers with electrospun fibrous meshes [Text] / H.S. Kim, H.S. Yoo // *Acta Biomaterialia.* – 2013. – 9 (7). – P. 7371–7380.

152. Ko, J. Comparison of EGF with VEGF non-viral gene therapy for cutaneous wound healing of streptozotocin diabetic mice [Text] / J. Ko, H. J un, H. Chung [et al.] // *Diabetes and Metabolism Journal.* – 2011. – 35 (3). – P. 226–235.

153. Kusumanto, Y. H. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a doubleblind randomized trial [Text] / Y.H. Kusumanto, V. van Weel, N.H. Mulder [et al.] // *Hum Gene Ther.* – 2006. – 17(6). – P. 683-91.

154. Lee, B.S. Simvastatin and losartan differentially and synergistically inhibit atherosclerosis in apolipoproteine(-/-) mice [Text] / B.S. Lee, J.Y. Choi, J.Y. Kim [et al.] // *Korean Circ J.* – 2012. – Vol. 42, № 8. - P. 543-550.

155. Leiter, E.H. Effect of immunodeficiency on diabetogenesis in genetically diabetic (db/db) mice [Text] / E.H. Leiter, M. Prochazka, L.D. Shultz // *J.Immunol.*-1987. - 138. - P. 3224-3229.
156. Lipsky, B.A. Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections [Text] / B.A. Lipsky, A.R. Berendt, P.B. Cornia [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2012. – 54. – P. 132–173.
157. Loosemore, T.M. A meta-analysis of randomized placebo control trials in Fontaine stages III and IV peripheral occlusive arterial disease [Text] / T.M. Loosemore, T.C. Chalmers, J.A. Dormandy // *Int Angiology.* – 1994. - 13 (2). – P. 133-142.
158. Mathers, C.D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [Text] / C.D. Mathers, D. Loncar // *PLoS Med.* – 2006. - 3(11):e442.
159. Midttun, M. Peripheral blood flow rates and microvascular responses to orthostatic pressure changes in claudicants before and after revascularisation [Text] / M. Midttun, P. Sejrnsen, W. P. Paaske // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 1999. - № 17. – P. 225–229.
160. Milkiewicz, M. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation [Text] / M. Milkiewicz, E. Ispanovic, J.L. Doyle, T.L. Haas // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2006. – Vol. 38 № 3. –P. 333-357.
161. Moldovan, L. Role of monocytes and macrophages in angiogenesis [Text] /L. Moldovan, N.I. Moldovan // *EXS.* - 2005. – Vol. 94. – P. 127-146.
162. Mulder, G. Treatment of nonhealing diabetic foot ulcers with a platelet-derived growth factor gene-activated matrix (GAM501): results of a phase 1/2 trial [Text] / G. Mulder, A.J. Tallis , V.T. Marshall [et al.] // *J. Wound Repair Regeneration.* – 2009. – 17. – P. 772-779.
163. Muluk, S.C. Outcome events in patients with claudication: a 15-year study in 2,777 patients [Text] / S.C. Muluk, V.S. Muluk, M.E. Kelley [et al.] // *J Vasc Surg.* – 2001. – Vol. 33. – P. 251–257.

164. National Institute for Health and Clinical Excellence [Text]: Cilostazol, naftidrofuryl oxalate, pentoxifylline and inositol nicotinate for the treatment of intermittent claudication in people with peripheral arterial disease. – 2011. – P. 69.
165. Nikol, S Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia [Text] / S. Nikol, I. Baumgartner, E. Van Belle [et al.] // *Mol. Ther.* – 2008. – 16(5). – P.8.
166. Oostrom, van O. Folic acid supplementation normalizes the endothelial progenitor cell transcriptome of patients with type 1 diabetes: a case-control pilot study [Text] / O. van Oostrom, D.P. de Kleijn, J.O. Fledderus [et al.] // *Cardiovasc Diabetol.* – 2009. – 8. – P. 47.
167. Portha, B. Dynamic of glucose-induced insulin release during the spontaneous remission of strep-tozotocin diabetes induced in the newborn rat [Text] / B. Portha, M. Kergoat // *Diabetes.* - 1985. - 34. - P. 547-579.
168. Powell, R.J. Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: result of the HGF-0205 trial [Text] / R.J. Powell, P. Goodney, F.O. Mendelsohn [et al.] // *J.Vasc. Surg.* – 2010. – 52(6). – P.30.
169. Prompers, L. Delivery of care to diabetic patients with foot ulcers in daily practice: results of the Eurodiale Study, a prospective cohort study [Text] / L. Prompers, M. Huijberts, J. Apelqvist [et al.] // *Diabet Med.* – 2008. – 25. – P. 700–707.
170. Prompers, L. Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study [Text] / L. Prompers, N. Schaper, J. Apelqvist // *Diabetologia.* – 2008. – 51 (5). – P. 747-755.
171. Rachael, O.F. Management of critical limb ischemia in the patient with diabetes [Text] / O.F. Rachael, J.H. Robert // *J. Cardiovasc. Surg.* – 2016. - 57 (2). – P. 273–281.

