

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

На правах рукописи

ФЕЙЗИЕВ ЭЛЬВИН ЭЙНУЛЛА ОГЛЫ

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

**«ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕНИЯ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ
КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ ПЛОХОМ ДИСТАЛЬНОМ СОСУДИСТОМ
РУСЛЕ»**

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

Курск - 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Механизмы развития ишемии	18
1.2. Роль неоангиогенеза в адаптации к ишемии.....	19
1.3. Современные методы коррекции критической ишемии нижних конечностей	20
1.4. Перспективы консервативной терапии критической ишемии нижних конечностей	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1. Структура исследования	40
2.2. Материалы и методы клинического исследования (I часть исследования, клиническая).....	40
2.3. Изучение моделирования критической ишемии нижних конечностей у лабораторных животных на доклиническом этапе и влияние на нее исследуемых препаратов в монотерапии и в комбинации (II часть исследования, экспериментальная) (II часть исследования, экспериментальная).....	46
2.3.1. Создание модели критической ишемии нижних конечностей у лабораторных животных	46
2.3.2. Исследование микроциркуляции в мышцах голени крыс посредством лазерной доплеровской флоуметрии.....	48
2.3.3. Методы гистологического исследования	50
2.3.4. Дизайн эксперимента.....	51
2.4. Статистическая обработка результатов исследования.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	56
3.1. Результаты клинического исследования (I часть исследования, клиническая)	56
3.2. Результаты экспериментальной части исследований (II часть исследования)	64
3.2.1. Разработка способа моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных	64

3.1.2. Исследование влияния препаратов уденафил, пентоксифиллин и симвастатин в качестве монотерапии на уровень микроциркуляции и ангиогенез у лабораторных крыс	78
3.1.3. Исследование влияния применения уденафила в комбинации с симвастатином и пентоксифиллином на уровень микроциркуляции и ангиогенез у лабораторных крыс	83
3.1.4. Изучение комбинированного применения уденафила, симвастатина, пентоксифиллина с однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга на уровень микроциркуляции и ангиогенез у лабораторных крыс	88
3.1.4. Изучение комбинированного применения уденафила, симвастатина, пентоксифиллина с однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга на уровень микроциркуляции и ангиогенез у лабораторных крыс	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ.....	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	109
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	125

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИЛ-1 – интерлейкин-1
ИЛ-6 – интерлейкин-6
КИНК – критическая ишемия нижних конечностей
ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия
ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс
МНФ – моноклеарная фракция
МСК – мезенхимальные стволовые клетки
ПСЭК – поясничная симпатэктомия
РИ – реовазографический индекс
РОТ – реваскуляризирующая остетрепанация
СК – стволовые клетки
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
ФДЭ-5 - фосфодиэстераза-5
ФИ – фотоплетизмографический индекс
ФНО-а – фактор некроза опухоли-а
ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей
ЭД – эндотелиальная дисфункция
ЭКГ – электрокардиография
ЭРД – эректильная дисфункция
bFGF – основной фактор роста фибробластов
eNOS – эндотелиальная NO-синтаза
FGF – фактор роста фибробластов
HGF – фактор роста гепатоцитов
RPMI-1640 – среда Roswell Park Memorial Institute medium
NO – оксида азота
TAF – опухолевой сосудистый фактор роста

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

VPF – фактор проницаемости сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Ишемия органов и тканей является важным фактором, играющим роль в патогенезе широкого спектра заболеваний, в том числе сердечно-сосудистой системы. Заболевания данной группы часто бывают причинами инвалидизации населения, в связи с чем исследование методов компенсации ишемии остается важной задачей.

Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) встречается у 2–3% населения России. Около 80–90% случаев вызваны облитерирующим атеросклерозом артериального русла. Отсутствие лечения в 50% случаев приводит к летальному исходу в течение 10 лет после возникновения первых симптомов. Хроническая ишемия является причиной ампутации конечностей более чем у 35000 больных ежегодно [99] [115]. Значимость данного заболевания обусловлена не только большой распространенностью, но и частой инвалидизацией трудоспособного населения, связанной с последствиями данной патологии [124].

Актуальной проблемой является отдаленный прогноз пациентов с хронической ишемией, долгое течение которой в конечном итоге может привести к критической ишемии нижних конечностей (КИНК).

Однако важно понимать, что существует множество причин, приводящих к критической ишемии. Атеросклероз артерий при долгом течении является одной из ведущих причин нарушения кровоснабжения. К другим причинам, приводящим к нарушению кровоснабжения, является тяжелая венозная недостаточность, вызванная тромбозом магистральных вен и приводящая к тотальному нарушению оттока и, как следствие, притока [94].

Создано множество методов, позволяющих восстановить магистральный кровоток при поражении артериального русла. Данные методы включают в себя открытые оперативные вмешательства и эндоваскулярные. К открытым вмешательствам относят стандартные операции, направленные на восстановление кровотока с использованием протеза или нативной вены для проведения шунтирования или протезирования. Эндоваскулярные методы применяются у

большого количества пациентов, поскольку позволяют с помощью малоинвазивных манипуляций восстановить кровоток. К ним относятся балонная ангиопластика, стентирование и другие. Использование упомянутых методов позволяет восстановить кровоток и сохранить конечность у 70-80% пациентов [102].

При тяжелом поражении артериального русла, когда выполнение того или иного оперативного вмешательства сопряжено с рисками низкой эффективности, высокого хирургического риска или невозможности вмешательства, возможно использование иных методов реваскуляризации (реваскуляризирующая остеотрепанация, трансплантация аутологичного костного мозга и один из самых травматичных методов – поясничная симпатэктомия). Невозможность оперативного вмешательства у таких пациентов приводит к тому, что в РФ каждый год производится до 50 тысяч ампутаций нижних конечностей [127]. Это подтверждает необходимость поиска новых методов лечения и профилактики данного заболевания, заставляет искать консервативные методы коррекции данной патологии.

Таким образом, консервативное лечение, применяемое у пациентов с ХИИСК, является перспективным направлением, поскольку позволяет оказывать влияние на артериальный кровоток и стимулировать торможение процессов, связанных с окклюзионным поражением. Отсутствие лечения критической ишемии может в короткие сроки привести к полной потере функции конечности, появлению язвенно-некротических поражений и инвалидизации, приводящей к значительному снижению качества жизни пациентов.

Степень научной новизны темы исследования

Коррекция критической ишемии с использованием консервативной терапии редко бывает достаточно эффективной для того, чтобы не только затормозить процессы ишемии тканей, но и восстановить в определенной степени нормальное их кровоснабжение, несмотря на наличие множества препаратов, способных в той или иной степени влиять на патогенез

ишемических нарушений. Некоторые из существующих препаратов также способствуют стимуляции развития коллатерального кровотока, что в условиях ишемии является жизненно важным для поврежденных тканей [60]. Упомянутые методы имеют определенные ограничения и демонстрируют крайне умеренную эффективность, поскольку восстановление адекватного кровоснабжения без прямой реваскуляризации практически невозможно. Метод консервативного лечения, способный хотя бы частично восстановить адекватный уровень кровоснабжения в условиях хронической ишемии, в настоящее время не найден. В связи с этим важно продолжить поиск препаратов или их комбинаций, применение которых позволит улучшить состояние пациентов с данной патологией.

Применение синтетических простагландинов (илопрост и алпростадил) у пациентов с ХИНК характеризуется эффектами прямой вазодилатации легочного и периферического артериального русла [73]. Их использование позволяет снизить агрегацию тромбоцитов, расширить сосуды микроциркуляторного русла, а также уменьшить воспаление и снизить сосудистую проницаемость. К сожалению, данные препараты не нашли широкого практического применения в связи с высокой стоимостью производства.

Использование статинов в качестве первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых событий позволило значительно улучшить прогноз таких пациентов. Статины характеризуются высоким уровнем эффективности и безопасности, что обуславливает их широкое применение. Статины действуют на одно из главных звеньев патогенеза атеросклероза, а именно на повышенный уровень липопротеидов низкой плотности в крови. Снижение данного показателя уже многие годы считается эффективным методом, позволяющим улучшить исходы лечения. Помимо основного эффекта, исследование статинов позволило также открыть их противовоспалительные свойства. Их использование позволяет снизить уровень главных белков цитокинов воспаления: фактор некроза опухоли-а (ФНО-а), интерлейкин-1

(ИЛ-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и интерлейкин-8 (ИЛ-8). Дальнейшие исследования могут доказать их эффективность при использовании в группе пациентов с хронической артериальной недостаточностью и, возможно, критической ишемией. Учитывая широкий спектр действия препаратов данной группы, польза от их использования несомненна [66].

Применение моноклеарной фракции (МНФ) собственного костного мозга в целях коррекции КИНК мало изучено [1] [55]. Основным методом использования клеток является внутримышечная инъекция в ишемизированные ткани, в том числе в процессе реваскуляризирующей остеотрепанации (РОТ), что в определенной степени позволяет добиться активации неоангиогенеза. Однако у данного метода существуют недостатки: чрезмерная зависимость от дистального русла. В случае его отсутствия терапия будет не эффективной [37]. Важно также понимать, что упомянутый метод в связи с высокой стоимостью и повышенной сложностью применения не получил широкого распространения.

Решением данной проблемы стало появление фармакологических препаратов, созданных с использованием клеток костного мозга. Например, препарат «Миелопид» используется при иммунодефицитных состояниях [103] [90]. Данный препарат получен путем вытяжки из костного мозга телят и может применяться в качестве метода иммуностимуляции. Однако применение данной группы препаратов при ишемии тканей мало изучено, а использование в качестве метода коррекции КИНК также пока не исследовано.

Ингибиторы фосфодиэстеразы-5 (силденафил, уденафил) уже долгое время применяются для коррекции эректильной дисфункции благодаря своим вазодилатирующим свойствам. Дальнейшее их изучение, в частности использование силденафила для коррекции мышечной ишемии позволило получить обнадеживающие результаты [109]. Другой препарат из данной группы, уденафил, в отличие от своего предшественника, обладает меньшим количеством побочных эффектов, в частности не вызывает расстройства зрения [67]. Предстоит более тщательное изучение эффективности данного препарата в целях коррекции ишемических изменений.

Эффект применения пентоксифиллина обусловлен схожим с ингибиторами ФДЭ-5, действием (антагонизм ФДЭ). Данный препарат, помимо своего основного действия, усиливает скопление циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в гладкой мускулатуре сосудистой стенки и других тканях, что приводит к вазодилатации, позволяет снизить сосудистое сопротивление и усилить коллатеральный кровоток [70].

Возможность повышения эффективности препаратов обеих групп может быть достигнута комбинированным их применением, что позволяет сочетать их преимущества и достичь синергичного взаимодействия.

Высокая эффективность применения ингибиторов фосфодиэстеразы-5 в отношении коррекции ишемии тканей, а также отсутствие в настоящее время данных о применении уденафила подчеркивают перспективность исследования данного препарата и вселяет надежду на его потенциальную эффективность. Изучение эффективности уденафила следует провести как в монотерапии, так и в комбинации исследуемого препарата с пентоксифиллином и симвастатином без проведения и с проведением реваскуляризирующей остеотрепанации.

Цель исследования

Изучение эффективности уденафила в качестве монотерапии и в сочетании с пентоксифиллином и симвастатином в целях коррекции ХИНК без проведения и с проведением реваскуляризирующей остеотрепанации.

Задачи исследования

1. Проанализировать клинические результаты лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей с применением непрямых методов реваскуляризации: консервативной терапии, симвастатина и РОТ в различных сочетаниях
2. Создать модель, достоверно имитирующую клиническую картину критической ишемии, схожую с таковой у пациентов при ХИНК с

различными осложнениями. Провести на данной модели исследование динамики клинических признаков данной патологии, показателей микроциркуляции и морфологической картины в течение 90 дней.

3. Модифицировать методику реваскуляризирующей остеотрпанации путем активного забора и последующей имплантации моноклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированные ткани.
4. Оценить влияние применения монотерапии уденафилом, пентоксифиллином и симвастатином на систему микроциркуляции и морфологическую картину у крыс на фоне моделирования КИНК.
5. Оценить эффективность применения уденафила в сочетании с другими препаратами: с пентоксифиллином или симвастатином. Оценить влияние различных комбинаций препаратов на систему микроциркуляции и морфологическую картину у крыс на фоне моделирования КИНК.
6. Оценить эффективность применения уденафила в сочетании с пентоксифиллином и симвастатином и дополнительным проведением инъекции моноклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированные ткани. Оценить влияние консервативной терапии в данной комбинации препаратов в сочетании с реваскуляризирующей остеотрпанацией на систему микроциркуляции и морфологическую картину у крыс на фоне моделирования КИНК.

Научная новизна исследования

В работе впервые показано, что применение симвастатина в дозировке 20 мг в сочетании с реваскуляризирующей остеотрпанацией при КИНК позволяет сохранить пораженную конечность только у 15% пациентов при условии проходимых артерий голени.

Разработана модель, достоверно имитирующая клиническую картину критической ишемии, схожую с таковой у пациентов при ХИНК с различными осложнениями. Полученные результаты позволили воспроизвести такие симптомы, как гангрена конечности, ишемическая нейропатия периферических

нервов и другие, свойственные пациентам с данной патологией. Данный метод заключается в иссечении магистральных артерий, соответствующих им вен (бедренная, подколенная, передняя задняя большеберцовые артерии и вены), а также седалищного нерва.

В работе впервые показано, что уденафил в дозировке 8,6 мг/кг, пентоксифиллин в дозировке 60 мг/кг, симвастатин в дозировке 1,71 мг/кг при интрагастральном введении в качестве монотерапии позволяют в разной степени компенсировать признаки критической ишемии нижних конечностей, что выражается в стимуляции коллатерального кровообращения и развития неоваскулогенеза в ишемизированных тканях, что было продемонстрировано на созданной модели, имитирующей течение КИНК у лабораторных крыс с применением флоуметрии и гистологического исследования.

Впервые было изучено применение комбинации уденафила с симвастатином (в дозировке 0,86 мг/кг каждого препарата 1 раз в сутки в течение 14 дней) и уденафила с пентоксифиллином (в дозировке 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно 1 раз в сутки в течение 14 дней). Впервые было проведено изучение влияния данных комбинаций на созданной модели, имитирующей течение КИНК у лабораторных крыс с применением флоуметрии и гистологического исследования.

Впервые было проведено изучение влияния метода введения мононуклеарной фракции собственного костного мозга в пораженную конечность при лечении КИНК без и в сочетании с консервативной терапией. В работе впервые показано, что комбинация уденафила с симвастатином (в дозировке 0,86 мг/кг каждого препарата 1 раз в сутки в течение 7 дней), уденафила с пентоксифиллином (в дозировке 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно 1 раз в сутки в течение 7 дней) с дополнительной однократной инъекцией мононуклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированную конечность позволяет компенсировать признаки КИНК.

Инъекция производилась по 50 мкл в 4 точки на седьмые сутки после начала эксперимента. В ходе экспериментов были найдены оптимальные места

введения препаратов костного мозга, позволяющие добиться наибольшей эффективности раскрытия коллатерального русла и ускорения процессов неоваскулогенеза. Они включали в себя следующие точки: паравазально в места отхождения латеральной артерии, огибающей бедренную кость и огибающей подвздошную кость поверхностной артерии; в место прикрепления гребенчатой и длинной приводящей мышц бедра (ориентиром является локализация отхождения мышечной ветви бедренной артерии); в область верхней трети икроножной мышцы ишемизированной конечности [104]. Механизмы компенсации ишемии включаются в среднем на 7 сутки после начала процесса, данного срока достаточно для мобилизации всех компенсаторных резервов. Дальнейшая компенсация может происходить только воздействием извне.

Результаты, полученные путем проведения лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) после окончания эксперимента, были также подтверждены при помощи морфологического исследования: было зафиксировано отсутствие очагов некротических изменений и усиление процессов неоваскулогенеза в ишемизированных тканях.

Получено 5 патентов РФ на изобретения по результатам проведенных экспериментальных исследований:

- Способ моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных-крыс [116]
- Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы симвастатином [120].
- Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина и уденафила [118].
- Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина и моноклеарной фракцией собственного костного мозга [117].

- Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина, уденафила и моноклеарной фракцией собственного костного мозга [119].

Теоретическая и практическая значимость исследования

Обосновано применение модели хронической ишемии, позволяющей воспроизвести осложнения, возникающие при критической ишемии (гангрена конечности, ишемическая нейропатия периферических нервов и другие) у лабораторных животных.

Обоснован метод улучшения коллатерального кровотока и ускорения процессов неоваскулогенеза в ишемизированных тканях путем забора и дальнейшего введения моноклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированную конечность.

В работе обоснована эффективность применения комбинация препаратов (уденафила и симвастатина в дозировке каждого препарата в объеме 0,86 мг/кг; уденафила с пентоксифиллином в дозировке 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно) с дополнительной однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга на седьмые сутки после начала явлений ишемии. Такая комбинация позволяет снизить частоту использования препаратов до 7 дней (1 раз в сутки), и уменьшить их дозировку, что снижает частоту возникновения побочных эффектов, а также достичь максимального ответа на проводимое лечение.

Полученные данные позволяют рекомендовать дальнейшее проведение клинических испытаний данных препаратов с их применением при КИНК.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Консервативное лечение КИНК с применением симвастатина в дозировке 20 мг в сочетании с РОТ позволяет сохранить пораженную конечность только у 15% пациентов при условии проходимость артерий голени

2. Разработанный способ введения моонуклеарной фракции собственного костного мозга способствует неоваскулогенезу в ишемизированных тканях и активизирует коллатеральное кровообращение путем вовлечения в кровоток незадействованных сосудов и улучшения притока крови, что было продемонстрировано на созданной модели имитации критической ишемии у лабораторных крыс.
3. Разработана модель, имитирующая КИНК у лабораторных животных, которая позволила бы получить классические проявления таковой у пациентов, имеющих такие осложнения, как гангрена конечности, ишемическая нейропатия периферических нервов и иные язвенно-некротические изменения. Данный метод заключается в иссечении магистральных артерий, соответствующих им вен (бедренная, подколенная, передняя задняя большеберцовые артерии и вены), а также седалищного нерва.
4. Использование таких препаратов, как уденафил в дозировке 8,6 мг/кг, пентоксифиллин в дозировке 60 мг/кг, симвастатин в дозировке 1,71 мг/кг, при интрагастральном введении в качестве монотерапии позволяют в разной степени компенсировать признаки критической ишемии нижних конечностей, что выражается в стимуляции коллатерального кровообращения и развития неоваскулогенеза в ишемизированных тканях, что было продемонстрировано на созданной модели имитации критической ишемии у лабораторных крыс.
5. Использование уденафила с симвастатином (в дозировке 0,86 мг/кг каждого препарата 1 раз в сутки в течение 7 дней), уденафила с пентоксифиллином (в дозировке 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно 1 раз в сутки в течение 7 дней) с дополнительной однократной инъекцией моонуклеарной фракции собственного костного мозга на седьмые сутки после начала явлений ишемии в пораженную конечность позволяет компенсировать признаки КИНК. Такая комбинация позволяет снизить частоту использования препаратов до 7 дней (1 раз в сутки), и уменьшить их дозировку, что

снижает частоту возникновения побочных эффектов, а также достичь максимального ответа на проводимое лечение, что было продемонстрировано на созданной модели имитации критической ишемии у лабораторных крыс.

Степень достоверности и апробация результатов диссертации

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

Публикации результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 7 в изданиях, рекомендуемых ВАК, из которых 1 с индексацией в базе Scopus. По материалам диссертационной работы получено 5 патентов на изобретение.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно проводил следующий объем работы: поиск посвященной данной тематике литературы, составление обзора литературы, инструментальные исследования с дальнейшей регистрацией, обработкой и анализом полученной информации, статистическая обработка и интерпретация полученных данных, составление графиков, таблиц, иллюстраций, планирование и проведение оперативных вмешательств на животных с забором биологических тканей.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения соответствуют формуле специальности 3.1.15 - «Сердечно-сосудистая хирургия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности – теоретическая, экспериментальная и клиническая разработка хирургических, в том числе и альтернативных, методов лечения патологии сердца и сосудов.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 132 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемых сокращений и указателя литературы, содержащего ссылки на отечественные – 66 и зарубежные – 63 литературные источники. Текст проиллюстрирован 19 таблицами и 31 рисунками, включающими диаграммы, схемы, микрофотографии.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механизмы развития ишемии

Любое хирургическое вмешательство в определенной степени содействует развитию локальной ишемии, что запускает ряд патологических процессов, интенсивность которых усиливается по мере того, как возрастает длительность нарушения местного кровообращения [93]. Синтез аденозинтрифосфата (АТФ) в митохондриях, требующий кислорода, прекращается, что влечет за собой резкое понижение уровня креатинфосфата и АТФ [112]. Нарушение нормальной функции эндотелия сосудистой стенки вследствие ишемии приводит к нарушению процессов газообмена и вазоконстрикции в ответ на снижение содержания кислорода в [87] [78]. Выброс поврежденными клетками медиаторов приводит к агрегации нейтрофилов/тромбоцитов, что только усугубляет состояние тканей. Возникшая ишемия может привести к необратимым изменениям тканей и, в конечном итоге, к гибели клетки. Изучение процессов ишемического повреждения позволило обнаружить и защитные механизмы, ограничивающие повреждающее действие воспалительных медиаторов.

Выделяют несколько видов механизма ишемии. Одним из таких механизмов является нейрогенный, включающий нейротонический и нейропаралитический. Нейротонический механизм возникает вследствие активации и доминирования симпатической нервной системы и ее влияния на стенки. Данный процесс характеризуется выделением больших объемов норадреналина и возникает при различных вариантах стресса и воздействии на ткани, следствием чего является повышение реактивности стенок артериол.

Угнетение действия парасимпатической нервной системы и ее эффектов на стенки артериол приводит к нейропаралитической ишемии. Предпосылкой к данным процессам считается торможение или же блокада проведения по парасимпатическим волокнам нервных импульсов, что может наблюдаться при

механических травмах или пересечении парасимпатических нервных окончаний и по многим другим причинам.

Повышение уровня вазоконстрикторов (АДФ, ангиотензин II, адреналин, тромбоксан A₂, простогландин F), чувствительности стенок артериол к данным медиаторам, и увеличение ионов Na⁺ или Ca²⁺ в тканях приводит к гуморальной ишемии.

Наличие на пути артериального кровотока препятствия (например, при компрессии сосуда рубцом, опухолевидным образованием, сдавливающим сосуда отеке ткани или уменьшении просвета сосуда/его полной обструкции, при тромбозе или эмболии) является причиной механического генеза. Критическая ишемия также возникает в связи с резким прекращением адекватного кровотока, к которому организм не адаптировался, механический генез ишемии играет главную роль в этом процессе.

1.2. Роль неоангиогенеза в адаптации к ишемии

Сложный процесс ангиогенеза активируется при различных травмах или гипоксии и воспалении и необходим для формирования новых кровеносных сосудов. [64]. Данный процесс может происходить как в норме, например, в эндометрии или заживлении ран, так и при патологических состояниях [76].

Взаимодействие факторов, стимулирующих и подавляющих процессы ангиогенеза, позволяет регулировать данный процесс. Существует множество факторов активации неоваскулогенеза. Лабораторные исследования различных тканей и опухолевых процессов, где явление ангиогенеза происходит особенно агрессивно, позволили выявить такие медиаторы, как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), сосудистый фактор проницаемости (VPF), эпидермальный фактор роста (EDGF) и другие (около 20 веществ). Выделяют около 30 факторов, ингибирующих ангиогенез и включающих в себя антиангиогенный антитромбин III, ангиостатин, эндостатин, гепариназа, интерлейкин-12, фрагменты фибронектинавазостатин и некоторые другие [114].

Главную роль в механизме ангиогенеза играет пролиферация и миграция клеток эндотелия. Эндотелиальные клетки выпускают длинные тонкие псевдоподии, которые в дальнейшем формируют массивный отросток, который продолжает удлиняться до момента, пока не столкнется со стенкой другого капилляра. Данный процесс оканчивается появлением нового пути в микроциркуляторном русле [32].

Использование ангиогенеза в качестве метода лечения изучалось в некоторых экспериментальных работах, где были использованы рекомбинантные ангиогенные факторы роста (FGF-1, VEGF165, FGF-2) и их гены (FGF-5, VEGF121, VEGF165 и VEGF189). Распространение получил сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), действие которого характеризуется высокой эффективностью и сопутствующим повышением сосудистой проницаемости [65]. Все эксперименты, посвященные использованию факторов роста и их генов-предшественников в качестве препаратов, стимулирующих ангиогенез, демонстрировали развитие коллатералей и новых капилляров. Однократное введение гена заменяло многократные инъекции факторов роста, что демонстрирует возможность их применения для коррекции ишемической болезни сердца и ХИИК [77].

1.3. Современные методы коррекции критической ишемии нижних конечностей

Хроническая ишемия нижних конечностей, как уже было сказано ранее, является заболеванием, наиболее связанным с возрастом, и редко встречается у пациентов до 50 лет в случае отсутствия воспалительных заболеваний, поражающих артериальное русло [27]. Выявленные данные позволяют смело заявлять о том, что данное заболевание более характерно для мужского пола, хотя следует отметить, что среди более старших возрастных групп мужчин и женщин данное соотношение в некоторой степени уравнивается. Стоит отметить, что явление атеросклеротического поражения периферического русла

практически никогда не встречается только в одном месте, поэтому у пациентов с тяжелым поражением артерий нижних конечностей также важно проводить скрининг на выявление иных локализаций патологического процесса.

Факторы риска, вызывающие повреждение периферического артериального русла, совпадают с таковыми при ишемической болезни сердца, их роль в патологическом процессе очевидна. Курение напрямую влияет на клиническое течение заболевания, эффект дозозависимый - чем больше индекс курильщика, тем тяжелее ожидаемое поражение артериального русла. Одним из самых важных этапов является коррекция модифицируемых факторов риска, а именно полное прекращение или, если пациент не готов отказаться от привычки, снижение количества выкуренных сигарет [19].

Другим фактором риска, напрямую влияющим на течение заболевания, является сахарный диабет. Высокий уровень глюкозы крови приводит к повреждению эндотелия и нарушению его функции, особенно на поздних стадиях заболевания. Помимо его влияния на течение заболевания, диабет также влияет и на течение самого лечения, порой ухудшая прогнозы пациента после реконструктивных вмешательств и реваскуляризирующих операций.

Артериальная гипертензия, особенно без должного медикаментозного лечения, также повреждает сосуды за счет пагубного действия высокого уровня артериального давления. Однако несомненной является роль уровня липопротеидов различных классов: высокой (ЛПВП) и низкой плотности (ЛПНП). У пациентов с тяжелым течением хронической ишемии выявляется высокий уровень ЛПНП и низкий уровень ЛПВП, в связи с чем таким пациентам часто назначаются статины для компенсации высокого уровня липидов, что позволяет затормозить течение заболевания и улучшить прогноз таких пациентов. Иными причинами для гиперлипидемии являются наследственные заболевания, приводящие к более скорому образованию атеросклеротических бляшек и, таким образом, снижению адекватной перфузии тканей и органов.