172. Risbud, M.V. Models of pancreatic re-generation in diabetes [Text] / M.V. Risbud, R.R. Bhonde // *Diabetes Res Clin Pract.* - 2002. - 58. - P. 155-165.
173. Romano, S. Adenovirus-mediated VEGF165 gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice [Text] / S. Romano, A. Mangoni, G. Zambruno [et al.] // *Gene therapy J.* - 2002. - 9. - P. 1271–1277.
174. Ropper, A.H. Vascular endothelial growth factor gene transfer for diabetic polyneuropathy: A randomized, double-blinded trial [Text] / A.H. Ropper, K.C. Gorson, C.L. Gooch [et al.] // *Ann Neuro.* - 2009. - 65. - P. 386–393.
175. Rutherford, R.B. Recommended Standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version [Text] / R.B. Rutherford, J.D. Baker, C. Ernst [et al.] // *J Vasc Surg.* - 1997. - Vol. 26, № 3. - P. 517-538.
176. Saaristo, A. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing [Text] / A. Saaristo, T. Tammela, A. Farkkila [et al.] // *Vascular Biology, Atherosclerosis and Endothelium Biology J.* - 2002. - 169 (3). - P. 1080 – 1087.
177. Sarwar, N. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. Emerging Risk Factors Collaboration [Text] / N. Sarwar, P. Gao, S.R. Seshasai [et al.] // *Lancet.* - 2010. - 26 (375). - P. 2215-2222.
178. Sahin, K. Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [Text] / K. Sahin, M. Onderci, M. Tuzcu [et al.] // *Metabolism.* - 2007. - 56(9). - P. 1233–1240.
179. Shamma, N.W. Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease [Text] / N.W. Shamma // *Vasc Health Risk Manag.* - 2007. - Vol. 3, № 2. - P. 229–234.
180. Shigematsu, H. Transfection of human HGF plasmid DNA improves limb salvage in Buerger's disease patients with critical limb ischemia [Text] // H. Shigematsu, K. Yasuda, T. Sasajima [et al.] // *Int Angiol.* - 2011. - 30(2). - P. 9.
181. Shimamura, M. Gene therapy and cell-based therapies for therapeutic angiogenesis in peripheral artery disease [Text] / M. Shimamura, H. Nakagami, H.

Koriyama, R. Morishita // *BioMed Research International*. – 2013. - Article ID 186215. – P. 8.

182. Shoji, T. Receptor for advanced glycation end products is involved in impaired angiogenic response in diabetes [Text] / T. Shoji, H. Koyama, T. Morioka [et al.] // *Diabetes*. – 2006. – 55 (8). – P. 2245-2255.

183. Smadja, D.M. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy [Text] / D.M. Smadja, A. Cornet, J. Emmerich [et al.] // *Cell BiolToxicol*. – 2007. – Vol. 23. - № 4. – P. 223–239

184. Spinetti, G. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies [Text] / G. Spinetti, N. Kraenkel, C. Emanuelli, P. Madeddu // *Cardiovasc. Res*. – 2008 – Vol. 78. – P. 265–273.

185. Srinivasan, K. Animal models in type 2 diabetes research: An overview [Text] / K. Srinivasan, P. Ramarao // *Indian J Med Res*. 2007-125(3). - P. 451-472.

186. Tepper, O.M. Adult vasculogenesis occurs through the in situ recruitment, proliferation and tubulization of circulating bone marrow-derived cells [Text] / O.M. Tepper, J.M. Capla, R.D. Galiano [et al.] // *Blood*. – 2005. – 1 (105). – P.1068-1077.

187. Tiaka, E.K. Epidermal growth factor in the treatment of diabetic foot ulcers: an update [Text] / E.K. Tiaka, N. Papanas, A.C. Manolakis [et al.] // *Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy*. – 2012. – 24 (1). – P. 37–44.

188. Toursarkissian, B. Outcomes following distal bypass graft occlusion in diabetics [Text] / B. Toursarkissian, P.K. Shireman, J. Schoolfield, R.L. Blumoff // *Ann Vasc Surg*. – 2003. – 17 (6). - 670-675.

189. Vinik, A.I. Diabetic autonomic neuropathy [Text] / A.I. Vinik, R.E. Maser, B.D. Mitchell [et al.] // *Diabetes Care*. – 2003. – 26. – P. 1553–1579.