Остальные факторы, ведущие к развитию хронической ишемии, включают в себя повышенный уровень С-реактивного белка, ожирение, употребление алкоголя, а также уровень гомоцистеина крови [43]. Увеличение уровня С-реактивного белка было зафиксировано у пациентов с ХИНК, хотя по мнению некоторых авторов, данное повышение является лишь следствием хронического воспалительного процесса, протекающего в стенках артерий.

Хроническую ишемию нижних конечностей достаточно просто выявить при проведении пальпации магистральных артерий (отсутствие пульса) или значительное снижение лодыжечно-плечевого индекса. Даже в случае отсутствия жалоб важно понимать, что такие пациенты находятся в зоне риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний.

Основным симптомом, который характеризует течение данного заболевания, является перемежающаяся хромота, которая точно демонстрирует степень компенсации кровотока в момент исследования: чем меньше расстояние, которое способен пройти пациент без возникновения болевого синдрома, тем сильнее страдает микроциркуляторное русло и тяжелее поражены магистральные артерии. Болевой синдром, как правило, возникает в икрах в связи с более частым поражением дистальных артерий. В случае более проксимального поражения, включающего в себя подвздошные артерии, симптом перемежающейся хромоты может обнаруживаться и проксимальнее. Более тяжелое течение характеризуется появлением боли в покое, потерей адекватного функционирования конечности и появлением язвенно-некротических осложнений, включая гангрену и изъязвления, которые в случае поражения артериального русла крайне болезненны. В случае отсутствия болевых ощущений важно понимать, что от гипоксии страдают не только мышечные ткани, но и нервные стволы, что должно наводить на мысли о ишемической нейропатии и далеко зашедшем процессе ишемии.

Самым опасным явлением в течении хронической ишемии является ее переход в критическую, приводящую к молниеносному появлению болевых

ощущений, ишемическому отеку, потере чувствительности, контрактуре и, как следствие, ампутации конечности.

Основным методом улучшения кровоснабжения является выполнение реваскуляризирующего вмешательства [75]. В клиническую практику в целях коррекции данной патологии были введены шунтирующие и эндоваскулярные методы реваскуляризации артерий нижних конечностей [108]. Метод шунтирования позволил эффективно решать проблемы острой и хронической ишемии нижних конечностей. Однако, высокая травматичность этих операций не всегда позволяет выполнить реваскуляризацию в необходимом объеме, а повторные операции в случае окклюзии шунтов или прогрессировании атеросклероза чреваты осложнениями [107]. Баллонная ангиопластика и стентирование артерий нижних конечностей лишены этих недостатков. Эндоваскулярные технологии позволяют малотравматично и многократно выполнять реваскуляризацию артериального русла, однако эта технология не лишена недостатков. Среди недостатков можно отметить возможность рестеноза, сложности выполнения операций при протяженных окклюзиях или диффузном поражении артерий. Эти факторы также ограничивают применение эндоваскулярных методов [125].

Несмотря на появление и развитие различных методов реваскуляризации конечностей, их выполнение часто бывает ограничено. Явление критической ишемии часто обусловлено тяжелым поражением периферического русла, ведущего к дефициту капиллярного кровотока, что характеризуется гипоксией тканей с постепенным прогрессированием данного заболевания до язвенно-некротических поражений и потери конечности [68].

Невозможность адекватно восстановить кровоток при использовании реваскуляризирующих операций вследствие тяжелого поражения дистального русла привела к появлению альтернативных путей реваскуляризации, направленных на стимуляцию развития коллатерального кровотока [95]. Помимо метода поясничной симпатэктомии (ПСЭК), существующей вот уже более 80 лет, был создан новый метод, названный реваскуляризирующей

остеотрепанацией (РОТ), используемая в целях раскрытия и улучшения функции коллатерального кровотока [88].

Данный метод показан пациентам с поражением дистального русла, когда выполнение реваскуляризирующего вмешательства невозможно. Определенная эффективность данного метода была продемонстрирована авторами у пациентов II Б и III стадиями заболевания [88]. Следует отметить, что метод РОТ с момента создания претерпел определенные изменения, что позволило сделать его более безопасным и эффективным. Появление нового метода лазерной остеотрепанации с использованием современных технологий позволило добиться положительного эффекта в 65,5%. Некоторые работы, посвященные комбинированному использованию профундопластики и остеотрепанации, позволили добиться положительных результатов и в отдаленные сроки наблюдения, что может быть связано с отсроченным эффектом РОТ, нарастающим спустя 1-5 лет наблюдения [122].

Не существует в настоящее время единого мнения об эффективности проведения поясничной симпатэктомии (ПСЭК) в связи с достаточно разнообразными полученными результатами (сохранение конечности в 25-87% случаев) [81]. Не сложилось единого мнения о том, у какой когорты пациентов может быть выполнена ПСЭК, поскольку высокая травматичность метода, осложнения от травматичного доступа и увеличение сроков госпитализации диктуют необходимость более тщательно подбирать пациентов в случаях, когда невозможны другие вмешательства.

У методов, направленных на косвенное улучшение клинической картины пациентов с тяжелой ишемией нижних конечностей, отсутствуют четкие критерии применения в тех или иных клинических случаях. Методы непрямого реваскуляризации могут привести к развитию послеоперационных осложнений при отсутствии необходимого эффекта, а их выбор в зависимости от особенностей поражения остается на усмотрение врача. Упомянутые факторы способствуют увеличению продолжительности лечения и ухудшают прогноз пациента [122]. В связи с этим показания к применению не прямых методов

реваскуляризации требует доработки, а для повышения эффективности необходимо изучить данные методы в сочетании со стимулирующими ангиогенез факторами.

У пациентов с КИНК в случае невозможности или неэффективности методов реваскуляризации консервативная терапия остается единственным доступным методом для сохранения конечности, однако данный метод малоэффективен: около 1/3 пациентов теряет пораженную конечность [96] [113] [34] [30].

Выживаемость пациентов после ампутации зависит напрямую от уровня произведенного вмешательства, а смертность остается главным осложнением проведенного лечения. При ампутации на уровне голени ранняя летальность составляет 5-10% (годовая выживаемость составляет всего 30%), на уровне бедра уже 15-20% в связи с тяжелой кровопотерей. До 40% пациентов погибает спустя 5 лет после вмешательства, а язвенно-некротические осложнения или гангрена конечности увеличивают процент летальности [12].

Продолжается исследование не прямых методов реваскуляризации при ишемии нижних конечностей. В экспериментальных моделях КИНК для стимуляции неоваскулогенеза были проведены попытки использования различных типов клеток для достижения наибольшей эффективности [48] [35]. Наиболее часто применяются мезенхимальные и гемопоэтические стволовые клетки [14] [2]. В ходе экспериментов было продемонстрировано улучшение процессов микроциркуляции после внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и непосредственной их инъекции в ишемизированную конечность лабораторной мыши.

Неоваскулогенез является результатом сложного процесса, в котором участвуют предшественники эндотелиоцитов (ПЭ), обычно располагающиеся в строме костного мозга, а наличие в стенке сосудов клеток-предшественников эндотелия позволяет производить обновление сосуда в течение всей жизни [35] [20]. Использование методов стимуляции неоваскулогенеза может быть рассмотрено как одна из стратегий спасения конечности пациента при

критической ишемии, поскольку восстановление кровотока может позволить не только быстрее регенерировать поврежденным участкам, но и сохранить еще живую ткань. Снижение поступления кислорода в ткани приводит к мобилизации предшественников эндотелиальных клеток, что обеспечивает образование новых сосудов микроциркуляторного русла и улучшение кровоснабжения [63] [7]. Проведенные исследования в том числе продемонстрировали, что клетки костного мозга занимают важное место в процессах неоваскулогенеза и при заживлении ран, и при ишемии нижних конечностей, а также эндотелизации сосудистых протезов и атеросклерозе [46]. Искусственное внедрение подобных клеток позволяет ускорить образование сосудистой сети и снизить длительность гипоксии. Именно поэтому в настоящее время изучаются факторы, способные ускорить процессы неоваскулогенеза, что может получить крайне широкое применение в медицине [83] [22]. Патологический процесс в некоторых клинических случаях может быть обусловлен недостаточной стимуляцией или отсутствием необходимого количества клеток-предшественников, что негативно сказывается на скорости компенсации патологического процесса и снижает степень восстановления кровотока.

Возможности компенсации кровотока в условиях ишемии во много определяются наличием коллатеральных сосудов, в норме не участвующих в процессах кровоснабжения и вовлекающихся в данный процесс только при условиях повышенной нагрузки или в случае репарации поврежденных тканей, что позволяет добиться соответствующего потребности объема оксигенированной крови [71] [97] [15]. Также данный механизм, согласно ряду мнений, работает и в условиях ишемии, однако работ, посвященных исследованию данного механизма, в настоящее время нет.

Процесс регенерации поврежденных тканей начинается с местного воспаления, стимулирующего миграцию клеток [54]. Стволовые клетки (СК) при этом оказывают локальное иммуносупрессивное и противовоспалительное действие, что позволяет добиться правильного баланса про- и

противовоспалительных процессов в поврежденной мышечной ткани [72] [61]. С учетом особенностей действия плюрипотентных клеток и их влияния на процессы воспаления, важно определить четкие показания к их применению у пациентов с КИНК, проводя необходимы для этого исследования. Существуют некоторые опасения, связанные с невозможностью напрямую контролировать эффекты СК, что может привести к васкуляризации не только некротизированных тканей, но и атеросклеротических бляшек, а их эффект усиления адгезии клеток может вызвать образование тромбоза, что еще больше ухудшит клиническую картину [36] [11].

По современным данным, процессы репарации поврежденных тканей осуществляются путем встраивания плюрипотентных клеток и паракринным выделением ими медиаторов [62]. Однако возможность использования стволовых клеток на практике так и не была доказана, несмотря на их способность мигрировать в очаг поражения, дальнейшей пролиферации и выделению паракринных веществ, способствующих процессам репарации [69].

Изучение механизмов неоваскулогенеза позволило лучше понимать процесс неоваскулогенеза и роль мигрирующих из костного мозга эндотелиальных клеток-предшественников в формировании микрососудов [22]. Чем тяжелее ишемия, тем больше ее медиаторов выделяется в кровоток, что приводит к увеличению в крови клеток-предшественников, путешествующих в зоны ишемии [8]. Из данного открытия был сделан вывод о возможности применения этих клеток в целях стимуляции ангиогенеза.

Использование аутологичных стволовых клеток костного мозга уменьшает риск иммунного ответа, в отличие от генной или пептидной терапии. Такие клетки обладают собственным уровнем экспрессии генов и синтеза необходимых факторов, улучшающих кровоснабжение в зоне ишемии [126].

Важно понимать, что выделение необходимой фракции стволовых клеток является крайне затратным и в настоящее время не может быть широко распространено. Подобные клетки встречаются также в моноклеарной

фракции костного мозга, а введение их в зону ишемии позволяет в определенной степени улучшить перфузию тканей [15]. Свидетельства происхождения кардиомиоцитов и клеток сосудов из клеток костного мозга позволяют изучать его роль как источника клеток для возможного проведения терапии. Следует понимать, что основной объем СК у взрослого человека располагается в красном костном мозге, однако его количество ограничено [85]. В целях увеличения концентрации клеток, необходимых для введения, используется методика получения МНФ [29].

Следует отметить, что существующие данные по применению МНФ клеток костного мозга позволили продемонстрировать их распределение при различных путях введения [69] [56]. Непосредственное введение меченых радиоактивным изотопом клеток напрямую в сердце лабораторных животных после воспроизведения инфаркта позволило обнаружить 11% клеток спустя час, но при произведенной инфузии в коронарную артерию только 2-3% [40].

Проведенные аналогичным методом исследования в поперечнополосатой мышечной ткани голени мышей позволили выявить, что сохранность полученных из жировой ткани мезенхимальных стволовых клеток после их введения составляла уже около 50-70% через 1 сутки, в отличие от введения в миокард, и уже 5-10% через 1 неделю [69]. Однако существенных различий в данных показателях в зависимости от уровня кровотока тканей выявлено не было, что диктует необходимость применения СК непосредственно в пораженной конечности.

Использование МНФ клеток представляется более эффективным и безопасным методом, поскольку также позволяет ускорить процессы репарации поврежденных тканей, а клетки данного ряда являются более высокодифференцированными, что делает их менее склонными к онкологическим процессам [15]. Упомянутые характеристики делают перспективным дальнейшее изучение данной фракции клеток и ее клиническое применение.

Ретромбоз бедренно-подколенного сегмента после проведенной реваскуляризации происходит чаще (до 8 – 10 раз), чем операции на артериях более крупного калибра (аорто-подвздошный сегмент) [110]. Наиболее частой причиной является тяжелое поражение дистальное русло, приводящее в конечном итоге к ампутации [80] [129].

Изучение методов стимуляции ангиогенеза начало формироваться благодаря работам, посвященным изучению данного процесса в онкологических заболеваниях. Было выявлено, что агрессивный рост сосудистого русла в быстро развивающихся опухолях возможно благодаря выделяемому низкодифференцированными клетками фактора, ответственного за образование и рост сосудов (tumor angiogenesis factor (TAF) .

«Фактор проницаемости сосудов» - vascular permeability factor (VPF) был обнаружен позже в ходе дальнейшего исследования опухолевых процессов. Его роль в нормальных тканях не была очевидна, поскольку его впервые выделили из тканей опухоли. Однако ген, отвечающий за кодировку данного фактора, также кодирует «сосудистый эндотелиальный фактор роста» – vascular endothelial growth factor (VEGF), получаемый путем альтернативного сплайсинга синтезированной последовательности аминокислот [47]. VEGF ускоряет рост эндотелиальных клеток и играет роль митогена, при этом демонстрируя свою способность связываться с гепарином. Важно отметить, что проведенные исследования выявили синергический эффект, вызванный как участием VEGF, так и bFGF, что позволяет активизировать процессы пролиферации и дифференцировки эндотелиоцитов, однако самостоятельно bFGF подобных эффектов не вызывает. В дальнейшем это наблюдение было использовано при разработке генетических методов ангиогенеза, сочетающих нескольких проангиогенных факторов в одном гене.

Существуют два основных метода доставки генетического материала: с помощью вируса и невирусные [97]. Использование вирусов сопряжено с определенными сложностями, а метод невирусной доставки с использованием плазмид позволяет добиться необходимого результата [53]. Разработанные

методы доставки осуществляются с использованием электропорации, микропорации и других методов, что позволяет достичь до 80 – 90% клеток. В дальнейшем данный метод может быть заменен на более совершенный, метод генно-клеточной терапии, с трансплантацией генно-модифицированных в лабораторных условиях клеток [111]. Успехи доклинического этапа применения сосудистого эндотелиального фактора роста, позволили приступить непосредственно к клиническим испытаниям [86].

Препарат «Неоваскулген», который представляет собой высокоочищенную сверхскрученную форму плазмиды pCMV-VEGF165, и производится в виде стерильного лиофилизата в объеме 1,2 мг, способен стимулировать пролиферацию эндотелиальных клеток и, таким образом, обеспечить рост кровеносных сосудов [91]. Данные об эффективности данного препарата были получены при проведении экспериментов на мышах. Препарат не обладает побочными свойствами и не влияет на внутренние органы, не имеет эмбриотоксических, канцерогенных и мутагенных свойств (при исследовании на крысах). Препарат предназначен для внутримышечного введения 2 раза по 1,2 мг с интервалом в 2 недели. Результаты доклинического исследования позволили перейти к стадии клинических испытаний лечения пациентов с ишемическим поражением с использованием данного препарата. [128]

Существуют определенные опасения, касающиеся применения препаратов, способных ускорять неоангиогенез, связанные с возможной стимуляцией опухолевых процессов, диабетической ретинопатии или васкуляризации атеросклеротических бляшек вследствие их использования. Полученные данные, однако, продемонстрировали отсутствие эффекта ангиогенной терапии на данные процессы. Результаты проведенного метаанализа данных 1000 пациентов продемонстрировали одинаковую частоту развития заболеваний при использовании VEGF, фактора, который также является одним из ключевых в патогенезе многих заболеваний, как в основной группе, так и в группе плацебо [59].

Более того, полученные от применения препарата «Неоваскулоген» результаты показали достоверное улучшение состояния пациентов, в результате применения в стандартной дозировке. Наибольший прирост показателей наблюдался в течение 1 года наблюдения, но дальнейшая эффективность демонстрировалась на протяжении всего 3-х летнего периода наблюдения. Применение стандартной консервативной терапии снижением дистанции безболевой ходьбы на 27% и ухудшением клинической картины в конце периода 3-х летнего наблюдения. Полученные данные позволили доказать, что в дополнение к стандартной консервативной терапии у пациентов с ХИНК II – III стадии стимуляция позволяет улучшить состояние ишемизированных тканей и предотвратить прогрессирование заболевания, чего не было зарегистрировано в группе контроля [121].

Важно отметить, что данные, полученные при применении различных факторов роста, отличаются. Например, применение эндотелиального фактора роста, несмотря на улучшение показателей микроциркуляторного русла, не демонстрирует перемен в значениях лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) в течение всего срока наблюдения, что объясняется полной окклюзией сосудов нижних конечностей. Однако использование плазмиды с геном «фактора роста гепатоцитов» – hepatocyte growth factor (HGF), способствовало росту данного показателя, хотя причины такого результата до конца не ясны [44] [37].

Анализ полученных данных позволил сделать выводы об эффективности данного метода, в частности у пациентов с ХИНК. Использование данной методики совместно с консервативной терапией или реваскуляризирующей операцией позволяет улучшить исходы лечения [82]. Как было отмечено ранее, существующие методы доказали не только свою эффективность, но и безопасность: не выявлено осложнений или онкогенного действия данной терапии [84]. Препятствием на пути повсеместного использования генно-инженерных методов стала высокая стоимость такого метода, что делает его недоступным для широкого применения.

1.4. Перспективы консервативной терапии критической ишемии нижних конечностей

Эндотелий сосудов является основной мишенью атеросклеротических процессов. Факторы риска приводят к тому, что липиды, в норме не остающиеся в стенке сосуда, накапливаются в его толще и постепенно вызывают атеросклеротическим изменения [50].

Одним из факторов, ведущих к нарушению правильной функции эндотелия, является угнетение функции NO-синтазы [58]. При изучении влияния статинов было выявлено, что они повышают активность данного фермента путем стабилизации мРНК. Полученные данные подтвердили их влияние и на посттранскрипционные механизмы, что также стимулирует экспрессию упомянутого фермента. Другим механизмом усиления экспрессии данного фермента стала способность симвастатина быстрой активации в эндотелиальных клетках протеинкина, фосфорилирующей эндотелиальную NO-синтазу, что приводит к повышению ее активности и стимулирования синтеза NO [28]. Еще одним механизмом, стимулирующим продукцию NO, стала возможность статинов подавлять экспрессию генов кавеолина-1, снижающего активность NO-синтазы, непосредственно связываясь с ней [3]. Интересна способность аторвастатина в относительно низких дозах (концентрация 0,01 мкмоль/л) ингибировать значительный объем синтеза кавеолина-1, но концентрация препарата, стимулирующая экспрессию генов эндотелиальной NO-синтазы, существенно больше (10 мкмоль/л). Стоит отметить, что механизм действия аторвастатина на кавеолин-1 обусловлен не уровнем холестерина в крови, но внутриклеточным синтезом последнего, данный эффект также зависит от типа эндотелия. Также в ходе экспериментов было выявлено, что аторвастатин способен усиливать взаимодействие между протеинкиназой, белками теплового шока (Hsp90) и эндотелиальной NO-синтазой, что необходимо для функционирования последней [31] [89].

Кроме описанного влияния на синтез оксида NO, в экспериментах с модулируемой гиперхолестеринемией, была продемонстрирована

эффективность симвастатина, как препарата, оказывающего положительное действие на эндотелий. Таким образом, применение симвастатина позволяет улучшить функционирование эндотелия вне зависимости от уровня холестерина пациента, и даже в условиях гиперхолестеринемии. Схожие данные были получены при исследовании эффектов такого препарата из класса статинов, как правастатин. При проведении других опытов на обезьянах с моделируемой гиперхолестеринемией также были получены результаты, доказывающие положительное влияние препарата на функцию эндотелия вне зависимости от уровня липопротеидов [10] .

Полученные данные привели к появлению более глубокого анализа различных плеiotропных эффектов статинов, в частности их использования в профилактических целях. В ходе экспериментов было выявлено, что профилактическое назначение статинов усиливает церебральный кровоток и неврологические функции у лабораторных животных. Другие экспериментальные исследования на культурах человеческих клеток и на животных повторно подтвердили способность статинов самостоятельно увеличивать активность эндотелиальной NO-синтазы эндотелия вне зависимости от уровня липопротеидов. Были исследованы возможности применения статинов при церебральном инфаркте, где было выявлено, что использование статинов также позволяет уменьшить его зону благодаря улучшению кровоснабжения вследствие стимуляции NO-синтазы. Данный фермент, помимо свойственного ему эффекта вазодилатации, также обладает кардиопротективным действием в условиях ишемии миокарда.

Эндотелин является основным антагонистом NO и обладает вазоконстрикторными свойствами. Повышение уровня данного медиатора было выявлено у лиц с выраженным атеросклеротическим поражением и сопутствующей эндотелиальной дисфункцией (ЭД) артерий сердца. Участие эндотелина в процессах атерогенеза было доказано путем экспериментов с применением блокаторов эндотелиновых рецепторов, которое привело к замедлению развития эндотелиальной дисфункции как в случае сопутствующей

артериальной гипертензией, так и при гиперхолестеринемии у лабораторных животных. Использование блокаторов эндотелина-1 также позволило подавить процессы атерогенеза у лабораторных мышей с дефектом гена ApoE или с отсутствием рецепторов к липопротеидам низкой плотности (ЛПНП). Важно учитывать способность NO ингибировать продукцию эндотелина-1 клетками эндотелия, что также может явиться следствием применения статинов вследствие активации ими NO-синтазы и их косвенным эффектом. Полученная информация свидетельствует о возможности применения статинов у пациентов с заболеваниями, прогрессирование которых связано с повышенным уровнем эндотелина-1 [42].

Пентоксифиллин долгое время оставался основным препаратом, используемым в консервативной терапии пациентов с ХИНК. По данным существующих исследований, этот препарат обладает плеiotропным действием, направленным на угнетение процессов воспаления за счет угнетения активации нейтрофилов, уменьшение вязкости крови, снижение уровня фибриногена и усиление фибринолиза, а также снижение степени агрегации тромбоцитов и эритроцитов [33]. Эти и многие другие эффекты позволяют также улучшить прохождение нейтрофилов в сосудах микроциркуляторного русла, что способствует снижению градиента давления, который является следствием стенозирующего атеросклероза. Учитывая вышеупомянутые эффекты, пентоксифиллин позволяет улучшить прохождение кровотока в капиллярном русле и корректировать ишемию мышечной ткани, особенно в тканях, расположенных дистальнее локализации стеноза [74].

Обзор имеющихся данных также свидетельствует о наличии у пентоксифиллина таких положительных эффектов, как замедление роста атеросклеротических бляшек, их стабилизация, улучшение исходов сосудистых событий и уменьшение их риска, уменьшение системного воспалительного ответа, связанного с проведением операции с использованием аппарата искусственного кровообращения и другие. Важным дополнением, позволяющим расширить использование пентоксифиллина является его

способность корректировать ишемию мышечной ткани, что позволяет в некоторой степени улучшить симптоматику стенокардии и перемежающей хромоты и улучшить кровообращение в ишемизированных тканях.

Пентоксифиллин также угнетает активацию нейтрофилов и снижает уровень повреждающих кислородных радикалов, оказывая таким образом противовоспалительный и антиоксидантный эффект. Полученные в ходе исследований данные демонстрируют снижение уровня провоспалительных цитокинов под действием пентоксифиллина, в частности, ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-6. Интерлейкин-6, как известно, провоцирует усиление синтеза фибриногена клетками печени, в связи с чем угнетение выделения ИЛ-6 в плазму крови при приеме пентоксифиллина также опосредованно снижает содержание фибриногена в кровотоке.

Экспериментальные работы, проведенные на лабораторных животных, подтвердили возможность пентоксифиллина подавлять развитие атеросклероза при гиперхолестеринемии: пероральное применение препарата в дозе 40 мг/кг у кроликов, принимающих богатую холестерином пищу, позволило уменьшить площадь атеросклеротической бляшки аорты на 38% [38]. При этом также отмечалось угнетение скопления нейтрофилов в атеросклеротических бляшках, что может быть вызвано противовоспалительным действием пентоксифиллина.

При исследовании, проведенном на подростках с сахарным диабетом 1-типа в течение 6 месяцев, было выявлено, что пентоксифиллин способен снизить толщину комплекса интима-медия в общей сонной артерии, при этом данный показатель незначительно повышался в группе плацебо [4]. Противовоспалительный эффект пентоксифиллина вновь был выявлен при проведении рандомизированного плацебо-контролируемого исследования у пациентов с острым коронарным синдромом у пациентов с ИБС. Применение препарата в стандартной дозировке 400 мг 3 раза в день позволило снизить более чем в 2,5 раза частоту достижения основной группой конечной комбинированной точки (повторная госпитализация, нефатальный инфаркт, смерть) по сравнению с группой контроля. Проведенный анализ также выявил

снижение уровня ФНО- α и С-реактивного белка в сыворотке крови при приеме пентоксифиллина [16].

Изучая патогенез атеросклероза, нельзя не отметить, что эндотелиальная дисфункция и повреждение эндотелия являются первым звеном в данном патологическом процессе. Однако важно понимать, что такое состояние, как эректильная дисфункция, может также быть первым системным проявлением дисфункции эндотелия, ставшей причиной данного заболевания. Более того, нарушение эрекции одним из независимых факторов риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [188, 201, 299, 315].

Эректильной дисфункцией (ЭРД) называют неспособность достичь или поддерживать эрекцию полового члена, необходимую для проведения полового акта. Согласно существующим данным, эта патология наблюдается у 152 миллионов мужчин во всем мире. Высокий травматизм мужского населения, частота встречаемости алкоголизма и курящего населения, употребляющего низкокачественные сорта табака, позволяют предположить наличие более частой встречаемости данного заболевания в России, чем в индустриально развитых странах [79].

Проблема эректильной дисфункции может иметь множество причин и не должна рассматриваться как самостоятельная нозологическая единица, но как следствие патологического процесса, генез которого так важно выявить. Одним из наиболее распространенных механизмов данного заболевания является эндотелиальная дисфункция. В ответ на адекватное стимулирование эндотелия сосудистой стенки вырабатывает оксид азота (NO), способствующий вазодилатации в норме.

Наиболее часто причинами васкулогенной эректильной дисфункции является внутриорганное поражение, наступающее в случае прогрессирования атеросклеротического процесса или при декомпенсации сахарного диабета. При поражении артерий, кровоснабжающих половые органы, например, в случае окклюзии обеих подвздошных артерий, развивается внеорганное поражение. Наиболее часто встречается внутриорганное

поражение, имеющее общий генез с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, причиной которого выступает атеросклеротическое поражение и эндотелиальная дисфункция пенильных сосудов [13] [26].

Очень часто эректильная дисфункция бывает предвестником таких серьезных заболеваний, как атеросклероз, диабет, повреждения позвоночника, заболевания печени, почек. Более того, существующие исследования демонстрируют повышенный уровень маркеров активации эндотелия у пациентов с данной патологией независимо от наличия или отсутствия коморбидной патологии [18] [106] [123]. ЭРД часто сопровождает сердечно-сосудистые заболевания, поскольку имеет с ними общие звенья патогенеза (эндотелиальная дисфункция и сниженная продукция NO также в том числе лежат в основе артериальной гипертензии) [23] [45].

Изучение новых лекарственных компонентов и создание новых препаратов позволили в значительной степени корректировать явление эректильной дисфункции [98] [41]. Наиболее эффективными среди препаратов, предназначенных для коррекции данного состояния, явились ингибиторы фермента фосфодиэстеразы–5 (ФДЭ–5), применение которых направлено на компенсацию эндотелиальной дисфункции [9] [57] [25]

Подавление активности данного фермента ведет к снижению распада и повышению в кавернозных тканях уровня циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), что приводит к индуцированию эрекции и ее поддержанию. Таким образом, основное действие ингибиторов ФДЭ-5 связано с усилением физиологического ответа на NO в сосудах, приводящего к эрекции. Первым препаратом-ингибитором данного фермента стал силденафил [39].

Эффекты, к которым приводит повышение уровня NO, опосредованы активацией растворимой гуанилатциклазы, что ведет к повышению в клетке уровня цГМФ. Данный медиатор уменьшает концентрацию внутриклеточного кальция, что имеет очень распространенный эффект не только на стенки сосудов, но и на другие клетки организма. Снижение содержания кальция приводит к расслаблению гладких мышц в органах и тканях, приводящее к

большему наполнению микроциркуляторного русла и улучшает местное кровоснабжение. Данный эффект также в некоторой степени угнетает функцию тромбоцитов и даже угнетает процессы воспаления [5].

Центральные механизмы регуляции эрекции включают в себя активацию NO-ергических нейронов, что повышает активность эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), ведущее к выделению оксида азота и, таким образом, к эрекции. Очевидно, что его влияние распространяется не только на эндотелий сосудов кавернозных тел, но и на эндотелий всего сосудистого русла, а воздействие на звенья патогенеза ЭРД может также быть эффективным при сердечно-сосудистых заболеваниях, в основе которых также лежит эндотелиальная дисфункция [49] [17]. Таким образом, анализ существующей информации указывает на необходимость исследования возможностей применения препаратов из группы ингибиторов ФДЭ-5, а именно, нового представителя данной группы, уденафила, обладающего меньшим количеством побочных эффектов.

Резюме

Анализ существующих данных указывает на необходимость новых методов консервативной терапии и непрямой реваскуляризации в целях коррекции возникшей хронической ишемии. Важно проведение испытаний на модели, способной воспроизводить язвенно-некротические изменения (гангрена конечности, ишемическая нейропатия периферических нервов и иные, свойственные пациентам с данной патологией), однако такой модели до настоящего времени создано не было.

У пациентов с тяжелым поражением артериального русла применение методов прямой реваскуляризации бывает невозможно, в связи с чем необходим поиск новых фармакологических способов, направленных на консервативное лечение критической ишемии. Для коррекции критической ишемии нижних конечностей возможно использование препаратов группы ингибиторов ФДЭ-5 и статинов, самостоятельно или с дополнительной инъекцией моноклеарной фракции костного мозга, что позволит повлиять на разные звенья патогенеза ишемии и, таким образом, приведет к значительному повышению степени эффективности проведенного лечения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Структура исследования

Исследование состояло из двух частей (Рис. 1). Целью первой части исследования стало клиническое изучение эффективности консервативной терапии у пациентов с наличием хронической артериальной недостаточности и явлений КИНК без и с проведением реваскуляризирующей остеотрепанации в сочетании с применением симвастатина 20 мг 1 раз в сутки. Целью второй части исследования стало изучение эффективности уденафила в качестве монотерапии при явлениях критической ишемии, а также применение исследуемого препарата в сочетании с пентоксифиллином и симвастатином для коррекции критической ишемии нижних конечностей и оценка влияния проведения реваскуляризирующей остеотрепанации на исход заболевания.

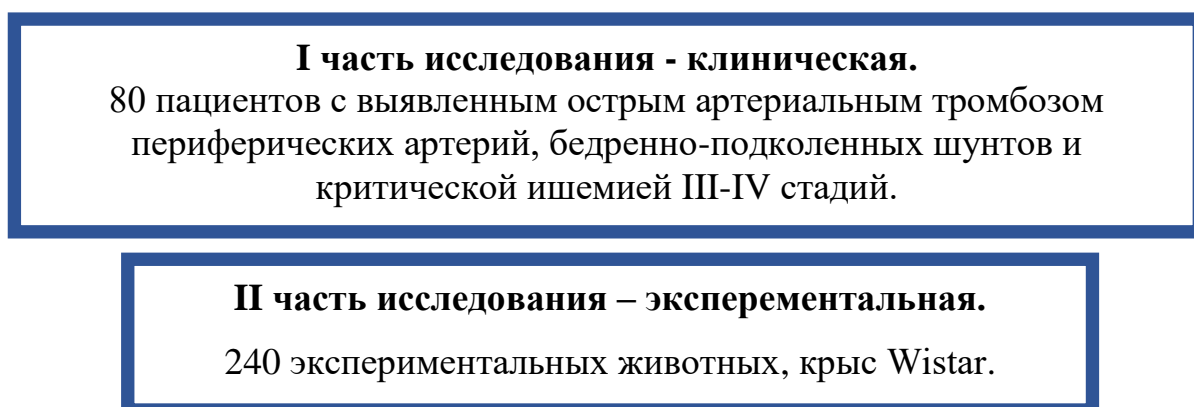


Рисунок 1. Структура исследования.

2.2. Материалы и методы клинического исследования (I часть исследования, клиническая)

За период с 2002 по 2003 годы в отделении сосудистой хирургии ОБУЗ КГКБ СМП г. Курска проведено комплексное обследование и лечение 80 пациентов с острым артериальным тромбозом периферических артерий,

тромбозом бедренно-подколенных шунтов и критической ишемией III-IV стадий на фоне облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей [101]. Все пациенты были мужского пола и считались неоперабельными в связи с тяжелым поражением дистального артериального русла и невозможностью выполнения реконструктивной операции. Все пациенты были распределены на 4 группы:

- I. 20 пациентов с проведением консервативной терапии.
- II. 20 пациентов с проведением консервативной терапии и РОТ.
- III. 20 пациентов с проведением консервативной терапии в комбинации с симвастатином в дозировке 20 мг 1 раз в сутки.
- IV. 20 пациентов с проведением консервативной терапии в комбинации с симвастатином в дозировке 20 мг 1 раз в сутки и РОТ.

Критерии включения пациентов с явлениями хронической ишемии нижних конечностей:

- больные с критической ишемией, вызванной острым тромбозом артерий голени и дистальных отделом бедренно-подколенных шунтов на фоне тяжелого стеноза/окклюзии;
- больные с критической ишемией и окклюзией артерий стопы и голени;
- больные с диффузным поражением бедренной, подколенной, большеберцовых артерий;
- больные с поражением бедренно-подколенного сегмента в сочетании с острым периодом инфаркта миокарда или нарушением мозгового кровообращения.

Учитывались такие характеристики, как возраст, длительность хронической ишемии, коморбидность, характер поражения артерий и тип кровотока. Распределение признаков представлено в таблицах 1-5.

Таблица 1

Распределение больных по возрасту.

Возраст	Количество больных в группах
45-59	16 (20%)
60-75	48 (60%)
76 и старше	16 (20%)

Таблица 2

Распределение больных по длительности заболевания.

Длительность заболевания	Количество больных в группах
2-4 года	8 (10%)
5-7 лет	28 (35%)
8-10 лет	28 (35%)
10 и более лет	16 (20%)

Таблица 3.

Распределение больных по сопутствующей соматической патологии.

Сопутствующая патология	Количество больных в группах
Артериальная гипертензия	72 (90%)
Ишемическая болезнь сердца	80 (100%)
Хронические неспецифические заболевания легких	24 (30%)
Сахарный диабет	20 (25%)
Церебральный атеросклероз	40 (50%)

Клиническое обследование пациентов проводилось стандартным образом. Производился сбор анамнеза с установлением длительности заболевания, дистанцию безболевого ходьбы, КИНК в анамнезе, наличие, местоположение и интенсивность болевого синдрома, а также данных о сопутствующей патологии. Были использованы лабораторные и инструментальные методы исследования: общий и биохимический анализ крови, липидный профиль с измерением уровня общего холестерина, липопротеидов низкой и высокой плотности, общий анализ мочи. Все инструментальные исследования были выполнены до проведенного лечения и

спустя 1 месяц после его окончания, и включали плетизмографию, реовазографию, ультразвуковое исследование (УЗИ) артерий нижних конечностей с измерением лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), а также ЭКГ, флюорографию или рентгенографию органов грудной клетки перед началом исследования. У всех пациентов был исследован характер поражения и кровотока в сосудах нижних конечностей (таблица 4, 5).

Таблица 4

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

Характер поражения артерий	Количество больных в группах	
	Окклюзия поверхностной бедренной артерии	40
Окклюзия подколенной артерии и задней большеберцовой артерии	64	80%
Стеноз поверхностной бедренной артерии	40	50%
Стеноз глубокой артерии бедра	24	30%
Стеноз подколенной артерии и задней большеберцовой артерии	16	20%

Таблица 5

Распределение больных по характеру кровотока в артериях нижних конечностей

Артерии	Количество больных в группах		
	Характер кровотока		
	Магистральный	Коллатеральный	Отсутствует
Общая бедренная артерия	80 (100%)	–	–
Поверхностная бедренная артерия	40 (50%)	40 (50%)	–
Глубокая артерия бедра	56 (70%)	24 (30%)	–
Подколенная артерия	–	16 (20%)	64 (80%)
Задняя большеберцовая	–	16 (20%)	64 (80%)

артерия			
---------	--	--	--

УЗИ артерий нижних конечностей проводилось на аппарате «Toshiba-Hagio» (Япония) в режиме реального времени с использованием секторных двунаправленных датчиков непрерывной звуковой волны с рабочей частотой от 5 МГц до 10 МГц. ЛПИ вычислялся по стандартной формуле отношения систолического давления, измеренного на одной из артерий голени, к системному систолическому давлению на плечевой артерии той же конечности.

Допплеровские и плетизмографические методы исследования осуществлялись по стандартной методике с применением системы «ULTRA – PVD» (США).

Фотоплетизмография была использована для определения количественных параметров микроциркуляторного русла с дальнейшей их оценкой, в частности, определялась величина фотоплетизмографического индекса (ФИ) на полученной фотоплетизмограммы.

Реовазография проводилась на реоплетизмографе РПГ-4-02, подключенному к четырехканальному электрокардиографу. Степень нарушения кровообращения оценивали с использованием величины реовазографического индекса (РИ).

В первой группе пациентов проводилась консервативная терапия, включающая в себя инфузию пентоксифиллина в дозировке 5 мл на 200 мл физиологического раствора хлорида натрия 1 раз в сутки в течение 10 дней. Для пожизненного применения был рекомендован пероральный прием аспирина 75 мг 1 раз в сутки, применяемый в течение всей госпитализации. В случае тяжелого болевого синдрома в целях коррекции производилось парентеральное введение ненаркотических (анальгин, кеторол, дексалгин) и наркотических (промедол) анальгетиков, и физиотерапевтические процедуры (лазеротерапия на нижние конечности). Также пациентам с лечебной целью назначалось и производилось подкожное введение гепарина 5000 ЕД 4 раза в сутки в течение

5 дней под контролем активированного частичного тромбопластинового времени.

Во второй группе производилась та же консервативная терапия, что и в первой группе, с дополнительным проведением под спинномозговой анестезией РОТ по стандартной методике.

В третьей группе проводилось консервативное лечение с дополнительным включение в схему лечения симвастатина в дозировке 20 мг 1 раз в сутки.

В четвертой группе производилась та же консервативная терапия, что и в третьей группе, с дополнительным проведением под спинномозговой анестезией РОТ по стандартной методике.

Результаты лечения оценивались через 6 месяцев с использованием шкалы клинического статуса Рутерфорда (таблица 6). Данная шкала получила широкое распространение и рекомендована к применению Российским обществом ангиологов и сосудистых хирургов.

Таблица 6

Шкала оценки результатов проведенного лечения.

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

-3	Значительное ухудшение	Ухудшение статуса более чем на одну степень ишемии или большая ампутация
----	------------------------	--

2.3. Изучение моделирования критической ишемии нижних конечностей у лабораторных животных на доклиническом этапе и влияние на нее исследуемых препаратов в монотерапии и в комбинации (II часть исследования, экспериментальная) (II часть исследования, экспериментальная)

Экспериментальная работа проводилась на 240 лабораторных животных (крысы Wistar, масса 220–250 г, возраст животных 4 месяца). Перед исследованием крысы на 7 дней помещались на карантин в виварий НИИ ЭМ ФГБОУ ВО «Курский государственным медицинский университет» Минздрава России. Крысы содержались при температуре воздуха 22–24 °С в стандартной комнате с 12 часовым автоматическим освещением. Животных рандомизировали по массе и полу. Формирование групп производилась по манипуляциям проводимым операциям.

2.3.1. Создание модели критической ишемии нижних конечностей у лабораторных животных

В опытной группе перед началом эксперимента все животные погружались в наркоз. В брюшной полость вводился раствор хлоралгидрата в расчете 300 мг/кг. После подготовки места вмешательства – сбрасывание шерсти и санация, выполнялся разрез конечности с целью обнажить основной сосудисто-нервный пучок. Проекция разреза: от паховой складки до стопы по внутренней стороне конечности. Производилось выделение бедренных, подколенных и берцовых артерий и вен на всем протяжении. Все коллатеральные сосуды пересекали и лигировали. Ретроградного кровотока после проведенного вмешательства из культы артерий голени не выявлялось,

лигатуры на них наложены не были. Обнажался и пересекался седалищный нерв. В послеоперационном периоде отмечали возникновение симптомов ишемии и их динамику. Рана на бедре ушивалась послойно стандартным непрерывным швом [116].

Описанные этапы изображены на рис. 2-4.



Рисунок 2. Этап операции моделирования. Подготовка операционного поля; разрез кожи.



Рисунок 3. Этап операции моделирования ишемии. Выделение элементов сосудисто-нервного пучка бедра.



Рисунок 4. Этап операции моделирования. Наложение лигатур с последующим удалением участка магистральных сосудов, а также пересечение седалищного нерва.

В литературе описан способ моделирования КИНК, основным недостатком которого является ограниченная возможность применения для изучения неосложненных форм ишемии, так как применение данного метода с лигированием только артериального русла не приводит к значительным изменениям в тканях скелетных мышц экспериментальных животных, в том числе к параличу конечности и язвенно-некротическому процессу. Важно понимать, что критическая ишемия приводит к декомпенсации как артериального, так и венозного кровообращения, и может приводить к множеству необратимых изменений. У таких пациентов может развиваться гангрена конечности, ишемическая нейропатия периферических нервов и другие осложнения, в связи с чем у созданной модели, имитирующей состояние критической ишемии, должны быть затронуты как сосуды, так и основной иннервирующий конечность нерв.

2.3.2 Исследование микроциркуляции в мышцах голени крыс посредством лазерной доплеровской флоуметрии

Оценка уровня микроциркуляции в мышечной ткани голени осуществлялась с применением лазерной доплеровской флоуметрии (далее

флоуметрия) при помощи лазерного доплеровского флоуметра «Віорас-systems MP 100» и датчика «TSD-144».

Перед исследованием животные погружались в наркоз. В брюшной полости вводился раствор хлоралгидрата в расчете 300 мг/кг. В передненаружном квадранте правой голени обнажалась мышца и с помощью датчика в пяти точках в течение 30 сек в каждой производилась запись кривой характера микроциркуляторного русла (рисунок 5, 6). Уровнем микроциркуляции считалось среднее из полученных измерений, уровнем микроциркуляции в группе среднее из 10 полученных значений.

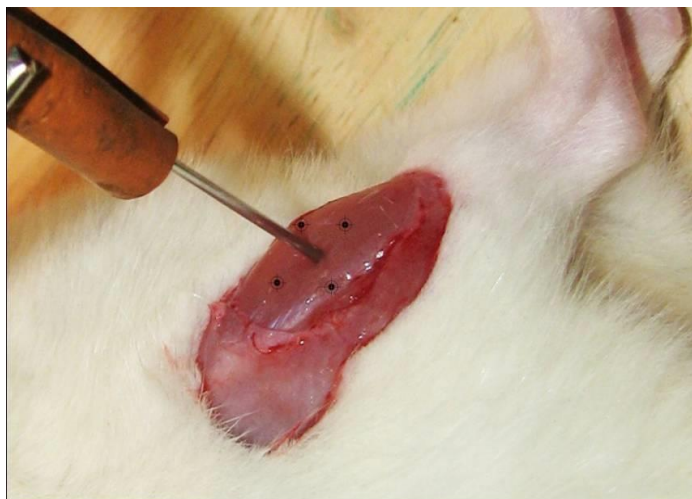


Рис. 5. Лазерная доплеровская флоуметрия в мышцах голени крысы. Точки, регистрации уровня микроциркуляции. Уровень микроциркуляции регистрировался в каждой точке: в середине длины мышцы, в точках на 3-4 мм выше, ниже, латеральнее и медиальнее первой.

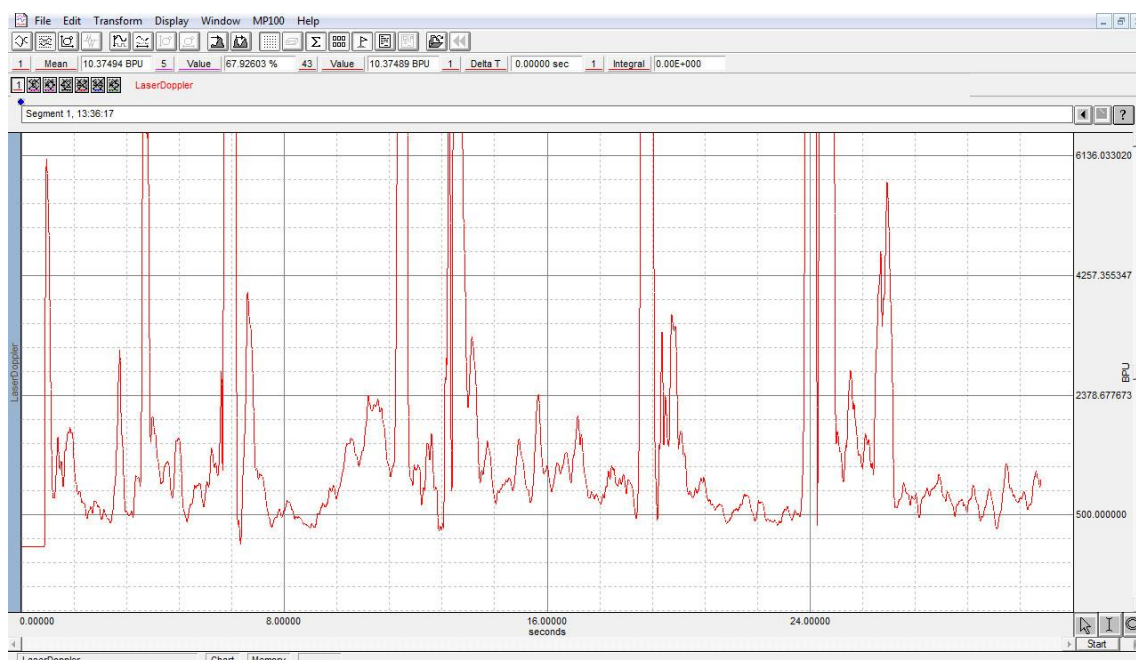


Рис. 6. Общий вид кривой уровня микроциркуляции, зарегистрированного в пяти точках. Резкие амплитуды графика между точками связаны со «сканированием воздуха» при переходе от одной точки к другой

2.3.3. Методы гистологического исследования

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

Биопсия участка исследуемой мышечной ткани проводилась путем рассечения скальпелем собственной фасции голени и дальнейшего отделения мышц от соседних анатомических структур и пересечения мест прикрепления после окончания процедуры флоуметрии. Сразу после забора биологического материала, его помещали в 10% раствор нейтрального формалина на 10 суток, после чего формировали участки размером 1 на 1 см. После проведенной фиксации их промывали и обезжиривали. Для изготовления парафиновых срезов производилась дегидратация участков в спиртах с дальнейшей заливкой парафином по стандартной методике и окрашиванием гематоксилином-эозином.

Изучение гистологических препаратов с измерением параметров зоны некроза, среднего диаметра мышечных волокон и плотности капиллярной сети осуществлялось с помощью лабораторного микроскопа Levenhuk D320L и цифровой окуляр-камеры Levenhuk C310 на увеличениях x100, x200 и x400 крат с дальнейшим документированием снимков в программе Levenhuk Tour View. Полученные значения измерения также подсчитывали в 10 полях зрения на 10, 21 и 28 сутки, и выводили среднее значение.

2.3.4. Дизайн эксперимента

С целью коррекции ишемии конечности исследуемые препараты вводились ежедневно, интрагастрально, исходя из расчета терапевтических доз, проводимого с использованием коэффициента перерасчета для лабораторных крыс массой 240 г согласно методическим указаниям, содержащимся в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». В группах с комбинированным применением препаратов суточные дозы исследуемых препаратов были уменьшены в 2 и 10 раз.

Животные были распределены на 11 групп в зависимости от используемого метода, в каждой из которых содержалось по 20 особей. В первой группе ЛДФ и биопсия проводилась после окончания эксперимента, во всех остальных на 21 и 28 сутки после проведенного вмешательства.

Дополнительная однократная инъекция МНФ собственного костного мозга в группах 10-12 производилась на 7-е сутки после начала эксперимента по 50 мкл в 4 точки ишемизированной конечности: паравазально в места отхождения латеральной артерии, огибающей бедренную кость и огибающей подвздошную кость поверхностной артерии; в место прикрепления гребенчатой и длинной приводящей мышц бедра (ориентиром является локализация

отхождения мышечной ветви бедренной артерии); в область верхней трети икроножной мышцы ишемизированной конечности.

1. Интактная группа
2. Группа ложнооперированных животных
3. Моделирование ХИНК (удаление бедренной, подколенной, передней и задней большеберцовых артерий, группа сравнения).
4. Моделирование критической ишемии (удаление бедренных, подколенных, передних и задних большеберцовых артерий, и вен, пересечение седалищного нерва, предложенная методика, основная группа).
5. Моделирование критической ишемии и ее коррекция интрагастральным введением уденафила в дозировке 8,6 мг/кг в течение 28 дней.
6. Моделирование критической ишемии и ее коррекция интрагастральным введением пентоксифиллина в дозировке 60 мг/кг в течение 28 дней .
7. Моделирование критической ишемии и ее коррекция интрагастральным введением симвастатина в дозировке 1,71 мг/кг в течение 28 дней.
8. Моделирование критической ишемии и ее коррекция интрагастральным введением комбинации уденафила с симвастатином (в дозировке 0,86 мг/кг каждого препарата) в течение 14 дней.
9. Моделирование критической и ее коррекция интрагастральным введением комбинации препаратов уденафила и пентоксифиллина (в дозировке 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно) в течение 14 дней.
10. Моделирование критической ишемии и ее коррекция однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга.
11. Моделирование критической ишемии и ее коррекция интрагастральным введением комбинации уденафила с симвастатином (в дозировке 0,86 мг/кг каждого препарата) в течение 7 дней и

однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга.

12. Моделирование критической ишемии конечности и ее коррекция интрагастральным введением комбинации препаратов уденафила и пентоксифиллина (в дозировке 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно) в течение 7 дней и однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга.

Дизайн эксперимента состоял из следующих разделов:

I. Наркоз (внутрибрюшинное введение хлоралгидрата 300 мг/кг);

II. Моделирование КИНК (исключена группа интактных и ложнопериорированных животных, у которых производился стандартный доступ к сосудисто-нервному пучку с дальнейшим его ушиванием).

III. Введение исследуемых препаратов:

- ежедневно, интрагастрально, однократно в течение 28 дней в группах с монотерапией исследуемыми препаратами.

- ежедневно, интрагастрально, однократно в течение 14 дней в группах с комбинированной терапией исследуемыми препаратами.

- однократное параэнтеральное введение МНФ собственного костного мозга на 7-е сутки после начала эксперимента по 50 мкл в 4 точки по оригинальной схеме.

- ежедневно, интрагастрально, однократно в течение 7 дней в группах с комбинированной терапией исследуемыми препаратами и дополнительным однократным параэнтеральным введением МНФ собственного костного мозга по 50 мкл в 4 точки по оригинальной схеме на 7-е сутки после моделирования критической ишемии.

IV. Проведение ЛДФ в мышцах голени крыс для оценки уровня микроциркуляции.

IV. Биопсия участка исследуемой мышцы с дальнейшим морфологическим исследованием.

МНФ собственного костного мозга готовили непосредственно перед введением для сохранения жизнеспособности клеток. В качестве ориентира для забора использовался бедренно-большеберцовый сустав. После проведения санации поверхности 70% раствором этилового спирта, производилась фиксация конечности в положении флексии для обеспечения удобства забора. Иглой диаметром 20G, и шприца, содержащего разбавленный раствор, содержащий 0,5 мл 0,9% NaCl и 0,5 мл (2500 ЕД) гепарина в объеме 1 мл, перкутанно через хрящевые суставные мениски под надколенником осуществляли пункцию места содержания костного мозга с его аспирацией в объеме от 1,5 мл путем поступательных движений иглы.

Мононуклеарная фракция выделялась по методу Воуит [6]. После разведения костного мозга в физ.растворе (1 к 5), полученный раствор центрифугировали с добавлением 400 г фиколл-верографина в течение 30 мин. Полученную мононуклеарную фракцию клеток трижды отмывали в забуференном с помощью фосфатно-солевого буфера физиологическом растворе. Далее их ресуспендировали и культивировали в среде RPMI-1640 в концентрации 10^6 клеток в мл. Жизнеспособность полученной фракции, определяемая по методу окрашивания трипановым синим, превышала 96%.