190. Wakabayashi, I. Recent Knowledge of Smoking and Peripheral Arterial Disease in Lower Extremities [Text] / I. Wakabayashi, Y. Sotoda, S. Hirooka, H. Orita // *Nihon Eiseigaku Zasshi*. – 2015. – 70 (3). – P. 211-219.

191. Wehland, M. The effects of newer beta-adrenoceptor antagonists on vascular function in cardiovascular disease [Text] / M. Wehland, J. Grosse, U. Simonsen [et al.] // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2012. – Vol. 10, № 3. – P. 378-390.
192. Werstuck, G.H. Hyperglycaemia is associated with impaired vasa vasorum neovascularization and accelerated atherosclerosis in apolipoprotein-E deficient mice [Text] / G.H. Werstuck, K.J. Veerman, D.E. Venegas-Pino [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2013. – 227 (2). – P. 250-258.
193. Wesołowska, A. Statins in low doses reduce VEGF and bFGF serum levels in patients with type 2 diabetes mellitus [Text] / A. Wesołowska, M. Dworacka, E. Krzyżagórska [et al.] // *Pharmacology.* – 2014. – 93 (1-2). – P. 32-38.
194. Wieczór, R. Impact of type 2 diabetes on the plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors type 1 and type 2 in patients with peripheral arterial disease [Text] / R. Wieczór, G. Gadomska, B. Ruszkowska-Ciastek [et al.] // *J Zhejiang Univ Sci B.* – 2015. – 16 (11). – P. 948-956.
195. Wilensky, R.L. Phase I study of multi-gene cell therapy in patients with peripheral artery disease [Text] / R.L. Wilensky, P.M. Grossman, E.R. Mohler 3rd [et al.] // *Vasc Med.* – 2016. - 21(1). – P. 21-32.
196. Williams, P. D. Development of viral vectors for use in cardiovascular gene therapy [Text] / P.D. Williams, P. Ranjzad, S.J. Kakar // *Viruses.* – 2010. – Vol.2. – P. 334–371.
197. Xiao, L. Anti-vascular endothelial growth factor treatment induces blood flow recovery through vascular remodeling in high-fat diet induced diabetic mice [Text] / L. Xiao, K. Yan, Y. Yang [et al.] // *Microvasc Res.* – 2016. – Vol. 105. – P. 70-76.
198. Yamaoka, T. Risk factors for wound complications and 30-day mortality after major lower limb amputations in patients with peripheral arterial disease [Text] / T. Yamaoka, K. Morisaki, K. Iwasa // *Vascular.* – 2018. – 26 (1). – P. 12-17.
199. Yanai, H. A crosstalk between macroangiopathy and microangiopathy in type 2 diabetes [Text] / H. Yanai, H. Hamasaki, S. Moriyama // *Int J Cardiol.* – 2013. – 168 (1). – P. 550-551.

200. Yang, S.L. Pathophysiology of peripheral arterial disease in diabetes mellitus [Text] / S.L. Yang, L.Y. Zhu, R. Han [et al.] // *J Diabetes*. – 2017. – 9 (2). – 133-140.
201. Yang, W. Clinical Characteristics of Young Type 2 Diabetes Patients with Atherosclerosis [Text] / W. Yang, X. Cai, X. Han, L. Ji // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 8. - №11 (7). – P. 15-19.
202. Zhang, M. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose strepto-zotocin induced type 2 diabetes rat model [Text] / M. Zhang, X.Y. Lv, J. Li [et al.] // *Exp. Diabetes Res*. – 2008. - Vol. 2008. – P. 9.
203. Zhang, S.N. Intracoronary autologous bone marrow stem cells transfer for patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomised controlled trials [Text] / S.N. Zhang, A.J. Sun, J.B. Ge [et al.] // *Int J Cardiol*. – 2009. – Vol. 136, N 2. – P. 178–185.
204. Zhu, C. Factors associated with lower extremity atherosclerotic disease in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus: A case-control study [Text] / C. Zhu, Q. Gao, B. He [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – 95 (51). – P. 52-58.
205. Phase 2b Study of GAM501 in the Treatment of Diabetic Ulcers of the Lower Extremities (MATRIX) [Электронный ресурс] / Медицинский сайт Clinicaltrials.gov. – 2018. - Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00493051>
206. Phase 3 Gene Therapy for Painful Diabetic Neuropathy [Электронный ресурс] / Медицинский сайт Clinicaltrials.gov. – 2018. - Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02427464>
207. Safety and Efficacy Study of VM202 in the Treatment of Chronic Non-Healing Foot Ulcers [Электронный ресурс] / Медицинский сайт Clinicaltrials.gov. – 2018. - Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02563522?term=VM202&rank=4>