2.4. Статистическая обработка результатов исследования

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

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

Полученные экспериментальные данные анализировали с помощью методов описательной статистики путем определения таких показателей как

среднее арифметическое, стандартное отклонение и стандартная ошибка. В качестве основного способа определения уровня статистической значимости отличий между средними величинами использовали методику определения границ доверительного интервала (t) при допустимом уровне $p \leq 0,05$ для экспериментальных медико-биологических исследований.

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

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты клинического исследования (I часть исследования, клиническая)

Клиническая часть исследования включала в себя описательный и сравнительный анализ данных от пациентов четырех групп, разделенных в зависимости от используемой схемы лечения, в динамике:

I группа - консервативная терапия; (n = 20).

II группа - реваскуляризирующая остеотрепанация – РОТ; (n = 20).

III группа - консервативная терапия + симвастатин; (n = 20).

IV группа - реваскуляризирующая остеотрепанация + симвастатин; (n = 20).

Сравнивали показатели гемодинамики и микроциркуляции внутри исследуемых групп до начала исследования и после проведенного лечения через 2 месяца. Полученные результаты сравнительного анализа представлены в таблицах 7-10 и рисунках 7-10.

Первичные данные, рассчитанные индивидуально на каждого пациента в каждой группе сравнения, нами представлены в приложении 1.

Результаты исследования демонстрируют значительную отрицательную динамику в группе консервативной терапии, это видно по показателям фотоплетизмографического, реовазографического и лодыжечноплечевого индекса: во всех случаях наблюдается их статистически значимое уменьшение. Во второй и третьей группах после проведенного лечения достоверно снижаются только показатели реовазографического (на стопе) и лодыжечноплечевого индекса. В четвертой группе все полученные значения остаются на практически первоначальном уровне, то есть в данной группе удается временно (по данным наблюдений за два месяца) приостановить отрицательную динамику показателей, наблюдаемую во всех остальных группах.

Таблица 7

Динамика показателей артериального кровотока и микроциркуляции в группе с консервативной терапией до и после проведенного лечения

№	Показатель		№1 Консервативная терапия	
			До лечения	Через 60 дней
1	Фотоплетизмографический индекс (%)		35,2±1,5	28,9±1,8
			p=0,002*	
2	Реовазографический индекс	голень	0,30±0,02	0,22±0,02
			p=0,004*	
	стопа	0,23±0,01	0,16±0,01	
		p=0,001*		
3	Лодыжечно- плечевой индекс		0,3±0,02	0,16±0,01
			p=0,001*	

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) в сравнении с показателями до лечения, n=20.

Таблица 8.

Динамика показателей артериального кровотока и микроциркуляции в группе с реваскуляризирующей остеотрепанацией до и после проведенного лечения

№	Показатель		№2 РОТ	
			До лечения	Через 60 дней
1	Фотоплетизмографический индекс (%)		35,1±2,2	32,3±2,9
			p=0,182	
2	Реовазографический индекс	голень	0,29±0,02	0,25±0,02
			p=0,120	
	стопа	0,24±0,02	0,18±0,01	
		p=0,009*		
3	Лодыжечно- плечевой индекс		0,3±0,02	0,21±0,01
			p=0,001*	

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) в сравнении с показателями до лечения, n=20.

Таблица 9

Динамика показателей артериального кровотока и микроциркуляции в группе с сочетанием консервативной терапии и симвастатина до и после проведенного лечения

№	Показатель		№3 Консервативная терапия + симвастатин	
			До лечения	Через 60 дней
1	Фотоплетизмографический индекс (%)		35,1±2,0	33,1±2,7
			p=0,123	
2	Реовазографический индекс	голень	0,31±0,02	0,26±0,02
			p=0,185	
		стопа	0,24±0,01	0,19±0,01
			p=0,054*	
3	Лодыжечно-плечевой индекс		0,3±0,02	0,22±0,01
			p=0,005*	

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) в сравнении с показателями до лечения, n=20.

Таблица 10

Динамика показателей артериального кровотока и микроциркуляции в группе с сочетанием реваскуляризирующей остеотрепанацией и симвастатином до и после проведенного лечения.

№	Показатель		№4 РОТ + симвастатин	
			До лечения	Через 60 дней
1	Фотоплетизмографический индекс (%)		35,3±2,4	35,4±3,2
			p=0,674	
2	Реовазографический индекс	голень	0,29±0,02	0,28±0,02
			p=0,547	
		стопа	0,23±0,01	0,22±0,01

		p=0,530	
3	Лодыжечно- плечевой индекс	0,3±0,02	0,29±0,01
		p= 0,454	

* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) в сравнении с показателями до лечения, n=20.

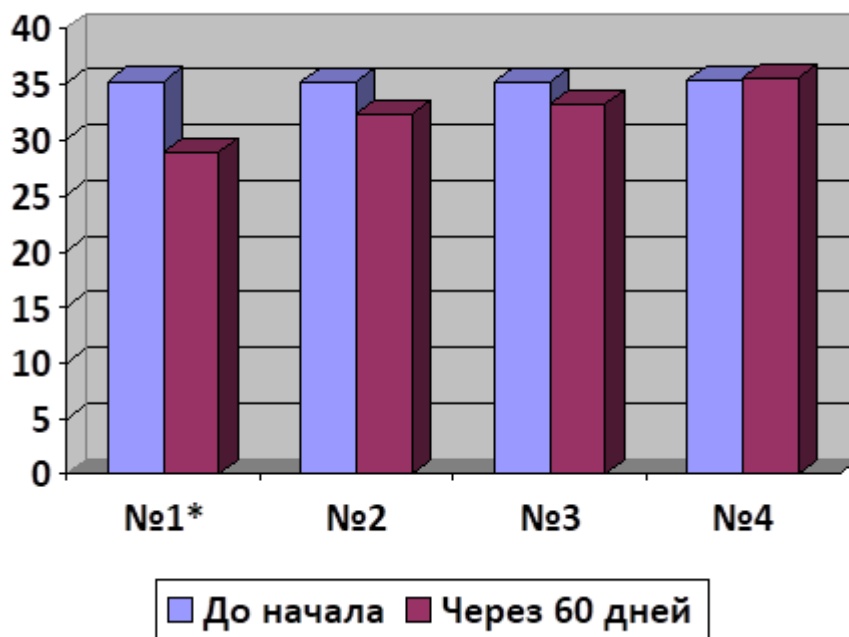
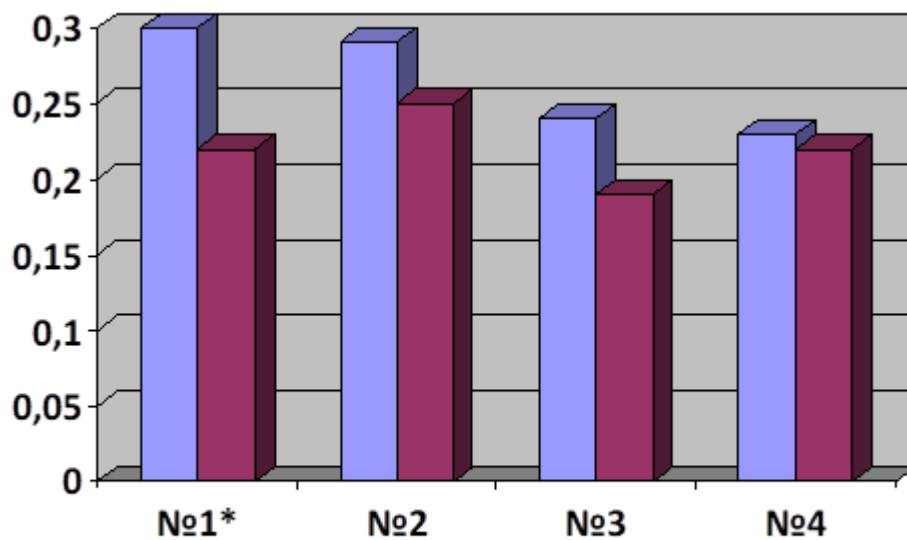
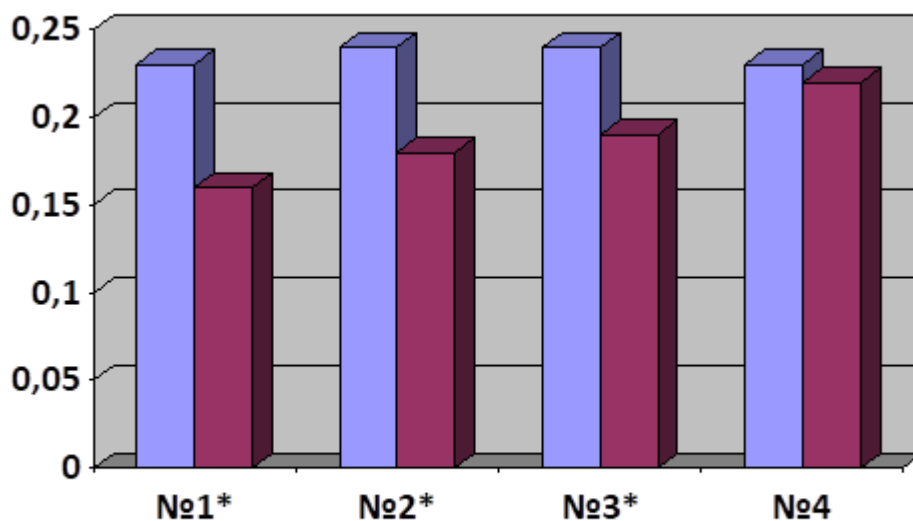


Рисунок 7. Динамика показателей фотоплетизмографического индекса у пациентов в зависимости от типа лечения. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$)



А



Б



Рисунок 8. Динамика показателей реовазографического индекса у пациентов в зависимости от типа лечения. А – голень; Б – стопа. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$)

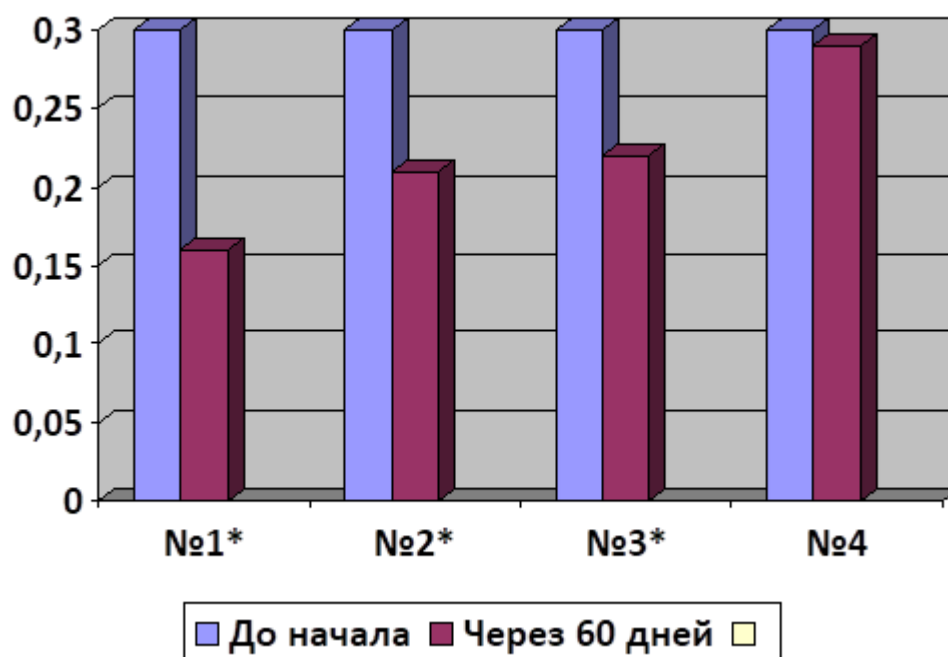


Рисунок 9. Динамика показателей лодыжечно – плечевого индекса у пациентов в зависимости от типа лечения. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Была произведена оценка динамики клинического статуса больных после лечения с использованием шкалы оценки результатов проведенного лечения. Во всех группах был выявлен результат, соответствующий значительному ухудшению клинической картины, однако обращает на себя внимание то, что в первой он был равен 100%, а во второй – 90%, в третьей 95%, в четвертой уже 85%. Во второй, третьей и четвертой группе у 2, 1 и 3 пациентов соответственно был достигнут результат минимального улучшения клинической картины после проведенного лечения. У этих пациентов поражение артериального русла затронуло бедренно-подколенный сегмент, берцовые артерии при этом были проходимы, что еще раз указывает на важность состояния дистального русла.

В первой группе достигнуть какого-либо улучшения клинической картины не представилось возможным, что свидетельствует о неизбежном прогрессировании процесса ишемии без необходимого лечения. Анализ исходов критической ишемии пораженной конечности после проведенного лечения продемонстрировал ампутацию с частотой 100% в группе

консервативной терапии через 75 дней. Во второй, третьей и четвертой группе у 2, 1 и 3 пациентов удалось сохранить конечность (рис. 10).

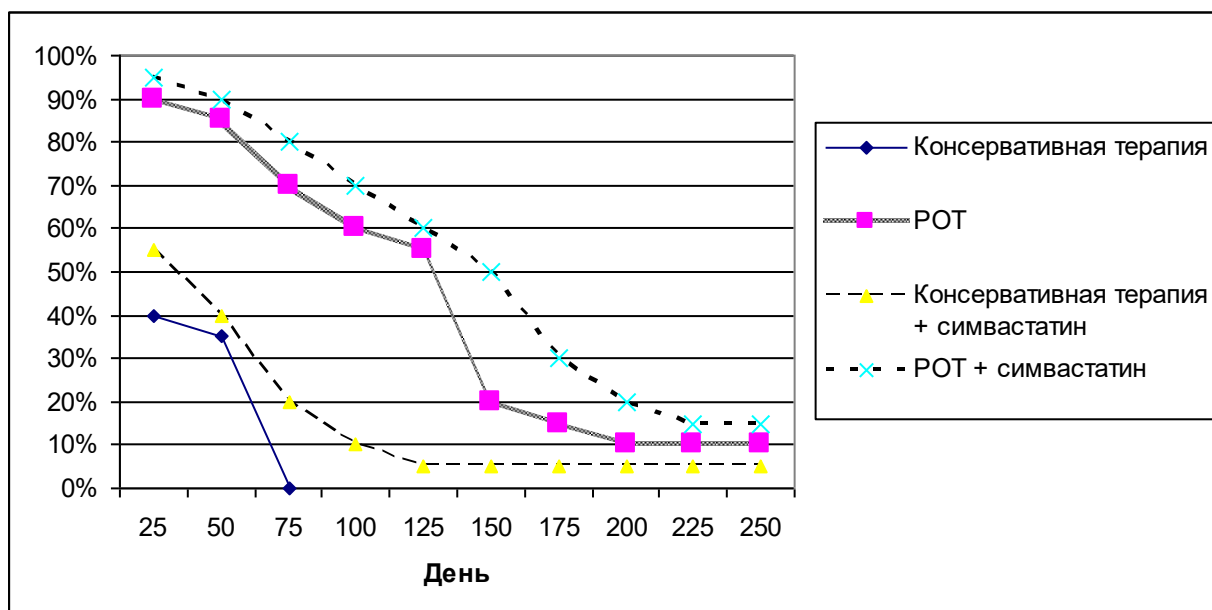


Рисунок 10. Сохранность конечности в исследуемых клинических группах.

Применение операции РОТ в комбинации с консервативной терапией, включающей симвастатин, позволяет замедлить ухудшение показателей артериального кровотока и микроциркуляции у пациентов с КИНК в течение 60 дней, однако в долгосрочной перспективе, а именно в течение 250 дней, сохранить пораженную тяжелой ишемией конечность удалось только у 15% больных при наличии проходимых берцовых артерий.

Резюме

Проведенный анализ результатов лечения пациентов с КИНК продемонстрировал низкую эффективность консервативной терапии и методов не прямой реваскуляризации у пациентов с невозможностью использования прямых реваскуляризирующих методов. В связи с этим поиск новых возможностей для консервативной коррекции критической ишемии представляет собой актуальную проблему. Применение РОТ, несмотря на стимуляцию периостального кровотока и мобилизацию уже существующего коллатерального кровотока, не позволяет корректировать тяжелую ишемию, несмотря на действие данного метода на местные ткани (рефлекторное воздействие на надкостницу, снижение спазма артерий, и снижение периферического сосудистого сопротивления).

Консервативная терапия КИНК в сочетании реваскуляризирующей остеотрпанацией и дополнительным приемом симвастатина в дозировке 20 мг 1 раз в сутки позволила сохранить пораженную тяжелой ишемией конечность у 15% пациентов, условием чего явилось наличие проходимых берцовых артерий.

3.2. Результаты экспериментальной части исследований (II часть исследования)

3.2.1. Разработка способа моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных

В первой (интактные) и второй (ложнооперированные) группах признаков ишемии выявлено не было. Клиническая картина возникшего нарушения кровоснабжения в третьей (с использованием классического метода удаления артериального русла) и четвертой (с удалением всех магистральных сосудов и пересечением седалищного нерва по разработанной методике) группах отличалась по частоте возникновения различных симптомов, данные представлены в таблице 11.

Таблица 11

Характеристика клинической картины хронической ишемии

Симптомы экспериментальной ишемии конечности	Группа 3 (Классический метод)		Группа 4 (Разработанный метод)	
	n=30	%	n=30	%
«Перемежающаяся хромота»	26	86,6	30	100
Гиперемия кожи	19	63,3	28	93,3*
Сухая гангрена пальцев, части стопы	2	6,6	21	70*
Ишемический некроз	1	3,3	17	56,6*
Ишемический отек	1	3,3	30	100*

Примечания: * - $p < 0,05$ при сопоставлении с группой сравнения.

Таблица 12

Динамика перфузии в мышцах голени ($M \pm m$) в перфузионных единицах

Группа животных	10 сутки (n=10)	21 сутки (n=10)	28 сутки (n=10)
Интактная (группа 1)	528,6±11,4	531,6±12,08	533,4±11
Ложнооперированная	521,4±11,46	523±13,79	524,1±15,1

(группа 2)			
Классический метод	213,6±7,53*	320,9±3,7*	376,7±10,68*
(группа 3)	$p1=5,55114 \times 10^{-15}$	$p1=2,17061 \times 10^{-12}$	$p1=6,3787 \times 10^{-09}$
Разработанный метод	160,5±3,28* **	249,1±7,31* **	302,9±6,46* **
(группа 4)	$p1=2,62189 \times 10^{-17}$	$p1=9,57171 \times 10^{-14}$	$p1=5,53976 \times 10^{-13}$
	$p2=0,000004417$	$p2=0,000000065$	$p2=0,000013482$

Примечания: * - $p1 < 0,05$ в сравнении с интактной группой животных; ** - $p2 < 0,05$ при сопоставлении с группой сравнения.

Непосредственно после проведения эксперимента у животных в третьей группе развивалась острая ишемия: конечность не участвовала в акте движения, кожные покровы бледнели и были холодными на ощупь. У животных четвертой острой ишемия сопровождалась развитием отека стопы и голени, полным отсутствием болевой чувствительности на оперированной конечности.

Влияние различных методов на показатели перфузии при различных методах отражено в таблице 12. В опытной группе с проведением вмешательства по разработанной методике площадь некроза была больше (таблица 13), а показатели перфузии были ниже не только по сравнению с показателями интактных и ложнооперированных животных, но и по сравнению с группой сравнения ($p < 0,05$), а в группе сравнения показатели перфузии возрастали (рис. 11)

Через 3-5 суток в группе контроля острая ишемия переходила в хроническую: оперированная конечность включилась в процесс движения, развивались характерные симптомы перемежающейся хромоты, исчезали бледность, развивалась гиперемия кожных покровов (осложнения развивались лишь у 13,3% лабораторных крыс), а в основной группе у всех животных выявлялись признаки язвенно-некротического поражения.

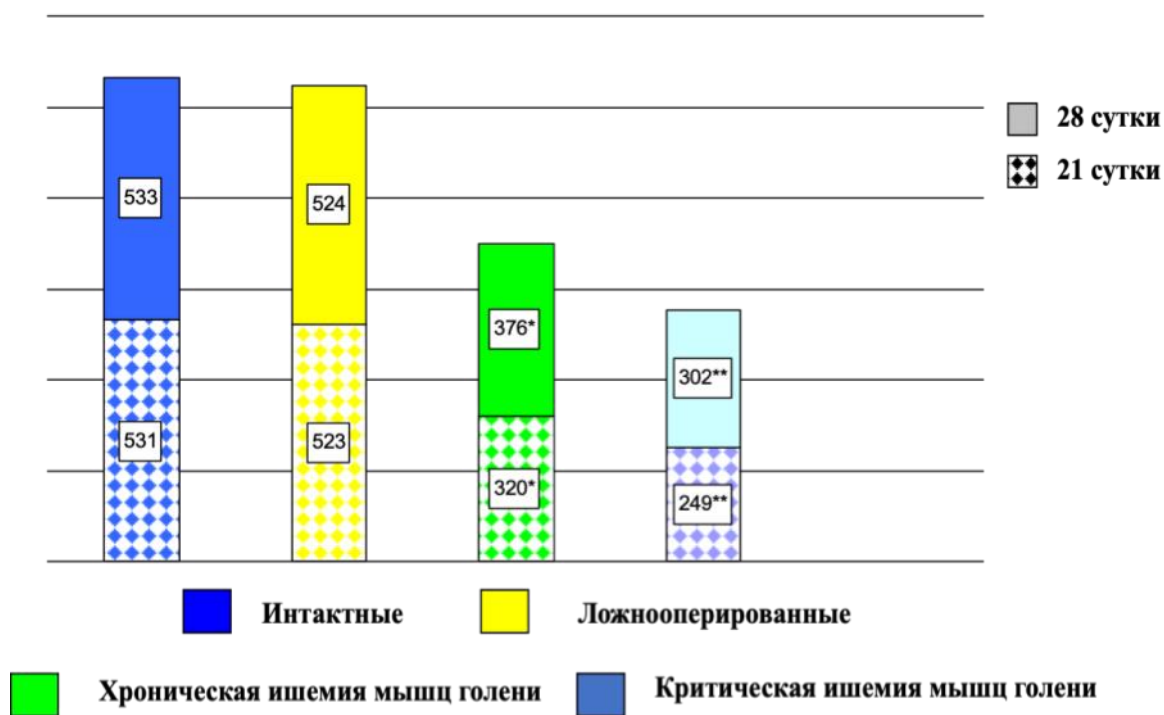


Рисунок 11. Уровень перфузии мышц голени у крыс в 1-4 экспериментальных группах выраженный в перфузионных единицах.

Примечания: * - $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой животных; ** - $p < 0,05$ при сопоставлении с группой сравнения.

Таблица 13

Динамика площади некроза (%)

Группы животных	10 сутки	21 сутки	28 сутки
Критическая ишемия Стандартная методика моделирования (группа 3)	27,5±6	11±2,5	8,5±1,5
Критическая ишемия (группа 4)	48,7±8*	19,2±4,1*	15,3±2,7*
Предложенная методика моделирования	$p1=2,533 \times 10^{-8}$	$p1=3,761 \times 10^{-8}$	$p1=4,8778 \times 10^{-8}$

Примечания: * - $p < 0.05$ при сопоставлении с группой сравнения

Микроскопическое изучение гистологических срезов интактных животных.

На гистологических препаратах выявлялась нормальная скелетная мышечная ткань без признаков поражения (рис. 12 и 12А).

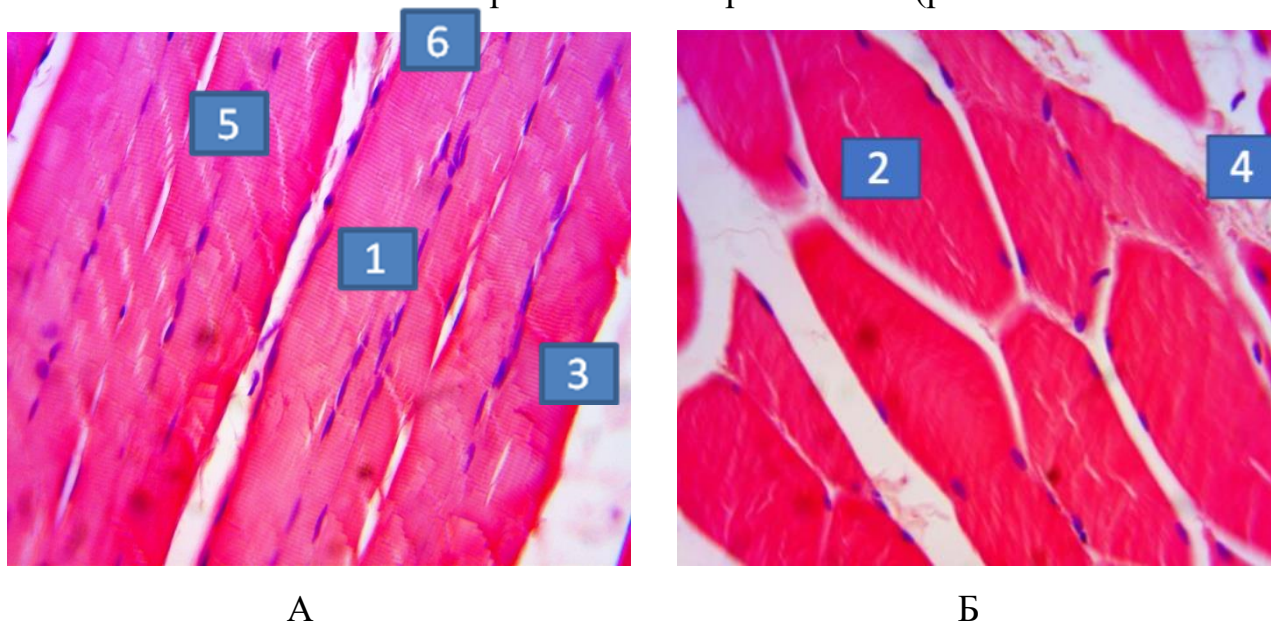
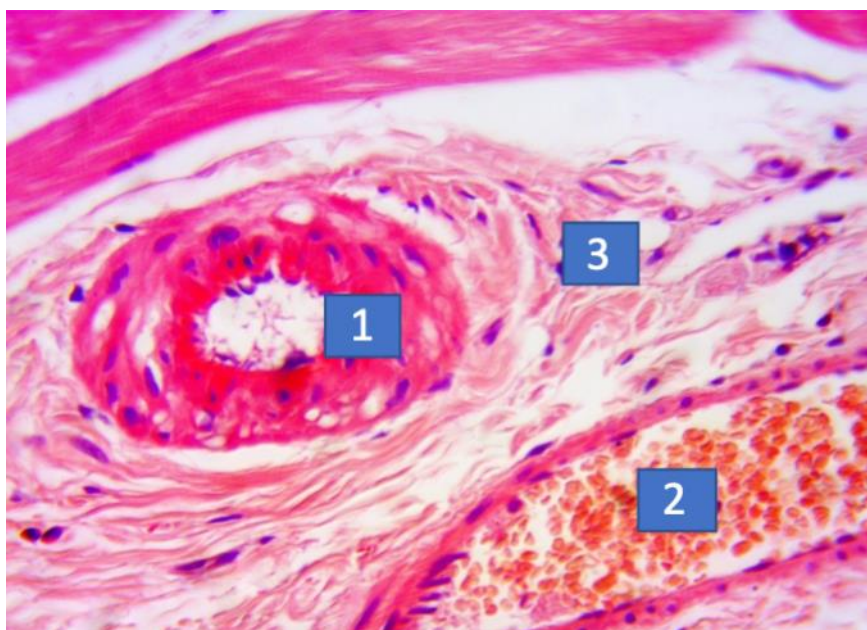


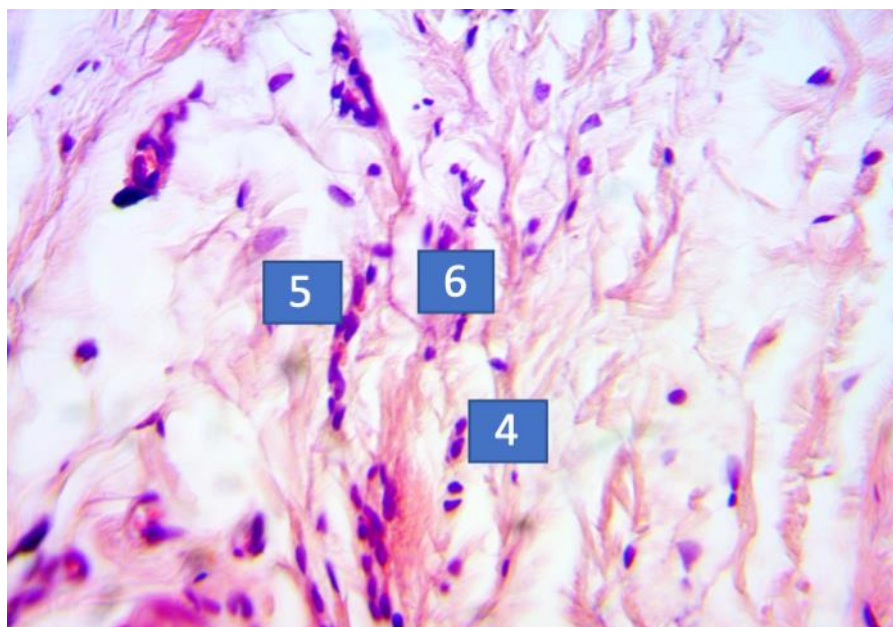
Рисунок 12. Микрофотография среза скелетной мышечной ткани в области средней трети бедра у лабораторных животных крыс в группе интактных животных. А – продольный срез. Б – поперечный срез. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) продольно и (2) поперечно срезанные симпласты скелетной мышечной ткани, (3) прослойки соединительной ткани, образующие эндо-, пери- и эпимизий мышечных волокон, (4) мелкие и крупные кровеносные сосуды, (5) поперечная исчерченность, (6) базофильные ядра непосредственно под сарколеммой.

В прослойках соединительной ткани между мышечных волокон локализуются кровеносные сосуды артериального и венозного русла различного диаметра (рис. 13А). В соединительной ткани эпимизия визуализируются клетки фибробластического дифферона, единичные лимфоциты, тучные клетки и сосуды микроциркуляторного русла (рис. 13Б).



А



Б

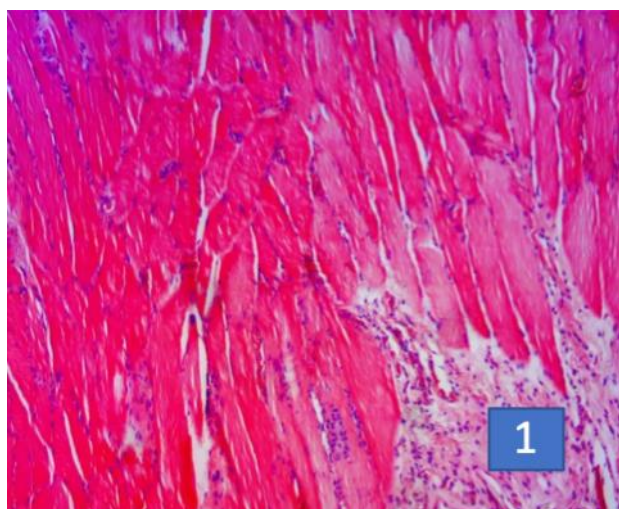
Рисунок 13. Микрофотография среза крупных кровеносных сосудов, расположенных между пучками скелетной мышечной ткани (А). Соединительная ткань эпимизия с преобладанием в поле зрения клеток фибробластического дифферона и кровеносных сосудов микроциркуляторного русла. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: кровеносные сосуды (1) артериального и (2) венозного русла, (3) соединительная ткань эпимизия, (4) лимфоциты, (5) тучные клетки, (6) сосуды микроциркуляторного русла.

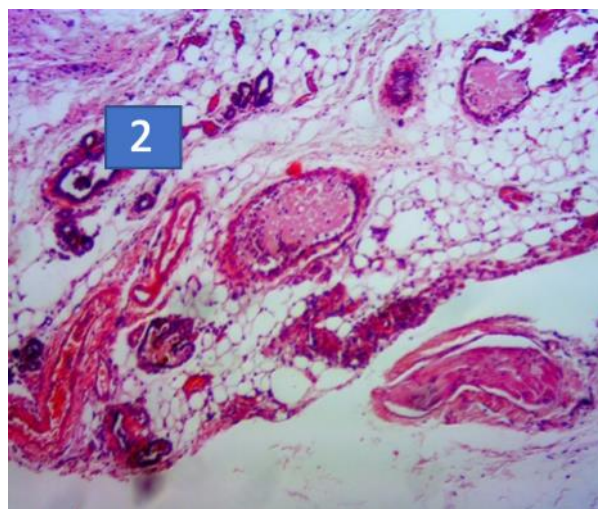
У ложнооперированных крыс достоверных различий в строении мышечной ткани от интактных крыс не обнаружено.

Микроскопическое изучение гистологических срезов в опытной группе.

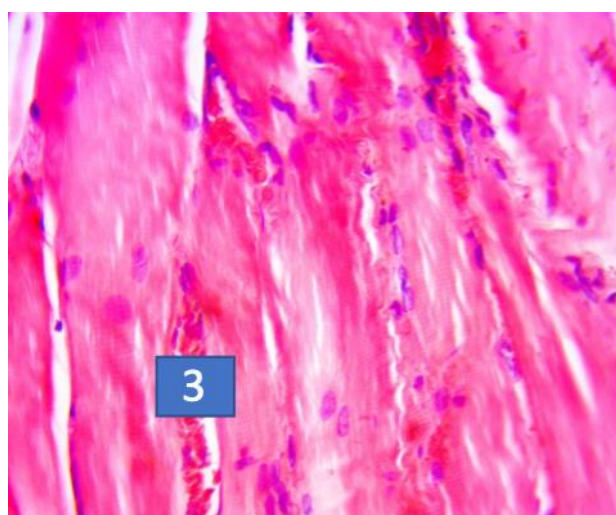
В экспериментальной группе – удалены магистральные артерии. Степень реактивности тканей очень высокая. Ярко выражены признаки воспалительного процесса: визуализируются преимущественно клетки воспаления, а в эпимизии выявляется интерстициальный отек. (рис. 14 А). Выявляется большое количество неокapилляров, локальные участки скопления клеток воспалительного ряда периневрально (рис. 14Б).



А



Б



В

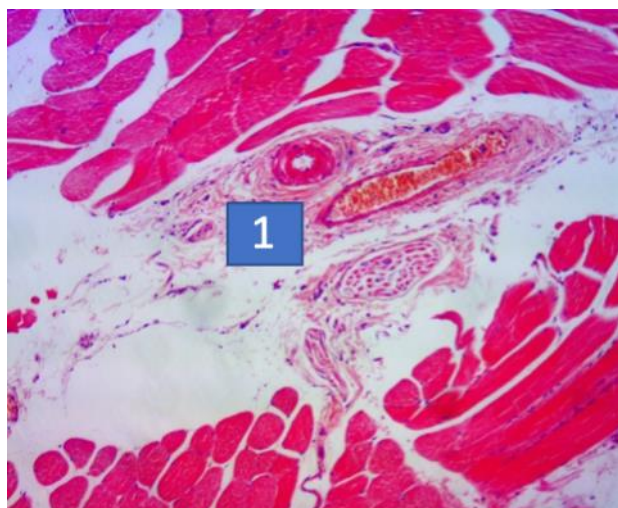
Рисунок 14. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе удаления магистральных сосудов и

пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x200 (А, Б), x400 (В).

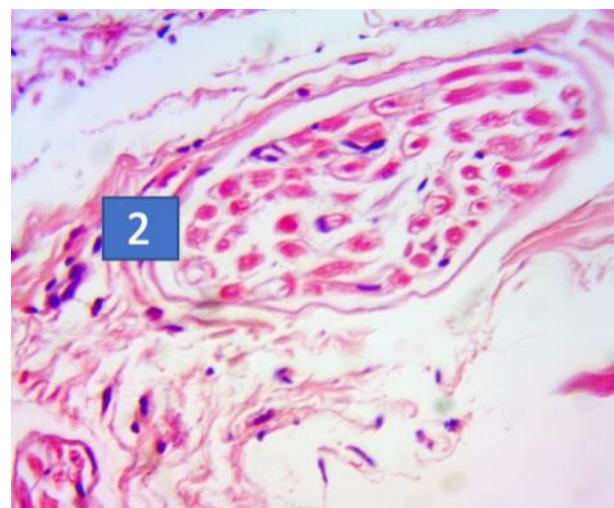
Где: (1) фибробласты и фиброциты, лимфоциты, моноциты, тучные клетки, единичные нейтрофилы и эозинофилы (2) новообразованные кровенаполненные кровеносные капилляры с признаками периваскулярной круглоклеточной инфильтрации, (3) расширенные кровеносные капилляры с признаками капилляростаза.

Следует отметить, что при более детальной микроскопии (при изучении под большим увеличением) были выявлены морфологические изменения в структуре самих симпластов, а также наличие в рыхлой волокнистой соединительной ткани эндомизия расширенных кровеносных капилляров с признаками капилляростаза (рис. 14В).

В глубоко расположенных между мышцами сосудисто-нервных пучках наблюдаются признаки воспалительной реакции. Периваскулярно и периневрально повышена клеточная плотность, преимущественно за счет лимфоцитов. В артериях утолщена мышечная оболочка, с признаками начинающегося фиброза. Вены расширены и кровенаполнены, их стенка тонкая. В периферических нервных стволах выражены признаки эндо- и периневрального отека, прослойки эндоневрия утолщены (рис. 15 А, Б).



А



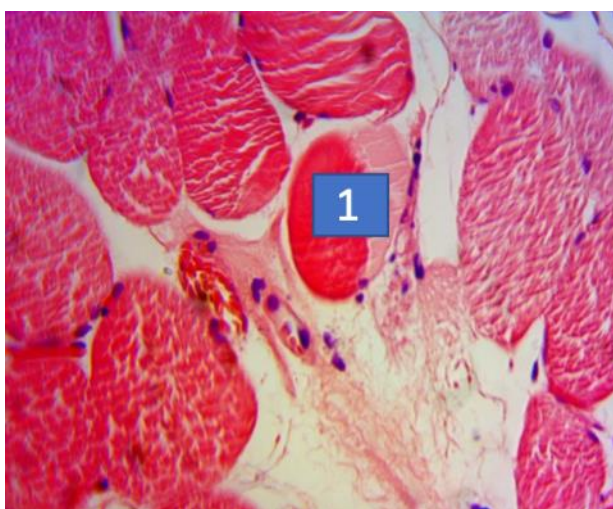
Б

Рисунок 15. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе удаления магистральных сосудов и

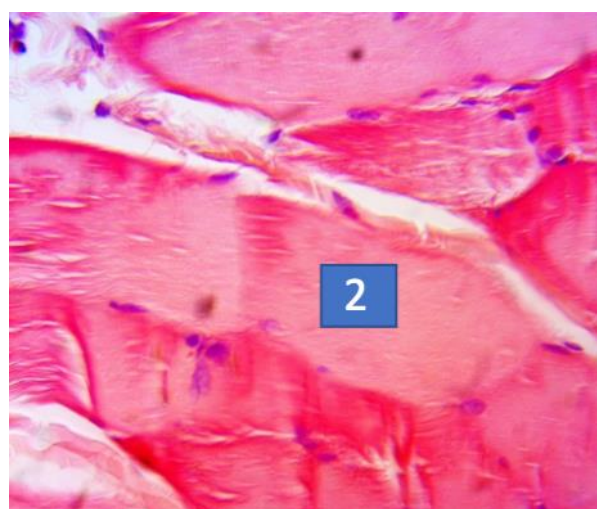
пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x200 (А), x400 (Б).

Где: (1) периваскулярно и периневрально повышенная клеточная плотность, преимущественно за счет лимфоцитов, (2) прослойки эндоневрия.

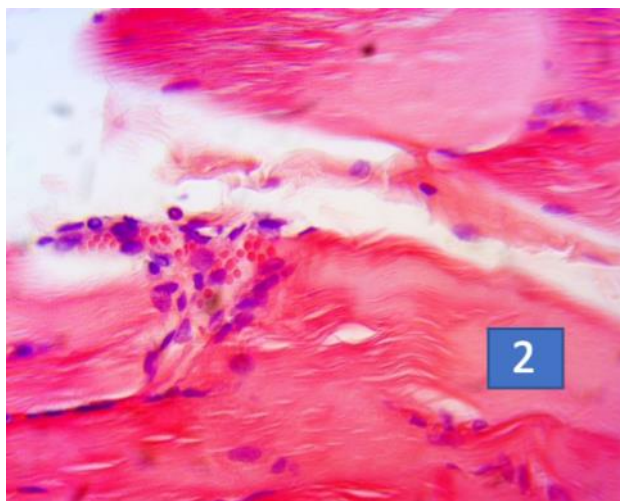
Ядра симпластов увеличенные в размерах и с измененной формой (с палочковидной или сигарообразной на овальную). В некоторых симпластах выявлены участки с признаками некротических изменений, саркоплазма окрашивается красителями неоднородно, на фоне яркой оксифилии визуализируются симпласты со слабо окрашенной саркоплазмой. В большинстве продольно срезанных мышечных волокон не определяется поперечная исчерченность на фоне хорошо визуализируемого отека и разволокнения коллагеновых волокон, образующих симпласты. Данные изменения наиболее выражены на поперечных срезах мышечных волокон (рис 16 А, Б, В).



А



Б

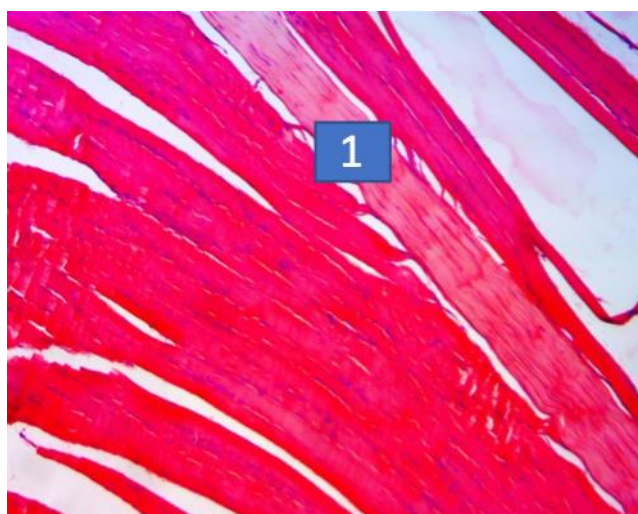


В

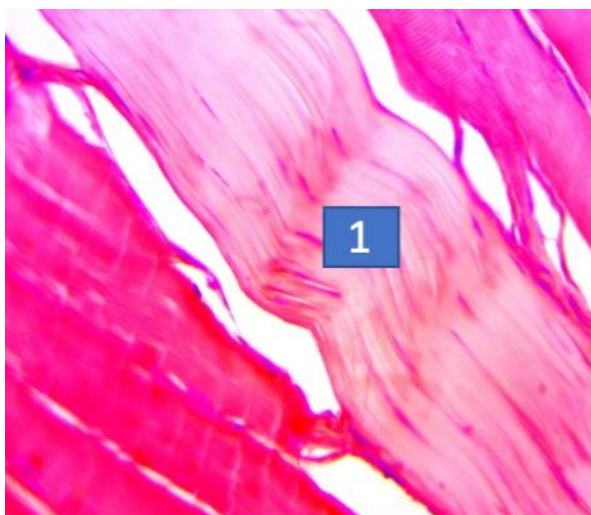
Рисунок 16. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе удаления магистральных сосудов и пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) участки с признаками некротических изменений, (2) отек и разволокнение коллагеновых волокон.

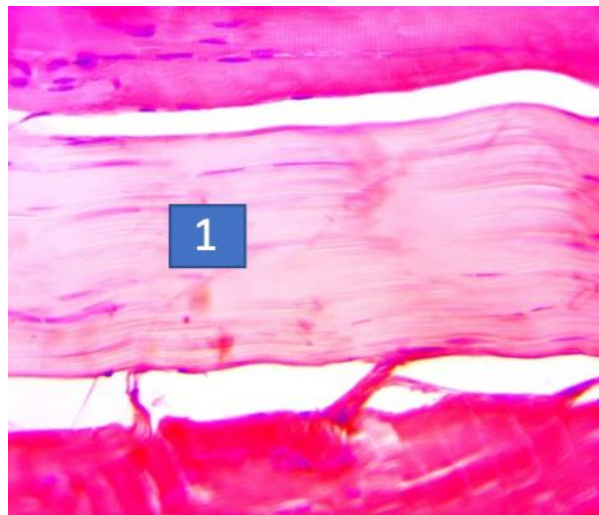
Так же, необходимо отметить, о наличии участков в продольно срезанной мышечной ткани, образованных несколькими симпластами с признаками некротических изменений, саркоплазма в которых не окрашивается, поперечная исчерченность не визуализируется, ядра с признаками кариопикноза и кариорексиса (рис. 17 А, Б, В).



А



Б

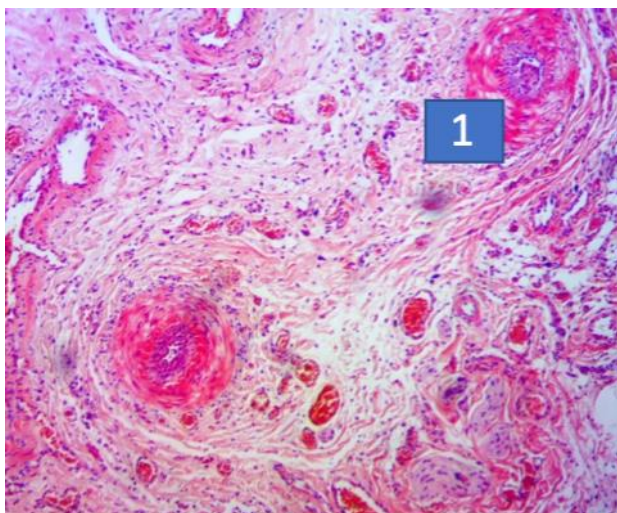


В

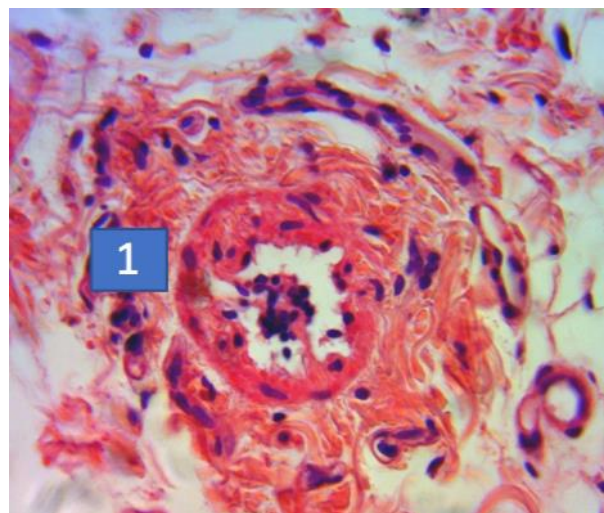
Рисунок 17. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе удаления сосудов и пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х200 (А), х400 (Б, В).

Где: (1) участки в продольно срезанной мышечной ткани, образованных несколькими симпластами с признаками некротических изменений, саркоплазма в которых не окрашивается, поперечная исчерченность не визуализируется.

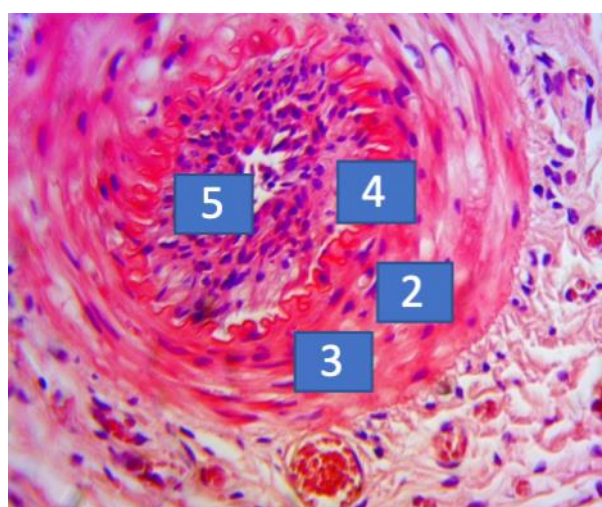
Следует отметить наличие ярко выраженных изменений в структуре глубоких сосудов. Во-первых, наблюдается большое количество новообразованных мелких сосудов, кровенаполненных с признаками тромбоза. Во-вторых, в стенке более крупных артерий выражены признаки гиалиноза и фиброза. Наличие дистрофических изменений в гладких миоцитах стенки сосуда. Внутренняя эластическая мембрана утолщена и резко структурирована. Со стороны интимы наблюдается гиперпролиферация ее клеток, приводящая к сужению просвета сосуда. Эндотелиоциты кубической формы, ось их клетки ориентирована перпендикулярно поверхности базальной мембраны. В некоторых кровеносных сосудах в адвентиции наблюдается гиперпролиферация фибробластов, приводящая к ее утолщению, а также имеет место быть большое количество новообразованных кровеносных сосудов микроциркуляторного русла (рис. 18 А, Б, В).



А



Б



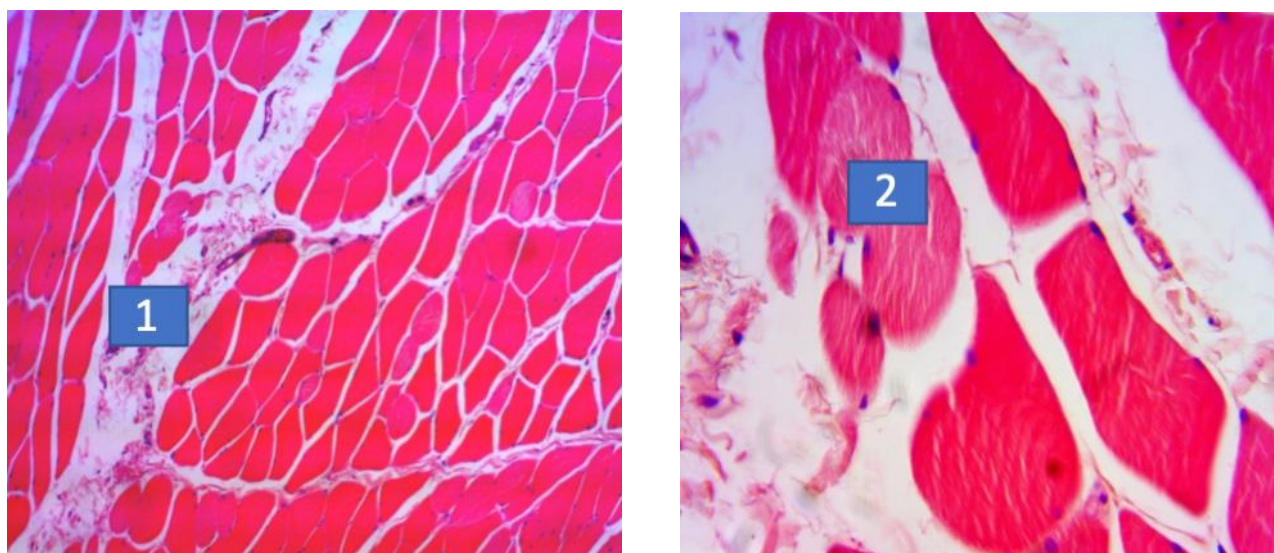
В

Рисунок 18. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе удаления магистральных сосудов и пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x200 (А), x400 (Б, В).

Где: (1) большое количество новообразованных мелких сосудов, кровенаполненных с признаками тромбоза, (2) выраженные признаки гиалиноза и фиброза в стенке крупных артерий, (3) дистрофические изменения в гладких миоцитах стенки сосуда, (4) внутренняя эластическая мембрана утолщена и резко структурирована, (5) гиперпролиферация клеток интимы приводящая к сужению просвета сосудов.

Микроскопическое изучение гистологических срезов в группе сравнения
В экспериментальной группе с удалением только сосуда степень выраженности морфологических изменений несколько ниже, чем в предыдущей группе

наблюдения. Между продольно и поперечно срезанными симпластами в прослойках соединительной ткани визуализируется круглоклеточная инфильтрация и выражены признаки интерстициального отека (рис. 19 А, Б). В единичных случаях встречаются поперечно срезанные симпласты со слабо окрашенной цитоплазмой, продольным разволокнением вплоть до коллагеновых фибрилл и отсутствием поперечной исчерченности.



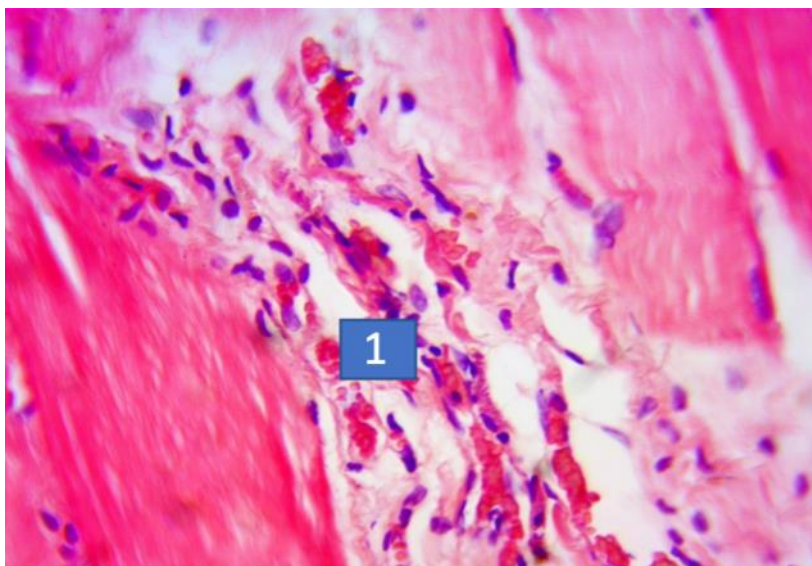
А

Б

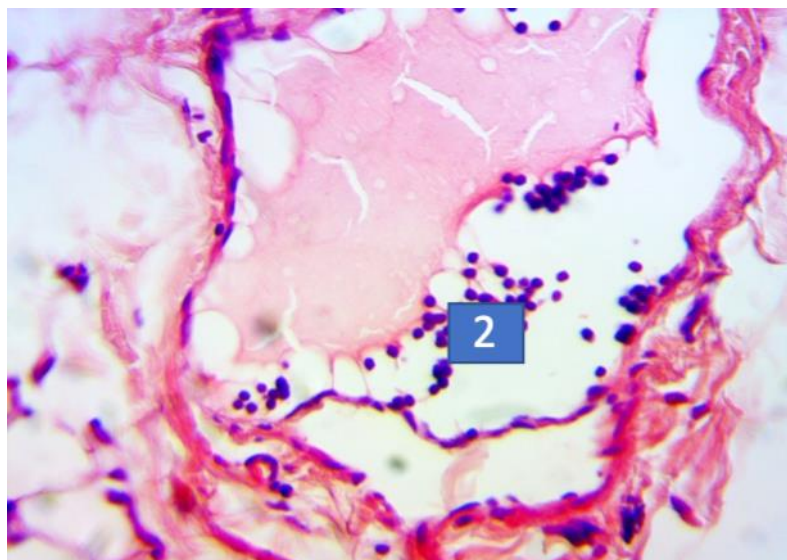
Рисунок 19. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе удаления артерий. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х200 (А), х400 (Б).

Где: (1) в прослойках соединительной ткани круглоклеточная инфильтрация и выраженные признаки интерстициального отека, (2) поперечно срезанные симпласты со слабо окрашенной цитоплазмой.

Обращает на себя внимание наличие большого количества кровенаполненных сосудов микроциркуляторного русла в прослойках эндомизия (рис. 20 А) и наличие расширенных тонкостенных вен с признаками краевого стояния лейкоцитов (рис. 20 Б).



А



Б

Рисунок 20. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе удаления артерий. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) большое количество кровенаполненных сосудов микроциркуляторного русла между симпластами в прослойках эндомизия, (2) расширенные тонкостенные вены с признаками краевого стояния лейкоцитов.

Резюме

Полученные результаты демонстрируют важность участия артериального русла, венозных сосудов и иннервации в процессах критической ишемии. Использование двух разных моделей ишемии позволяет достичь в одном случае минимально возможное количество осложнений, а в другом случае полностью воспроизвести клиническую картину, приближенную к таковой у пациентов с осложненным течением тяжелой критической ишемии и язвенно-некротическими изменениями, что позволяет использовать ее в качестве модели, позволяющей проводить достоверные доклинические исследования различных комбинаций лекарственных препаратов, и использовать полученные результаты уже в клинической практике [52].

3.2.2. Исследование влияния препаратов уденафил, пентоксифиллин и симвастатин в качестве монотерапии на уровень микроциркуляции и ангиогенез у лабораторных крыс

В группе с применением уденафила в качестве препарата монотерапии показатель уровня регионарного кровотока достоверно выше, чем в контрольной группе без проведенного лечения (таб. 14, 15).

Таблица 14

Результаты оценки уровня микроциркуляции в мышцах голени животных опытных групп ($M \pm m$) в перфузионных единицах

	21 сутки (n=10)	28 сутки (n=10)
Критическая ишемия + уденафил (группа 5)	394,6±5,99*	486,7±7,59*
	$p=8,25223 \times 10^{-12}$	$p=4,15537 \times 10^{-13}$
Критическая ишемия + пентоксифиллин (группа 6)	280,3±5,13*	348,1±5,36*
	$p=0,002589071$	$p=4,06245 \times 10^{-5}$
Критическая ишемия + симвастатин (группа 7)	382,6±4,3*	468,5±6,8*
	$p=5,84091 \times 10^{-12}$	$p=7,67418 \times 10^{-13}$

Примечания: * - $p < 0.05$ при сопоставлении с контрольной группой.

Таблица 15

Динамика показателей некроза в группах животных с различными типами лечения

№	Лечение	Площадь некроза, мм	
		21 день, n=10	28 день, n=10
1	Критическая ишемия (группа 4)	19,2	15,3
2	Критическая ишемия + уденафил (группа 5)	12,12	7,84
3	Критическая ишемия + пентоксифиллин (группа 6)	13,60	10,95
4	Критическая ишемия + симвастатин	9,96	8,14

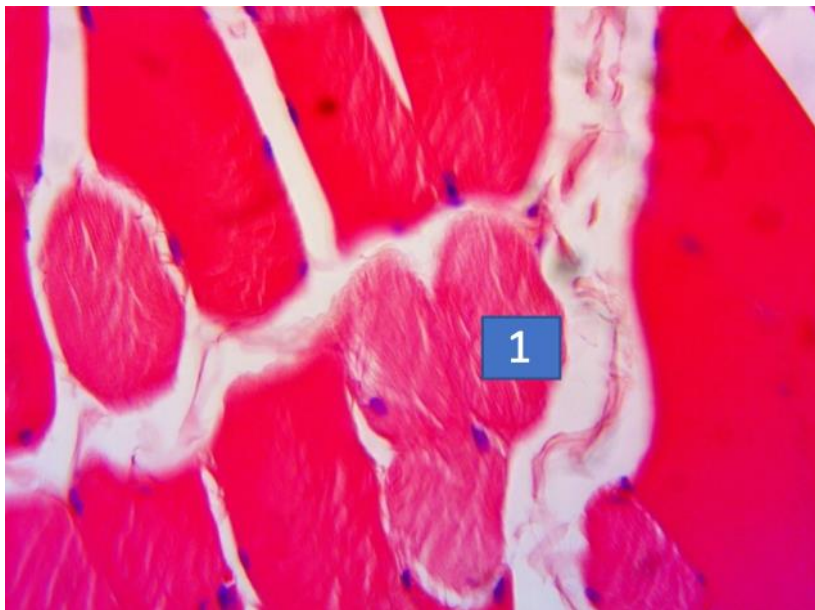


Рисунок 21. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с коррекцией критической ишемии конечности уденафилом. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) мелкие очаги атрофирующихся миоцитов с пролиферацией клеток.

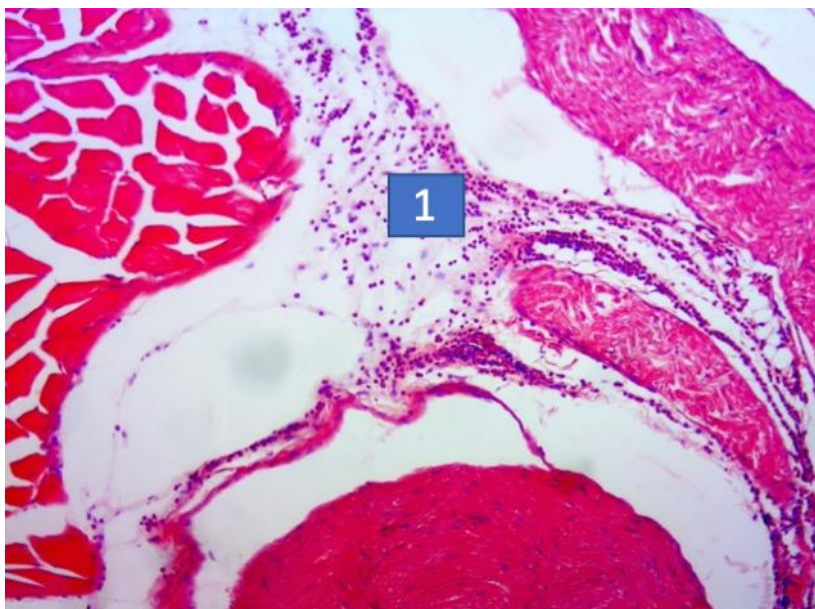


Рисунок 22. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с коррекцией критической

ишемии конечности пентоксифиллином. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) круглоклеточная инфильтрация прослоек соединительной ткани между скелетными мышцами

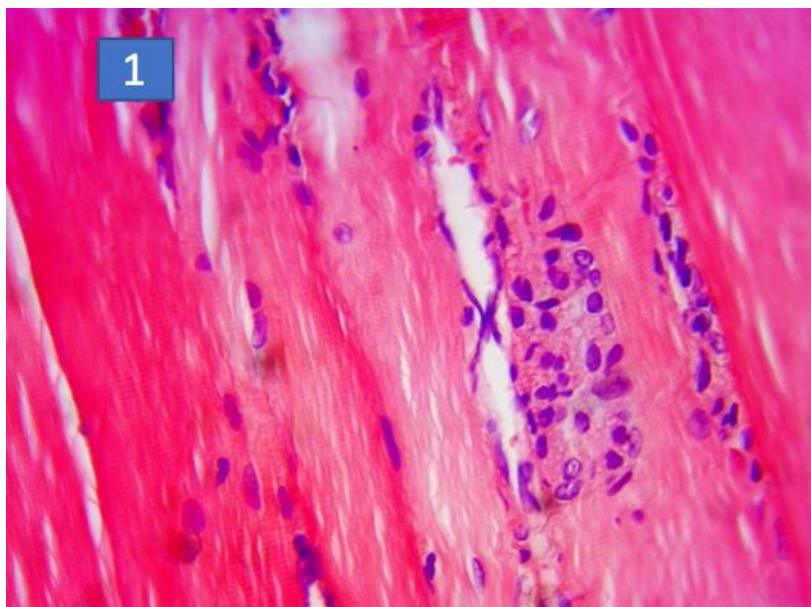


Рисунок 23. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе с коррекцией критической ишемии конечности симвастатином. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) расширенные мелкие кровеносные сосуды (артериолы и вены) с признаками тромбоза.

При микроскопии в группе уденафила встречались мелкие очаги атрофирующихся миоцитов с пролиферацией клеток. Продолжала сохраняться круглоклеточная инфильтрация прослоек соединительной ткани между мышцами. Мелкие кровеносные сосуды были расширены, с признаками тромбоза. Выявлялось уменьшение размера и количества участков некроза с формированием вблизи новой капиллярной сети и молодой соединительной ткани. (рис. 21). Гистологическая картина в группах пентоксифиллина и симвастина была подобной группе с применением уденафила, но следует отметить менее выраженное расширение мелких кровеносных сосудов особенно в группе с пентоксифиллином (рис. 22-23).

Уровень микроциркуляции в исследуемой группе постепенно приближался к значениям группы без проведенного вмешательства. Монокоррекция пентоксифиллином и симвастатином также положительно влияла на показатели микроциркуляции (рис. 24).

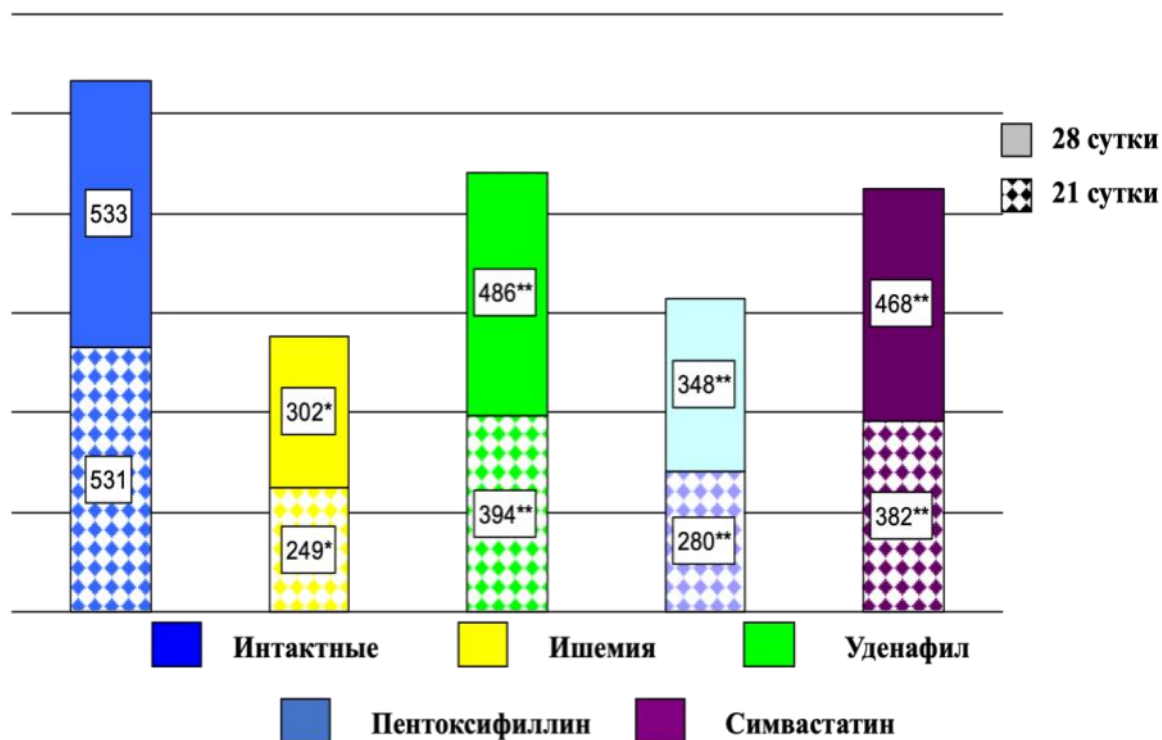


Рисунок 24. Уровень перфузии мышц голени у крыс в 1 и 4-7 экспериментальных группах выраженный в перфузионных единицах.

Примечания: *- $p < 0,05$ - в сравнении с интактными; ** - $p < 0,05$ - в сравнении с группой с критической ишемией мышц голени.

Резюме

Уровень микроциркуляции в группах с коррекцией критической ишемии конечности уденафилом, пентоксифиллином и симвастатином в качестве монотерапии на лабораторных крысах улучшился на фоне проводимой терапии, что продемонстрировало способность исследуемых препаратов в разной степени компенсировать возникшую в тканях ишемию ($p < 0,05$). При проведении гистологического исследования отмечалось формирование молодой соединительной ткани с замещением некроза и усиленное новообразование капилляров, подтверждающее результаты флоуметрии.

3.2.3. Исследование влияния применения уденафила в комбинации с симвастатином и пентоксифиллином на уровень микроциркуляции и ангиогенез у лабораторных крыс

Коррекция ишемии мышечной ткани с применением комбинации уденафила и симвастатина способствовала достоверному повышению уровня перфузии по сравнению с показателями группы контроля, на 28-е сутки данный показатель приближался к в группе интактных животных (таб. 16, 17) Коррекция ишемии с применением комбинации симвастатина и пентоксифиллина также демонстрировала эффективность, однако следует отметить, что уровень микроциркуляции в данной группе был несколько ниже, чем в группе с комбинированной коррекцией критической ишемии конечности уденафилом и симвастатином (рис. 25).

Таблица 16

Результаты оценки уровня микроциркуляции в мышцах голени животных опытных групп ($M \pm m$) в перфузионных единицах

	21 сутки (n=10)	28 сутки (n=10)
Критическая ишемия + уденафил + симвастатин (группа 8)	433,2±16,87*	538,6±9,75*
	$p=8,75884 \times 10^{-9}$	$p=8,48373 \times 10^{-14}$
Критическая ишемия + уденафил + пентоксифиллин (группа 9)	414,1±23,38*	526,7±6,62*
	$p=2,58104 \times 10^{-6}$	$p=3,54384 \times 10^{-15}$

*Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой.*

Таблица 17

Динамика показателей некроза в группах животных с различными типами
лечения

№	Лечение	Площадь некроза, мм	
		21 день, n=10	28 день, n=10
1	Критическая ишемия (группа 4)	19,2	15,3
2	Критическая ишемия + уденафил + симвастатин (группа 8)	8,80	7,08
3	Критическая ишемия + уденафил + пентоксифиллин (группа 9)	9,20	7,24

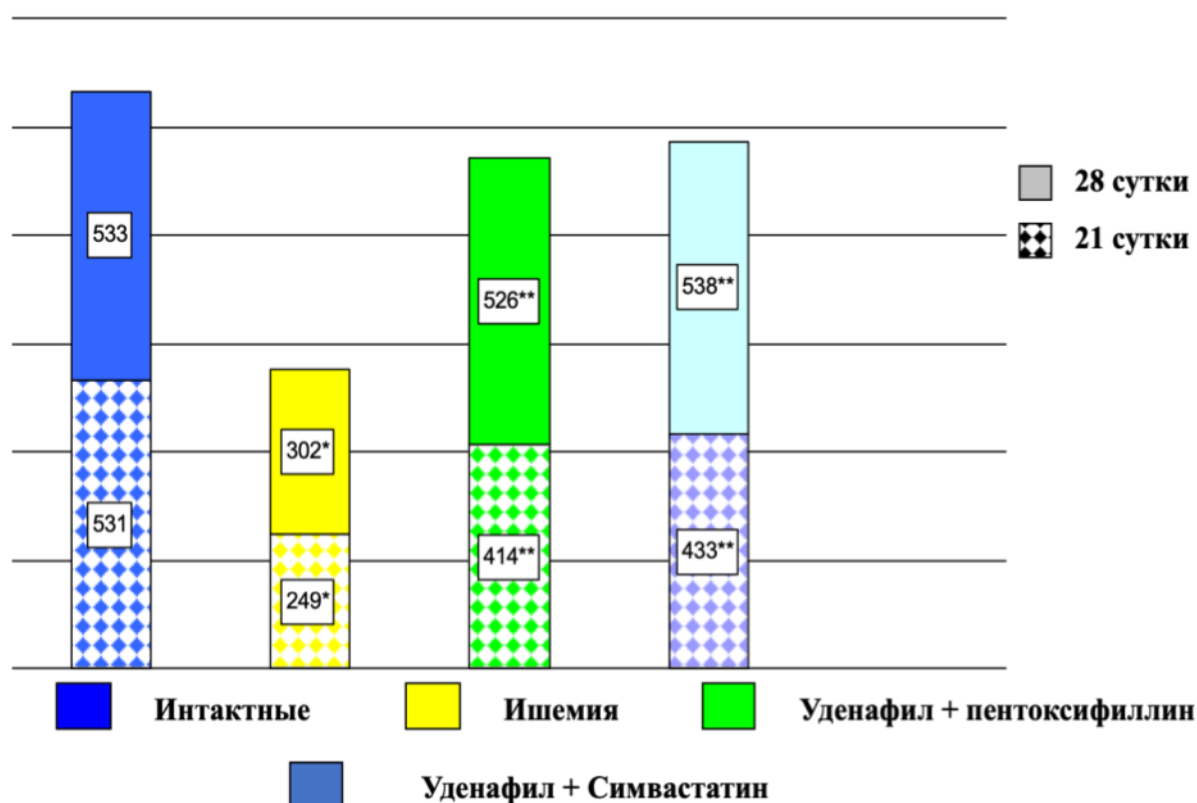


Рисунок 25 - Уровень перфузии мышц голени у крыс в 1,4,8,9 экспериментальных группах выраженный в перфузионных единицах.

Примечания: *- $p < 0,05$ - в сравнении с интактными; ** - $p < 0,05$ - в сравнении с группой с критической ишемией мышц голени.

Выраженность морфологических изменений в группе уденафила+ симвастатина была минимальной. Симпласты мышечных волокон имеют

однородную окраску саркоплазмы, определяются мелкие вытянутой формы расположенные по периферии мышечных волокон ядра. В прослойках соединительной ткани преобладают клетки фибробластического дифферона. Капилляры наполнены кровью, без признаков структурных нарушений. В широких прослойках соединительной ткани визуализируется большое количество новообразованных кровеносных сосудов, частично с признаками тромбоза. Можно считать, что у животных этой группы сформировалось новое микроциркуляторное русло (рис. 26).

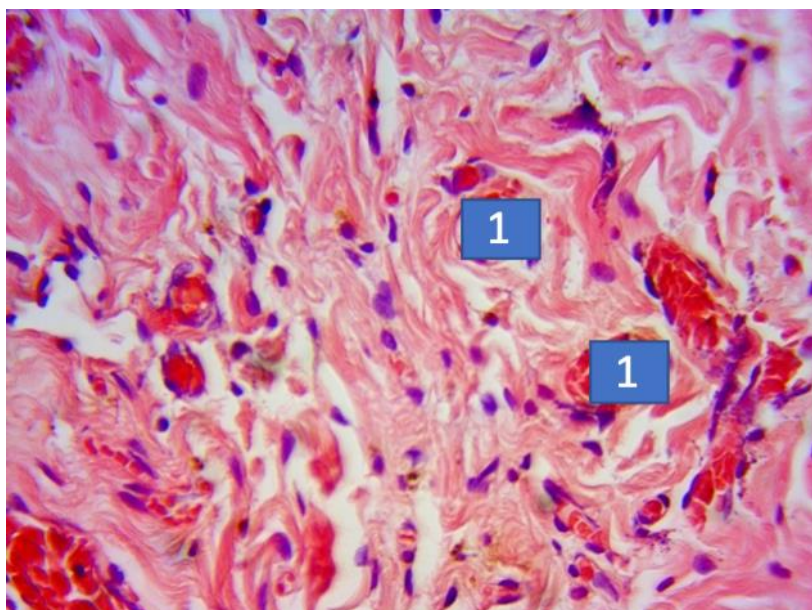


Рисунок 26. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе с коррекцией критической ишемии конечности уденафилом и симвастатином. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) большое количество новообразованных кровеносных сосудов с признаками тромбоза.

Гистологическая картина в группе уденафила+пентоксифиллина была подобна предыдущей группы, однако следует отметить сравнительно меньшее количество новообразованных кровеносных сосудов (рис. 27).

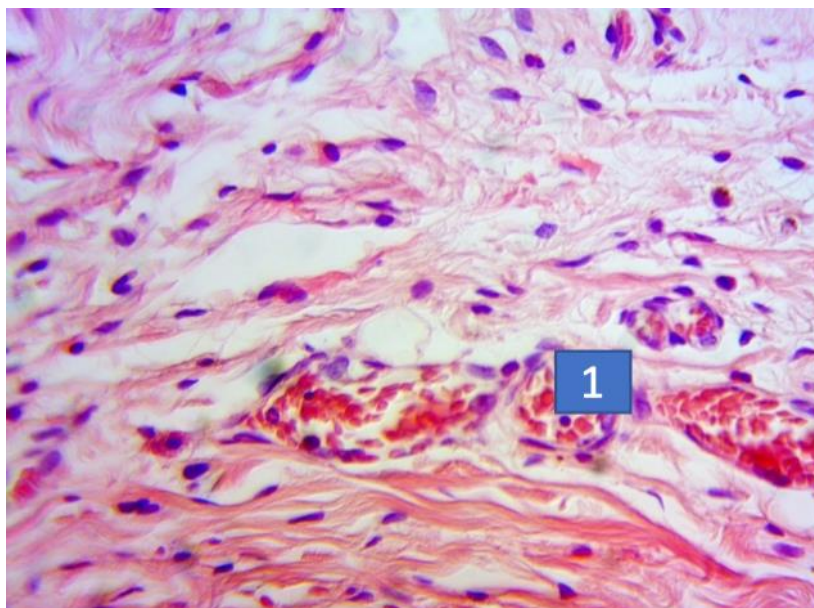


Рисунок 27. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с коррекцией критической ишемии конечности уденафилом и пентоксифиллином. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) новообразованные кровеносные сосуды.

Резюме

Уровень микроциркуляции в группах с коррекцией экспериментальной критической ишемии конечности уденафилом в сочетании с пентоксифиллином или симвастатином в качестве их комбинированного применения на лабораторных крысах показал значительное улучшение показателей.

Использование силденафила сопровождается определенными осложнениями, в дозировке 8,6 мг/кг, встречающихся с повышенной частотой. Предложенная в данном исследовании дозировка уденафила в комбинациях составляет 0,86 мг/кг позволяет даже превзойти уровень микроциркуляции, достигнутый с применением силденафила. Комбинированная терапия симвастатином и уденафилом также позволяет уменьшить дозу симвастатина до 0,86 мг/кг, а комбинация пентоксифиллина и уденафила также позволяет уменьшить дозу уденафила до 0,86 мг/кг и пентоксифиллина до 30 мг/кг. Помимо этого, применение комбинаций данных препаратов позволяет уменьшить курс лечения до 14 дней.

3.2.4. Изучение комбинированного применения уденафила, симвастатина, пентоксифиллина с однократной инъекцией мононуклеарной фракции собственного костного мозга на уровень микроциркуляции и ангиогенез у лабораторных крыс

В группе с монокоррекцией аутологичной мононуклеарной фракции костного мозга уровень регионарного кровотока приближался к уровню интактных животных, но не достигал целевых значений (таб. 19-20)

Таблица 18

Результаты оценки уровня микроциркуляции в мышцах голени животных опытных групп ($M \pm m$) в перфузионных единицах

	21 сутки (n=10)	28 сутки (n=10)
Критическая ишемия + МНФ костного мозга (группа 10)	401,3±10,9	504,8±8,5
	$p=8,42423 \times 10^{-10}$	$p=2,59479 \times 10^{-13}$
Критическая ишемия + уденафил + симвастатин + МНФ костного мозга (группа 11)	493,4±17,5	574,7±9,9
	$p=1,64722 \times 10^{-10}$	$p=8,15025 \times 10^{-15}$
Критическая ишемия + уденафил + пентоксифиллин + МНФ костного мозга (группа 12)	476,5±11,9	558,3±12,6
	$p=3,33547 \times 10^{-12}$	$p=8,52569 \times 10^{-12}$

*Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой.*

Таблица 19

Динамика показателей некроза в группах животных с различными типами лечения

№	Лечение	Площадь некроза, мм	
		21 день, n=10	28 день, n=10
1	Критическая ишемия (группа 4)	19,2	15,3
2	Критическая ишемия + МНФ костного мозга (группа 10)	8,43	7,02
3	Критическая ишемия + уденафил + симвастатин + МНФ костного мозга (группа 11)	7,99	6,87
4	Критическая ишемия + уденафил + пентоксифиллин + МНФ костного мозга (группа 12)	7,72	6,63

Вокруг некротических участков формировалась новая капиллярная сеть, сами они уменьшались в количестве и в размере, однако сохранялась круглоклеточная инфильтрация соединительной ткани. Мелкие кровеносные сосуды расширены, выявляются признаки тромбоза. Продолжали выявляться локальные участки с недостаточно прокрашенной саркоплазмой и отсутствием поперечной исчерченности. Клетки фибробластического ряда преобладали, визуализировались единичные лимфоциты. В прослойках между симпластами гипертрофированных тучных клеток, находящихся в стадии накопления секрета и дегрануляции (рис. 28).

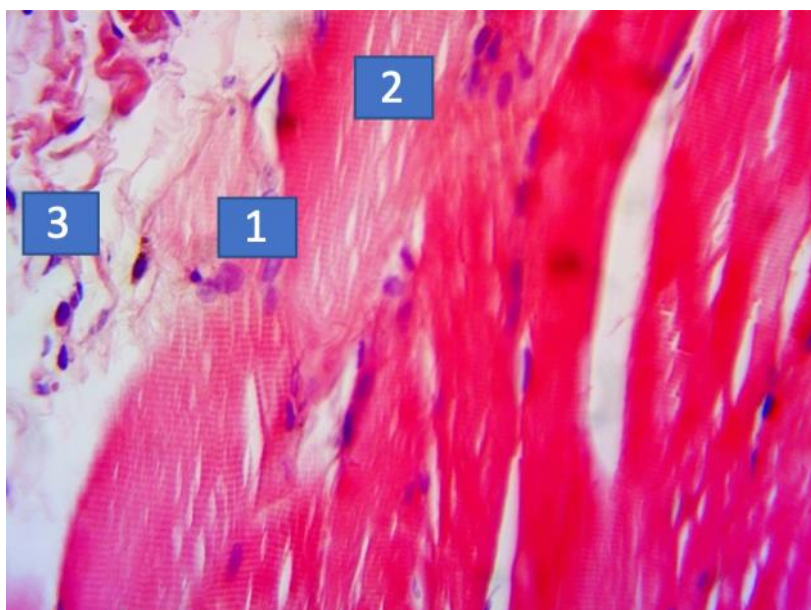


Рисунок 28. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе с однократной инъекцией МНФ собственного костного мозга. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x400.

Где: (1) круглоклеточная инфильтрация прослоек соединительной ткани между скелетными мышцами, (2) локальные участки с недостаточно прокрашенной саркоплазмой и отсутствием поперечной исчерченности, (3) в прослойках между симпластами гипертрофированные тучные клетки находящиеся в стадии накопления секрета и дегрануляции.

В группе с комбинированной коррекцией уденафилом, симвастатином и однократной инъекции МНФ собственного костного мозга уровень кровоснабжения ишемизированной мышцы почти догонял таковой у интактный животных на 21 день, а на 28-е сутки достигал его (рис. 29).

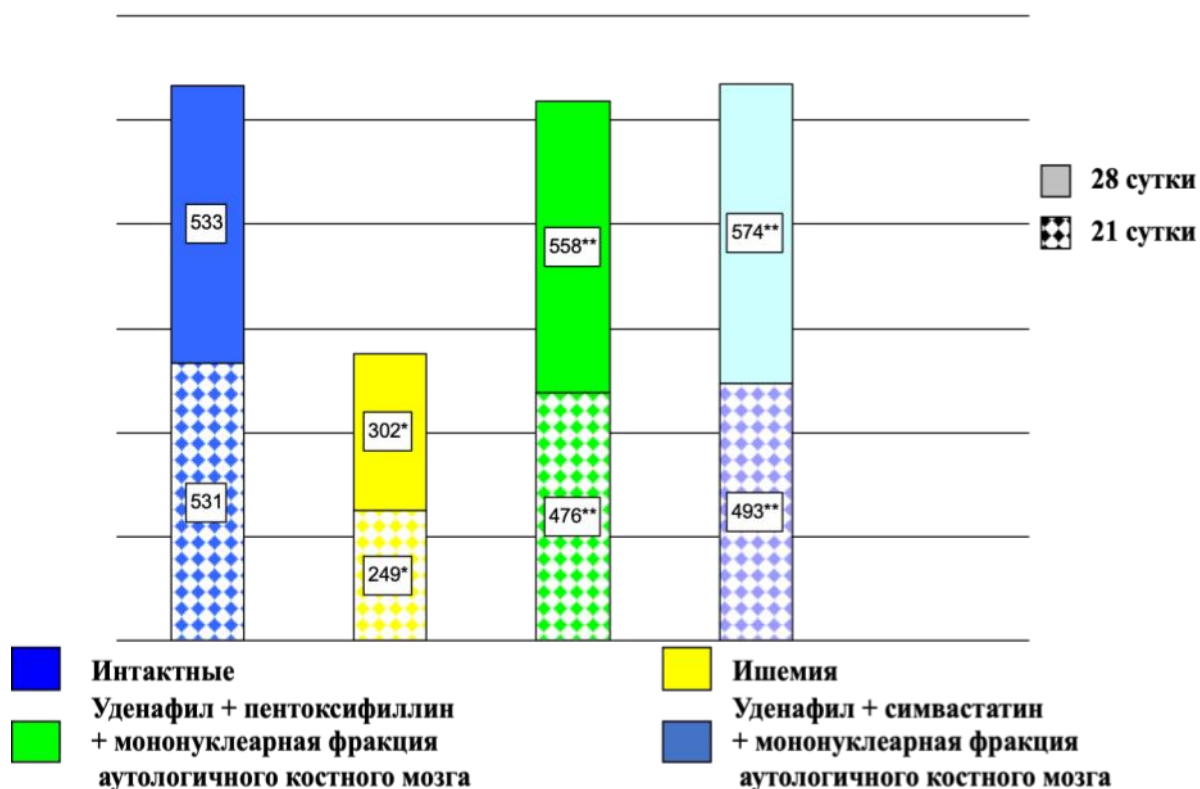


Рисунок 29. Уровень перфузии мышц голени у крыс в 1,4,11,12 экспериментальных группах выраженный в перфузионных единицах.

*Примечания: *- p < 0,05 - в сравнении с интактными; ** - p < 0,05 – в сравнении с группой с критической ишемией мышц голени.*

Степень выраженности морфологических изменений в данной группе была минимальной, среди всех групп наблюдения. В прослойках соединительной ткани плотность клеток низкая, в поле зрения преобладают клетки фибробластического дифферона. Тучные клетки мелкие, преимущественно в стадии накопления секрета, лимфоциты единичные. Мелкие кровеносные сосуды кровенаполнены, без признаков структурных нарушений. В широких прослойках соединительной ткани визуализируется большое количество новообразованных кровеносных сосудов с признаками тромбоза. Визуализируемые крупные кровеносные сосуды без выраженных структурных изменений. (рис. 30).

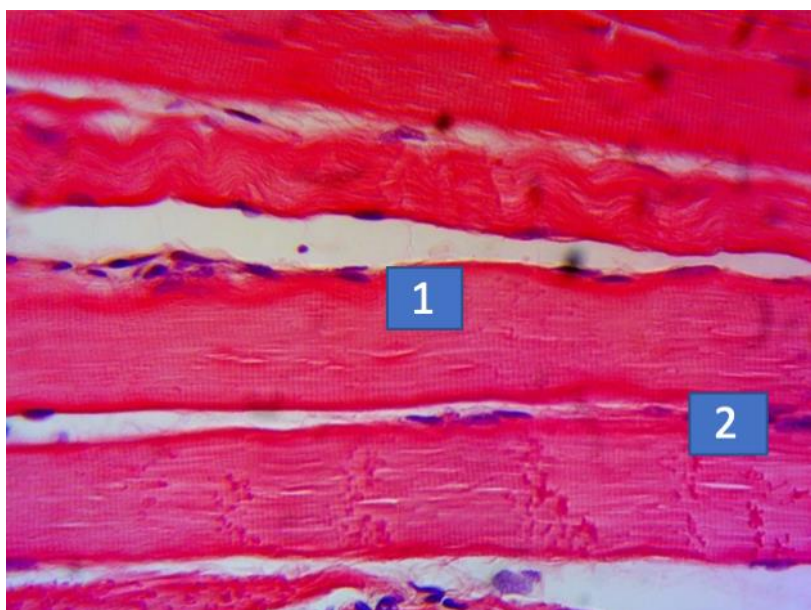


Рисунок 30. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с комбинированной коррекцией уденафилом, симвастатином и однократной инъекцией МНФ собственного костного мозга. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x400.

Где: (1) симпласты мышечных волокон имеющие однородную окраску саркоплазмы, (2) мелкие вытянутой формы расположенные по периферии мышечных волокон ядра.

В группе с комбинированным применением уденафила, пентоксифиллина и однократной инъекцией МНФ собственного костного мозга также, как и в предыдущей группе, уровень кровоснабжения ишемизированной мышцы почти догонял таковой у интактных животных на 21 день, а на 28-е сутки достигал его, однако был несколько ниже, чем в группе с коррекцией уденафилом и пентоксифиллином с дополнительной коррекцией моноклеарной фракцией собственного костного мозга. Степень выраженности морфологических изменений в данной группе было аналогично предыдущей исследуемой группе (рис. 31)

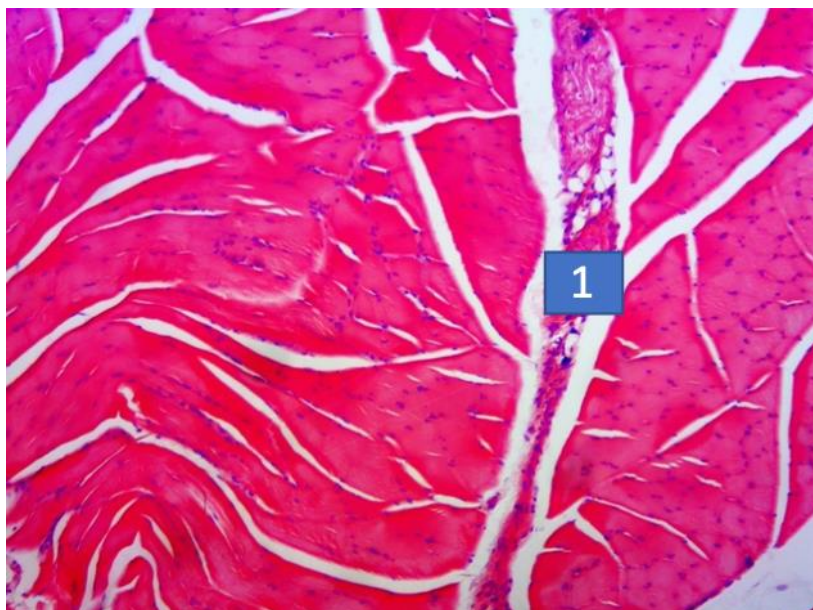


Рисунок 31. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с с комбинированной коррекцией уденафилом, пентоксифиллином и однократным параэнтеральным введением моноклеарной фракцией собственного костного мозга. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

Где: (1) новообразованные кровеносные сосуды с признаками тромбоза.

Уровень микроциркуляции в группах с коррекцией критической ишемии конечности уденафилом и пентоксифиллином, уденафилом и симвастатином с однократной инъекцией МНФ собственного костного мозга демонстрировал крайне обнадеживающий результат терапии. Степень выраженности изменений, отслеживаемая при помощи гистологического изучения, была минимальной в группе применения уденафила и симвастатина в сочетании с терапией клетками костного мозга. Такая методика позволяет помимо уменьшения суточных доз, также уменьшить курс длительность лечения до 7 дней.

Резюме

Комбинированное применение уденафила, симвастатина, пентоксифиллина с дополнительной однократной инъекцией МНФ собственного костного мозга по предложенной нами методике позволяет добиться синергичного эффекта взаимодействия препаратов, и уменьшить их дозировку, а также длительность лечения.

Полученные данные делают перспективным дальнейшее изучение применения описанных комбинаций для лечения пациентов с тяжелой ишемией нижних конечностей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемия органов и тканей является важным фактором, играющим роль в патогенезе широкого спектра заболеваний, в том числе сердечно-сосудистой системы. Заболевания данной группы часто бывают причинами инвалидизации населения, в связи с чем исследование методов компенсации ишемии остается важной задачей.

Актуальной проблемой является отдаленный прогноз пациентов с хронической ишемией, долгое течение которой в конечном итоге может привести к критической ишемии нижних конечностей (КИНК).

Однако важно понимать, что существует множество причин, приводящих к критической ишемии. Атеросклероз артерий при долгом течении является одной из ведущих причин нарушения кровоснабжения. К другим причинам, приводящим к нарушению кровоснабжения, является тяжелая венозная недостаточность, вызванная тромбозом магистральных вен и приводящая к тотальному нарушению оттока и, как следствие, притока [94].

При тяжелом поражении артериального русла, когда выполнение того или иного оперативного вмешательства сопряжено с рисками низкой эффективности, высокого хирургического риска или невозможности вмешательства, возможно использование иных методов реваскуляризации

Таким образом, консервативное лечение, применяемое у пациентов с ХИНК, является перспективным направлением, поскольку позволяет оказывать влияние на артериальный кровоток и стимулировать торможение процессов, связанных с окклюзионным поражением. Важно понимать, что критическая ишемия нижних конечностей часто может приводить к тяжелым осложнениям. Отсутствие лечения может в короткие сроки привести к полной потере функции конечности, появлению язвенно-некротических поражений и инвалидизации, приводящей к значительному снижению качества жизни пациентов.

Коррекция критической ишемии с использованием консервативной терапии редко бывает достаточно эффективной для того, чтобы не только затормозить процессы ишемии тканей, но и восстановить в определенной степени нормальное их кровоснабжение, несмотря на наличие множества препаратов, способных в той или иной степени влиять на патогенез ишемических нарушений. Некоторые из существующих препаратов также способствуют стимуляции развития коллатерального кровотока, что в условиях ишемии является жизненно важным для поврежденных тканей [60]. Упомянутые методы имеют определенные ограничения и демонстрируют крайне умеренную эффективность, поскольку восстановление адекватного кровоснабжения без прямой реваскуляризации практически невозможно. Метод консервативного лечения, способный хотя бы частично восстановить адекватный уровень кровоснабжения в условиях хронической ишемии, в настоящее время не найден. В связи с этим важно продолжить поиск препаратов или их комбинаций, применение которых позволит улучшить состояние пациентов с данной патологией.

В клинической части исследования полученные данные применения консервативных методов лечения в сочетании с непрямой реваскуляризацией у пациентов с невозможностью проведения реваскуляризирующего вмешательства продемонстрировали неутешительные результаты. В связи с этим большинство пациентов с критической ишемией теряет конечность в сроки до 3 лет. В наших исследованиях консервативная терапия критической ишемии нижних конечностей с применением симвастатина в дозировке 20 мг в сочетании с реваскуляризирующей остеотрепанацией позволяет сохранить пораженную конечность только у 15% больных и при условии наличия проходимых берцовых артерий.

Для поиска наилучшего препарата или их комбинации в целях лечения критической ишемии консервативными методами необходимо проведение доклинических исследований препаратов на животных в условиях моделирования критической ишемии конечности, максимально приближенной

к таковой у человека, с последующей оценкой их эффективности. В настоящее время самостоятельное применение препаратов в монотерапии демонстрирует неэффективный результат, в связи с чем требуется не только изучение дополнительных препаратов, но создание их комбинаций для более эффективного использования у данной когорты пациентов.

В литературе описан ряд методов, позволяющих на лабораторных животных смоделировать острую и хроническую ишемию конечностей, однако ни один из них не позволяет достоверно воспроизвести явления критической ишемии с сопутствующими ей осложнениями. Созданная модель, направленная на полную перевязку артериального русла у лабораторных животных, позволяла в определенной мере имитировать явление критической ишемии, однако через определенное время острая ишемия переходила в хроническую, без возникновения язвенно-некротических изменений. Схожая картина была получена при попытках перевязывать не только артерии, но и вены у исследуемых животных, однако наличие «*vasa vasorum*» позволяло в определенной степени компенсировать явление ишемии, в связи с чем трофические изменения не наступали.

Важно иметь правильное представление о течении патогенеза критической ишемии, поскольку это позволит правильно понимать происходящие процессы и, таким образом, воспроизводить их. Безусловно, одним из главных звеньев данной патологии является обструкция артериального русла, приводящая к нарушению поступления оксигенированной крови и, как следствие, тотальная ишемия конечностей. Однако важно также понимать, что явления ишемии затрагивают не только мышечную ткань, но и ткань нервов, иннервирующих конечность, что приводит к ишемической нейропатии. Необратимые изменения на фоне гипоксии в них происходят в течение нескольких часов, что приводит к выраженному нарушению функции конечности. Важным звеном патогенеза также является нарушение венозного оттока из конечности в связи с отсутствием движущей силы и снижения

давления в артериальном русле, что приводит к застою крови и соответствующим этому явлению изменениям.

Таким образом, важно понимать, что явление критической ишемии не ограничивается одним звеном патогенеза, но является сложным процессом, затрагивающим сосудисто-нервный пучок и вовлекающим в патологический процесс все ткани нижних конечностей. Именно поэтому в предложенной нами модели важно было не только полное прекращение артериального кровотока, но и нарушение венозного оттока с дополнительным пересечением основного нервного пучка, который явился седалищный нерв. Разработанная оригинальная модель позволила наконец более достоверно и точно имитировать тяжелую критическую ишемию с сопутствующими ей осложнениями, что позволяет максимально точно изучать влияние того или иного метода лечения и делать выводы о его эффективности [51].

Коррекция критической ишемии с использованием консервативной терапии редко бывает достаточно эффективной для того, чтобы не только затормозить процессы ишемии тканей, но и восстановить в определенной степени нормальное их кровоснабжение, несмотря на наличие множества препаратов, способных в той или иной степени влиять на патогенез ишемических нарушений. Некоторые из существующих препаратов также способствуют стимуляции развития коллатерального кровотока, что в условиях ишемии является жизненно важным для поврежденных тканей. Упомянутые методы имеют определенные ограничения и демонстрируют крайне умеренную эффективность, поскольку восстановление адекватного кровоснабжения без прямой реваскуляризации практически невозможно. Метод консервативного лечения, способный хотя бы частично восстановить адекватный уровень кровоснабжения в условиях хронической ишемии, в настоящее время не найден. В связи с этим важно продолжить поиск препаратов или их комбинаций, применение которых позволит улучшить состояние пациентов с данной патологией.

Использование статинов в качестве первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых событий позволило значительно улучшить прогноз таких пациентов. Статины характеризуются высоким уровнем эффективности и безопасности, что обуславливает их широкое применение. Статины действуют на одно из главных звеньев патогенеза атеросклероза, а именно на повышенный уровень липопротеидов низкой плотности в крови. Снижение данного показателя уже многие годы считается эффективным методом, позволяющим улучшить исходы лечения. Помимо основного эффекта, исследование статинов позволило также открыть их противовоспалительные свойства: обнаружено снижение уровня медиаторов воспаления, включая фактор некроза опухоли-а (ФНО-а), интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и интерлейкин-8 (ИЛ-8). Дальнейшие исследования могут доказать их эффективность при использовании в группе пациентов с хронической артериальной недостаточностью и, возможно, критической ишемией. Учитывая широкий спектр действия препаратов данной группы, польза от их использования несомненна.

В результате проведенного исследования у пациентов применения симвастатина в качестве монотерапии было продемонстрировано влияние статинов на течение процессов критической ишемии. При изучении показателей микроциркуляции с использованием перфузионных единиц на 28 сутки эксперимента, выявлено благоприятное действие статинов на уровень перфузии с повышением показателей в 1,5 раза (по сравнению с группой контроля). Подобное влияние нашло свое отражение в том числе и на гистологическом исследовании и приводило к уменьшению площади некротических изменений. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что стимуляция ангиогенеза и противовоспалительный эффект при применении статинов могут наблюдаться даже в условиях критической ишемии, что позволяет в некоторой степени компенсировать возникшую ишемию. Ангиогенез выявлялся во всех группах, однако в группе симвастатина было выявлено более скорое образование новой капиллярной сети вокруг очагов

некроза. Следует отметить еще один эффект, отмеченный в ходе исследования: как было сказано ранее, влияние статинов на клетки воспаления позволяет снизить их скопление, что позволяет более интенсивно формировать соединительную ткань благодаря высокой концентрации фибробластов и фиброцитов в локализации некротических изменений. Полученные в ходе гистологического исследования данные позволили отметить скопление клеток воспаления в контрольной группе, что вполне характерно для очагов некроза, в основной группе преобладали клетки, способствующие пролиферации и росту соединительной ткани.

Компенсировать возникшую ишемию позволяют процессы неангиогенеза, стимуляция которых происходит благодаря выделению клетками мышечной ткани медиаторов, привлекающих клетки-предшественники из костного мозга. Способствовать этому процессу можно путем искусственного введения специально отфильтрованной фракции клеток костного мозга, что позволяет в определенной степени способствовать данным компенсаторным механизмам. Важно понимать, что для любого ангиогенеза в том или ином виде требуется перфузия, из этого был сделан вывод, что эффективность применения моноклеарной фракции напрямую зависит от степени гипоксии: чем тяжелее нарушения кровоснабжения, тем дольше протекает данный процесс. Полученные в ходе проведения клинических исследований данные позволили дополнительно убедиться в данном утверждении: новая микроциркуляторная сеть на фоне тяжелой ишемии не успевала развиваться, что приводило к отмираю тканей нижней конечности и дальнейшей ампутации. Улучшение перфузии, достигнутое с использованием симвастатина, позволило усилить эффективность реваскуляризирующей остеотрепанации, однако это привело лишь к торможению процессов, вызванных ишемией, но не их регрессу. Схожая картина была получена при проведении опыта однократной инъекции моноклеарной фракции собственного костного мозга, что привело к образованию ростков соединительной ткани и улучшению в некоторой степени перфузии, однако без

роста капиллярной сети, что позволило сделать вывод о целесообразности сочетания терапии МНФ костного мозга с препаратами, усиливающими приток крови, что позволяет добиться большей эффективности процессов неоангиогенеза в ишемизированных тканях.

Ингибиторы фосфодиэстеразы-5 (силденафил, уденафил) уже долгое время применяются для коррекции эректильной дисфункции благодаря своим вазодилатирующим свойствам. Дальнейшее их изучение, в частности их использование силденафила для коррекции ишемии мышечной позволило получить обнадеживающие результаты. Другой препарат из данной группы, уденафил, в отличие от своего предшественника, обладает меньшим количеством побочных эффектов, в частности не вызывает расстройства зрения. Предстоит более тщательное изучение эффективности данного препарата в целях коррекции ишемических изменений.

Проведенное нами исследование применения уденафила в качестве монотерапии критической ишемии на крысах показало эффективность данного препарата. Известно, что ингибиторы ФДЭ-5 позволяют в некоторой степени регулировать действие NO-синтазы, что способствует усилению выделения клетками эндотелия оксида азота и, таким образом, улучшению перфузии и ангиопротективному действию. Гистологические исследования подтвердили данные сведения, продемонстрировав развитие новой капиллярной сети в ишемизированных тканях, что характеризовалось увеличением показателей перфузии. Важно понимать, что применение уденафила в качестве монотерапии может быть недостаточно эффективным, в связи с чем следует исследовать его взаимодействие с другими методами.

Применение лекарственных препаратов, способствующих улучшению перфузии тканей, способно усилить эффективность применения моноклеарной фракции костного мозга. Такой вывод был сделан после попыток применения данного метода совместно с препаратами, используемыми для коррекции ишемии тканей. Нами были исследованы различные дозировки и частота применения препаратов в целях выявления минимальной

эффективной дозировки, что позволило значительно снизить частоту возникновения побочных эффектов, при этом не теряя пользы от применения препаратов.

Из препаратов с противовоспалительным и антиоксидантным действием для исследования в качестве монотерапии и для комбинированного применения нами был выбран пентоксифиллин, давно зарекомендовавший себя как способный улучшить перфузию мышечной ткани и используемый при различных клинических случаях, в том числе и с кардиопротективной целью.

В нашем исследовании пентоксифиллин (60 мг/кг) в качестве монотерапии показал себя хуже, чем уденафил (8,6 мг/кг) и симвастатин (1,71 мг/кг), однако комбинации данного препарата также позволили снизить суточную и курсовую дозу уденафила и симвастатина с усилением уровня микроциркуляции крови в зоне ишемии и более благоприятной гистологической картиной.

Анализ современной литературы и полученных в ходе клинического наблюдения данных привели нас к исследованию различных комбинаций препаратов в целях улучшения перфузии тканей и повышения эффективности уже существующих способов. Использование комбинации вышеперечисленных препаратов, влияющих на разные звенья патогенеза ишемического повреждения в сочетании с моноклеарной фракцией костного мозга, позволило добиться максимально эффективного ответа на проведенную терапию, показатели перфузии после проведения такого лечения стремительно приближались к таковым у интактных животных уже спустя месяц после начала лечения. Разработанный метод введения МНФ костного мозга позволил получить максимальный эффект от проведенного вмешательства с раскрытием коллатерального русла и стимулированием процессов неоангиогенеза.

Учитывая полученные экспериментальные данные, необходимо проведение дальнейших клинических исследований продемонстрированных комбинаций препаратов. Каждый из предложенных препаратов имеет свои преимущества и недостатки, поэтому комбинированное их использование

позволяет не только уменьшить их общую дозировку, но и добиться их взаимодействия с получением максимального эффекта от лечения. Для некоторых пациентов такое лечение может стать единственным средством для сохранения конечности и избежания ампутации.

ВЫВОДЫ

1. Консервативная терапия критической ишемии нижних конечностей с применением симвастатина в дозировке 20 мг в сочетании с реваскуляризирующей остеотрепанацией позволяет сохранить пораженную конечность у 15% больных при наличии проходимых берцовых артерий.

2. Разработанная оригинальная модель создания критической ишемии позволяет достоверно имитировать язвенно-некротические осложнения, часто встречающиеся у пациентов на фоне данной патологии, и более точно оценивать эффективность возможных методов коррекции тяжелой ишемии.

3. Разработанный способ введения моноклеарной фракции собственного костного мозга позволяет максимально вовлечь ранее не задействованные коллатеральные сосуды и улучшить перфузию конечностей и, таким образом, способствует процессам неоангиогенеза.

4. Монотерапия с использованием уденафила/симвастатина продемонстрировала более эффективную степень коррекции критической ишемии нижних конечностей в виде улучшения показателей инструментальной диагностики по сравнению с монотерапией пентоксифиллином.

5. Комбинированное применение уденафила с симвастатином и уденафила с пентоксифиллином позволяет компенсировать признаки хронической ишемии конечности и уменьшить дозу уденафила и симвастатина до 0,86 мг/кг, а также пентоксифиллина до 30 мг/кг и длительность лечения до 14 дней.

6. Комбинированное применение уденафила с симвастатином и уденафила с пентоксифиллином в сочетании с однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга на 7-е сутки после начала эксперимента позволяют уменьшить суточные дозы препаратов и длительность лечения до 7 дней. Комбинация уденафила, симвастатина и введения моноклеарной фракции продемонстрировала наибольшую эффективность и позволила достичь наименьшей степени морфологических

изменений мышечной ткани в условиях критической ишемии и компенсировать признаки хронической ишемии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациентов с тяжелым поражением артериального русла и невозможности выполнения реваскуляризирующего вмешательства на фоне критической ишемии применение непрямых методов реваскуляризации (симвастатина 20 мг 1 раз в сутки в сочетании с реваскуляризирующей остеотрпанацией), при наличии проходимых артерий голени позволяет сохранить пораженную конечность в 15% случаев.

2. Моделирование экспериментальной критической ишемии конечности заключается в следующем. Перед началом эксперимента все животные погружались в наркоз. В брюшной полость вводился раствор хлоралгидрата в расчете 300 мг/кг. После подготовки места вмешательства – сбривание шерсти и санация, выполнялся разрез конечности с целью обнажить основной сосудисто-нервный пучок. Проекция разреза: от паховой складки до стопы по внутренней стороне конечности. Производилось выделение бедренных, подколенных и берцовых артерий и вен на всем протяжении. Все коллатеральные сосуды пересекали и лигировали. Ретроградного кровотока после проведенного вмешательства из культы артерий голени не выявлялось, лигатуры на них наложены не были. Обнажался и пересекался седалищный нерв. В послеоперационном периоде отмечали возникновение симптомов ишемии и их динамику. Рана на бедре ушивалась

3. Взятие костного мозга для лечения экспериментальной острой критической ишемии конечности выполняется следующим образом. В качестве ориентира для забора использовался бедренно-большеберцовый сустав. После проведения санации поверхности 70% раствором этилового спирта, производилась фиксация конечности в положении флексии для обеспечения удобства забора. Иглой диаметром 20G, и шприца, содержащего разбавленный раствор, содержащий 0,5 мл 0,9% NaCl и 0,5 мл (2500 ЕД) гепарина в объеме 1 мл, перкутанно через хрящевые суставные мениски под надколенником

осуществляли пункцию места содержания костного мозга с его аспирацией в объеме от 1,5 мл путем поступательных движений иглы.

4. Выделять моноклеарную фракцию из гепаринизированного собственного костного мозга рекомендуется следующим образом: после разведения костного мозга в физ.растворе (1 к 5), полученный раствор центрифугировали с добавлением 400 г фиколл-верографина в течение 30 мин. Полученную моноклеарную фракцию клеток трижды отмывали в забуференном с помощью фосфатно-солевого буфера физиологическом растворе. Далее их ресуспендировали и культивировали в среде RPMI-1640 в концентрации 10^6 клеток в мл. Жизнеспособность клеток определялась по методу окрашивания трипановым синим.

5. Лечение критической ишемии с применением моноклеарной фракции собственного костного мозга необходимо осуществлять с однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированную конечность по 50 мкл в 4 точки на седьмые сутки после начала эксперимента.

6. Лечение критической ишемии с применением уденафила (8,6 мг/кг), пентоксифиллина (60 мг/кг) или симвастатина (1,71 мг/кг) в качестве монотерапии следует проводить с введением препарата интрагастрально, в течение 28 дней.

7. Лечение критической ишемии уденафилом в сочетании с пентоксифиллином или симвастатином следует проводить с введением препаратов интрагастрально в течение 14 дней, в комбинациях уденафила с симвастатином в дозах 0,86 мг/кг уденафила с пентоксифиллином 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно.

8. Лечение критической ишемии с использованием комбинации уденафила, пентоксифиллина и симвастатина (доза 0,86 мг/кг, 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно) с применением дополнительного введения моноклеарной фракцией собственного костного мозга следует проводить с введением препаратов интрагастрально в течение 7 дней с дополнительной

однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированную конечность по 50 мкл в 4 точки на седьмые сутки после начала эксперимента.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Al-Khaldi, A. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model / A. Al-Khaldi // *Ann. Thorac. Surg.* - 2003. - Vol. 75, N 1. - P. 204-209.
2. Armstrong L. [et al.] // Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years / *Stem Cells.* - 2012. - Vol. 30, N 1. - P. 2-9.
3. Arora, Rajneet & Hare, David & Zulli, Anthony. (2012). Simvastatin Reduces Endothelial NOS: Caveolin-1 Ratio but not the Phosphorylation Status of eNOS In Vivo. *Journal of atherosclerosis and thrombosis.* 19. 705-11.
4. Atabek M.E. Absence of increase in carotid artery intima - media thickness in infants of diabetic mothers. *J Clinical Research in Pediatric Endocrinology.* 2011;3(3):144.
5. Bivalacqua T. J., M.F. Usta, H.C. Champion // Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease / *J. Androl.* – 2003. – Vol. 24. (suppl. 6). – P. 17-37.
6. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* - 1998. - Vol. 21. Suppl. 97. - P. 1-9.
7. Carmeliet, P. Angiogenesis in cancer and other diseases / P. Carmeliet, R. K. Jain // *Nature.* - 2000. - № 407. - P. 249-257.
8. Crosby J. R. [et al.] // Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation *Circ. Res.* - 2000. - Vol. 87, N 9. - P. 728-730.
9. DeBusk, R., Y. Drory, I. Goldstein et al. // Management of sexual dysfunction in patients with cardiovascular disease: recommendations of the Princeton Consensus Panel. / *Am. J. Cardiol.* - 2000. - Vol. 86, N2A. - P. 62F-68F.
10. Dhawan V., S.S. Handu, C.K. Nain, N.K. Ganguly // Chronic L-arginine supplementation improves endothelial cell vasoactive functions in

- hypercholesterolemic and atherosclerotic monkeys / *Mol. Cell. Biochem.* - 2005. - Vol. 269, N1-2. - P.1-11.
11. Dimmtr, S. Vascular repair by circulation endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis / S. Dimmtr, A. M. Zeiher // *J. Mol. Med.* - 2005. - Vol. 82, N 10. - P. 671-677.
 12. Dorros G. [et al.] // Tibioperoneal (outflow lesion) angioplasty can be used as primary treatment in 235 patients with critical limb ischemia: five-year follow-up / *Circulation.* - 2001. - Vol. 104, N 17. - P. 2057-2062.
 13. Erectile dysfunction: prevalence and effect on the quality of life: Boxmeer study / E.J. Meulemann, L.H. Donkers, C. Robertson et al. // *Ned Tijdschr Geneesk.* - 2001. - Vol. 145. - P. 576-581.
 14. Esato K. [et al.] // Neovascularization induced by autologous bone cells implantation in peripheral arterial disease / *Cell Transplant.* - 2002. - Vol. 11, N 8. - P. 747-752.
 15. Fadini, G. P. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature / G. P. Fadini, C. Agostini, A. Avogaro // *Atherosclerosis.* - 2010. - Vol. 209, N 1. - P. 10-17.
 16. Fernandes, J. L. Pentoxifylline reduces pro - inflammatory and increases anti-inflammatory activity in patients with coronary artery disease-a randomized placebo controlled study/ J. L Fernandes, R. T. De Oliveira, R. Mamoni // *Atherosclerosis.* // - 2008. -Vol. 196(1). - P. 434-442.
 17. Ferrario, C.M. Sexual dysfunction in patients with hypertension: implications for therapy / C.M. Ferrario, P. Levy // *J. Clin. Hypertens. (Greenwich).* - 2002. - Vol. 4, N 6. - P. 424-432.
 18. Fogari, R. Effects of antihypertensive therapy on sexual activity in hypertensive men / R. Fogari, A. Zoppi // *Curr. Hypertens. Rep.* - 2002. - Vol. 4, N 3. - P. 202-210.
 19. Fowkes FG, Housley E, Riemersma RA, Macintyre CC, Cawood EH,

- Prescott RJ, Ruckley CV. Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh // Artery Study. *Am J Epidemiol* 1992;135:331–340.
20. Gehling U. M. [et al.] // In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells / *Blood*. - 2000. - Vol. 95, N 10. - P. 3106-3112.
21. Gupta, R. Human Studies of Angiogenic Gene Therapy / R. Gupta, J. Tongers, D. W. Losordo // *Circ. Res.* - 2009. -Vol. 105, N 8. - P. 724-736..
22. Iwaguro H. [et al.] // Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration / *Circulation*. - 2002. - Vol. 105, N 6. - P. 732-738.
23. Kandeel, F.R. Male sexual function and its disorders: physiology, pathophysiology, clinical investigation, and treatment / F.R. Kandeel, V.K. Koussa, R.S. Swerdloff // *Endocr. Rev.* - 2001. - Vol. 22, N3. - P. 342-388.
24. Kawamoto A. [et al.] Intra-myocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia // *Circulation*. - 2003. - Vol. 107, N 3. - P. 461-468.
25. Khan, M.A. The choice of antihypertensive drugs in patients with erectile dysfunction / M.A. Khan, R.J. Morgan, D.P. Mikhailidis // *Curr. Med. Res. Opin.* - 2002. - Vol. 18, N 2. - P. 103-107.
26. Kloner, R.A. Pharmacodynamic interactions between tadalafil and nitrates compared with sildenafil / R.A. Kloner, M.I. Mitchell, A. Bedding // *J. Urol.* - 2002. - Vol. 167, N4. - P. 176-177.
27. Kroger K, Stang A, Kondratieva J, Moebus S, Beck E, Schmermund A, Mohlenkamp S, Dragano N, Siegrist J, Jockel KH, Erbel R. Prevalence of peripheral arterial disease—results of the Heinz Nixdorf recall study. *Eur J Epidemiol* 2006;21:279–285.
28. Kureishi Y. , Z. Luo, I. Shiojima et al. The HMG-CoA reductase inhibitor

- simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals // Nat Med - 2000. - Vol. 6. - P. 1004-1010.
29. Lin G. S. et al. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells improved heart function after myocardial infarction // Acta Pharmacol. Sin. - 2004. - Vol. 25, N 7. - P. 876-886.
30. Machicao F. [et al.] // Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action / J. Neurol. Sci. - 2012. - Vol. 322, N 1-2. - P. 222-227.
31. Martens, F.M. B. Demeilliers, D. Girardot et al. // Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2 / Hypertension. - 2002. - Vol. 39, № 1. - P. 16-21.
32. Meulemann E.J. , L.H. Donkers, C. Robertson et al. // Erectile dysfunction: prevalence and effect on the quality of life: Boxmeer study / Ned Tijdschr Geneesk. - 2001. - Vol. 145. - P. 576-581.
33. Mohammadpour AH, Falsoleiman H, Shamsara J, Allah Abadi G, Rasooli R, Ramezani M. Pentoxifylline decreases serum level of adhesion molecules in atherosclerosis patients. Iran Biomed J. 2014;18(1):23-27. doi: 10.6091/ibj.1211.2013. PMID: 24375159.
34. National Institute for Health and Clinical Excellence. Cilostazol, naftidrofuryl oxalate, pentoxifylline and inositol nicotinate for the treatment of intermittent claudication in people with peripheral arterial disease. 2011; 69.
35. Nishikawa, M. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer / M. Nishikawa, L. Huang // Hum. Gene Ther. - 2001. - Vol. 12, N 8. - P. 861-870.
36. Ogawa, R. Vascular tissue engineering and vascularized 3D tissue regeneration / R. Ogawa, K. Oki, H. Hyakusoku // Regen. Med. - 2007. - Vol. 2, N 5. - P. 831-837.

37. Powell R. J. et al. Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: results of the HGF-0205 trial // *J. Vasc. // Surg.* - 2010. - Vol. 52, N 6. - P. 1525-1530.
38. Prasad, K. Suppression of hypercholesterolemic atherosclerosis by pentoxifylline and its mechanism / K. Prasad, P. Lee. - 2007. - Vol. 192(2). - P. 313-322.
39. Pyrgidis N, Mykoniatis I, Haidich AB, Tirta M, Talimtzis P, Kalyvianakis D, Ouranidis A, Hatzichristou D. The Effect of Phosphodiesterase-type 5 Inhibitors on Erectile Function: An Overview of Systematic Reviews. *Front Pharmacol.* 2021 Sep 7;12:735708.
40. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials / D. Hou [et al.] // *Circulation.* - 2005. - Vol. 112, Suppl. 9. - P. 1150-1156.
41. Recovery of erectile function after brief aggressive antihypertensive therapy / Hale T.M., H. Okabe, T.L. Bushfield et al. // *J. Urol.* - 2002. - Vol. 168, N 1. - P. 348-354.
42. Reriani, Martin & Raichlin, Eugenia & Prasad, Abhiram & Mathew, Verghese & Pumper, Geri & Nelson, Rebecca & Lennon, Ryan & Rihal, Charanjit & Lerman, Lilach & Lerman, Amir. (2010). Long-Term Administration of Endothelin Receptor Antagonist Improves // Coronary Endothelial Function in Patients With Early Atherosclerosis. *Circulation.* 122. 958-66. 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.967406..
43. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001; // 285:2481–2485.
44. Sanada F, Fujikawa T, Shibata K, Taniyama Y, Rakugi H, Morishita R.

- Therapeutic Angiogenesis Using HGF Plasmid. *Ann Vasc Dis.* 2020 Jun 25;13(2):109-115. doi: 10.3400/avd.ra.20-00035. PMID: 32595785; PMCID: PMC7315247.
45. Sasayama, S., N. Ishii, F. Ishikura, et al. // Men's Health Study: epidemiology of erectile dysfunction and cardiovascular disease / *Circ.* - 2003. - Vol. 67. - P. 656-659.
 46. Sheu J.-J. [et al.] // Combination of cilostazol and clopidogrel attenuates Rat critical limb ischemia / *J. Transl. Med.* - 2012. - N 10. - P. 164.
 47. Shibuya, M. VEGF-VEGFR signals in health and disease // *Biomol. Ther.* - 2014. - Vol. 22, N 1. - P. 1-9.
 48. Shintani S. [et al.] // Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation / *Circulation.* - 2001. - Vol. 103, N 6. - P. 897-908.
 49. Solomon H., J. Man, A.S. Wierzbicki et al. // Erectile dysfunction: cardiovascular risk and the role of the cardiologist / *Int. J. Clin. Pract.* - 2003. - Vol. 57, N 2. - P. 96-99.
 50. Spieker, L.E. Current strategies and perspectives for correcting endothelial dysfunction in atherosclerosis / L.E. Spieker // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 2001. - Vol. 38, N 2. - P. S35-S41..
 51. Sukovatykh, B.S. & Orlova, A.Y. & Artyushkova, Ekaterina & Gordov, M.Y. & Vedenev, K.Y. (2015). The Effectiveness of Mononuclear Fraction of Autologous Bone Marrow in Treatment of Experimental Critical Limb Ischemia. *Novosti Khirurgii.* 23. 365-371. 10.18.
 52. Sukovatykh, Boris & Feyziev, Elvin & Belous, Alexander & Elena, Trubnikova & Sukovatykh, Mikhail & Orlova, Anzhelika. (2021). Experimental Modeling of the Ultra-Necrotic Stage of Critical Ischemia of the Lower Limbs. *Journal of Experimental and Clinical.*
 53. Teissie, J. Mechanisms of cell membrane electroporation: a

- minireview of our present knowledge / J. Teissie, M. Golzio, M. P. Rols // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2005. - Vol. 1724, N 3. - P. 270-280.
54. Tidball J. G., S. A. Villalta // Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration / *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 2010. - Vol. 298, N 5. - P. R1173-1187.
55. Tidball, J. G. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration / J. G. Tidball, S. A. Villalta // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 2010. - Vol. 298, N 5. - P. R1173-1187.
56. Toma C. [et al.] Fate of cultured-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics // *Circ. Res.* - 2009. - Vol. 104, N 3. - P. 398-402.
57. Triggering myocardial infarction by sexual activity: low absolute risk and prevention by regular physical exertion / J.E. Muller, A. Mittleman, M. Maclure, et al. // Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *JAMA* - 1996. - // Vol. 275. - P. 1405-1409.
58. Vergely, C. Nitric oxide synthases and peripheral cardiovascular system / C. Vergely, L. Rochette // *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris).* - 2002. - Vol. 51, N2. - P.109-116.
59. Walter D. H. [et al.] // Intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA) / *Circ. Cardiovasc. Interv.* - 2011. - Vol. 4, N 1. - P. 26-3.
60. Walter DH, Krankenberg H, Balzer JO, et al. /Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROV-ASA). *Circ Cardiovasc Interv*; 2011 Feb 1; // 4(1): 26 - 37.
61. Waterman R. S. , A. M. Betancourt //. Treating chronic pain with mesenchymal stem cells: A therapeutic approach worthy of continued

- investigation / J. Stem. Cell Res. Ther. - 2011. - Vol. S2. - P. 001.
62. Watson, K. Peripheral arterial disease: a review of disease awareness and management / K. Watson, B. D. Watson, K. S. Pater // Am. J. Geriatr. Pharmacother. - 2006. - Vol. 4, N 4. - P. 365-379.
63. Yancopoulos G. D.[et al.] Vascular-specific growth factors and blood vessel formation // Nature. - 2000. - N 407. - P. 242-248.
64. Алехин, Д. И. Новые возможности реваскуляризации конечностей при хронической ишемии - неоангиогенез, индуцированный воздействием высокоинтенсивного лазерного излучения / Д. И. Алехин // Ангиол. и сос. хирургия, Т. 9, - №4, - 2003 г.
65. Артюшкова, Е.Б., Покровский, М.В., Покровская, Т.Г. и др. Сравнительная оценка ангиогенного эффекта L-аргинина и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) при экспериментальной ишемии конечности / Е.Б. Артюшкова, М.В. Покровский, Т.Г. Покровская // // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2009. № 1. С. 46-52.
66. Арутюнов Г.П., Бойцов С.А., Воевода М.И. и др. / Коррекция гипертриглицеридемии с целью снижения остаточного риска при заболеваниях, вызванных атеросклерозом. Заключение Совета экспертов Российского кардиологического общества, // Российского научного медицинского общества терапевтов, Евразийской ассоциации терапевтов, Национального общества по изучению атеросклероза, Российской ассоциации эндокринологов и Национальной исследовательской лиги кардиологической генетики //.
67. Архипов В.В. Клиническая фармакология ингибиторов фосфодиэстеразы // Клиническая фармакология. - 2014. - № 3. - С. 35-41.
68. Асланов А.Д., Логвина О.Е., Куготов А.Г. и др. Опыт лечения критической ишемической болезни нижних конечностей на фоне

- диффузного поражения артерий // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2012. - Т. 18. - №4. - С. 125-127.
69. Аутологичные стволовые клетки. Экспериментальные исследования и перспективы клинического применения: рук. для врачей / под ред. В. А. Ткачука. - М. : Литтерра, 2009. - 448 с.
70. Белоус А.С., Трубникова Е.В. Ангиогенный эффект силденафила в комбинации с пентоксифиллином при экспериментальной ишемии конечности. Auditorium. 2018. № 3 (19). С. 25-30.
71. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций / под ред. В. И. Шумакова, Н. А. Онищенко. - М. : Лавр. 2009. - 308 с..
72. Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М. А. Пальцева. - М. : Медицина. 2009. - 728 с.
73. Богачев В.Ю., Болдин Б.В., Родионов С.В., Туркин П.Ю. Консервативное лечение хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей // Амбулаторная хирургия (стационарзамещающие технологии). - 2018. - № 69-70 (1-2). - С. 14-18.
74. Бойко А.Н., Камчатнов П.Р., Чугунов А.В. и др. Коррекция реологических свойств крови - патогенетический подход к лечению больных с вертебрально-базиллярной недостаточностью // Врач. 2005. № 6. С. 45-49.
75. Бокерия Л.А. Темрезов М.Б., Борсов М.Х. и др. Прямая реваскуляризация - метод выбора в лечении больных критической ишемией нижних конечностей // Российский медицинский журнал. - 2011. - №6. - С. 23-27.
76. Бокерия, Л.А., Голухова, Е.З., Еремеева, М. В. и др. Первые результаты клинического применения терапевтического ангиогенеза с использованием гена VEGF165 человека // Бюл. НЦССХ РАМН. 2003. Т.4.

№ 11. С. 326.

77. Бокерия, Л.А., Еремеева, М.В. /Современное состояние и перспективы использования ангиогенеза в лечении ишемической болезни сердца // Грудная и сердечно-сосуд. хирургия.-2000.-Т.1, №2, С.57-61.
78. Булгак, А.А. Вовлечение дисфункции сосудистого эндотелия в патогенез необратимых реперфузионных повреждений миокарда / А.А. Булгак, А.Г. Мрочек, А.В. Гурин // Новости мед.-биол. наук.-2004.- № 3.- С. 40-45.
79. Верткин, А.Л. Эректильная дисфункция в практике врача-кардиолога / А.Л. Верткин // РМЖ. - 2003. - Т. 11, №19. - С. 1107-1113.
80. Гавриленко А. В. [и др.] // Тактические ошибки в лечении больных с критической ишемией нижних конечностей при поражении бедра и голени / Хирургия. - 2011. - № 5. - С. 10-14.
81. Гавриленко А.В. [и др.] // Применение поясничной симпатэктомии в лечении облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей - современный взгляд на проблему / Ангиология и сосудистая хирургия. - 2004. - Т. 10. - №3. - С. 90-96.
82. Гавриленко, А. В. Генные технологии стимуляции ангиогенеза как инновационное направление в ангиологии и сосудистой хирургии / А. В. Гавриленко, Д. А. Воронов // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2015. - Т. 21, № 2. - С. 7-14.
83. Гавриленко, А. В. Результаты комплексного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных технологий стимуляции ангиогенеза (часть 2) / А. В. Гавриленко, Д. А. Воронов // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2015..
84. Гавриленко, А. В. Эффективность применения генно-инженерных конструкций VEGF165 в комплексном лечении хронической ишемии нижних конечностей / Гавриленко, А.В., Олейник, Е.М. // Анналы

- хирургии. - 2015. - № 6. - С. 5-9.
85. Гулевский, А. К. Клеточная трансплантация в кардиомиопластике при ишемическом повреждении миокарда / А. К. Гулевский, И. И. Щенявский, Е. С. Абакумова // Біотехнологія (Україна). - 2011. - Т. 14, № 1. - С. 60-72.
86. Деев Р. В. Отдаленные результаты применения р1-VEGF165 при хронической ишемии нижних конечностей вследствие облитерирующего атеросклероза // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. - 2015. - Т. 8, № 4. - С. 43-49.
87. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / под ред. Н.Н. Петрищева. - СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2003. - 184 с.
88. Егоров, А. А. Клинические и патогенетические аспекты операции реваскуляризирующей остеотрепанации у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей: автореф. дис. канд. мед.наук. - Рязань, 2007. - 21 с.
89. Затейщиков Д.А., Л.О. Минушкина, О.Ю. Кудряшова и др. // Полиморфизм генов NO-синтетазы и рецептора ангиотензина II 1-го типа и эндотелиальный гемостаз у больных ишемической болезнью сердца / Кардиология.- 2000.- № II.- С. 28-32.
90. Инструкция по применению препарата "Миелопид" (Код АТХ: L03A. ГНЦ Антибиотиков и ГНЦ Ин-т иммунологии, Россия).
91. Инструкция по применению препарата "Неоваскулоген" (Код АТХ: V03AX. Федер. Гос. бюджет. учреждение "Гематологический научный центр" М-ва здравоохранения и соц. развития РФ (Россия).
92. Казьмин, З. В. Комплексное хирургическое и консервативное лечение хронической критической ишемии при отсутствии условий прямой реваскуляризации нижних конечностей : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.44 / З. В. Казьмин. - Москва, 2006. - 17 с.

93. Капелька, В.И. Эволюция концепций и метаболическая основа ишемической дисфункции миокарда / В.И. Капелька // Кардиология. - 2005. - № 9. - С. 55-61.
94. Кательницкий И.И. Ливадняя Е.С. Методы лечения больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей при критической ишемии. Современные проблемы науки и образования. 2014.
95. Кислов Э.Е.[и др.] //Сравнительная оценка методов прогнозирования эффективности поясничной симпатэктомии у пациентов с критической ишемией нижних конечностей / Ангиология и сосудистая хирургия. - 2009. - Т. 15. - № 1. - С. 138-141.
96. Коваленко, В. М. Ангиопротекция в комплексном лечении больных облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей : метод. пособие для врачей / В. М. Коваленко, М. Б. Темрезов, И. М. Калитко. - М., 2010. - 22 с.
97. Лебедев С. В.[и др.] // Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей / Вестн. РАМН. - 2013. - № 3. - С. 33-44.
98. Мазо, Е.Б. Фармакотерапия эректильной дисфункции / Е.Б. Мазо, Д.Г. Дмитриев, С.И. Гамидов, Р.И. Овчинников // Рус. мед. журн. - 2001. - Т. 9, №23. - С. 1077-1078.
99. Майстренко Д. Н. [и др.] // Современные диагностические технологии в определении тактики лечения больных с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей / Вестн. хирургии. - 2009. - № 2. - С. 41-46.
100. Марков, Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия / Х. М. Марков // Кардиология. - 2005. - № 12. - С. 62-72.
101. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей / под ред. А. В. Покровского. - М., 2013. - 74 с..

102. Национальные рекомендации по диагностике и лечению заболеваний артерий нижних конечностей. М:Медицина.-2019.-89с.
103. Орлова, А. Ю. Экспериментальное и клиническое обоснование фармакологической стимуляции неоваскулогенеза при ишемии конечности : автореф. дис.. канд. мед. наук : 14.00.25, 14.00.27 / А. Ю. Орлова ; [Курск. гос. мед. ун-т]. - Курск, 2009. - 22 с.
104. Патент R U 2726077 С 1 Фейзиев Э.Э. Б.А.С..С.Б.С..Т.Е.В. СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КОМБИНАЦИЕЙ СИМВАСТАТИНА, УДЕНАФИЛА И.
105. Петрищев, Н. Н. Физиология и патофизиология эндотелия / Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов // Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы. Фармакологическая коррекция. - СПб.: СПб ГМУ, 2003. - С. 4-38.
106. Петров, С.Б. Современные аспекты лечения эректильной дисфункции / С.Б. Петров, О.Б. Лоран, Е.И. Велиев // Consilium-medicum. - 2003. - Т. 5, №7. - С. 419-422.
107. Питык А.И., Ангиографическая характеристика окклюзионностенотических поражений артерий нижних конечностей у больных с критической ишемией и выбор метода реваскуляризации. Сердце и сосуды. 2013. № 4 (44). С. 55-63.
108. Питык А.И., Прасол В.А., Бабынкин А.Б., Сравнительная оценка эффективности эндоваскулярной и хирургической реваскуляризации при острой ишемии нижних конечностей. Хирургия Украины. 2019. № 2 (70). С. 51-55.
109. Покровская Т.Г., Чулюкова Т.Н., Покровский М.В., Филиппенко Н.Г. Эндотелиопротективные дозозависимые эффекты силденафила в комбинациях с L-аргинином при экспериментальном моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота // // Биомедицина. - 2010. -

- №1(5). - С. 118-20.
110. Рекомендуемые стандарты для оценки результатов лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей. Российский консенсус. М. - 2005.
111. Салафутдинов И. И. [и др.] Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. - 2010. - Т. 5, № 2. - С. 62-67.
112. Самойлов М.О. , Д.Г. Семенов, Е.М. Тюлькова и др. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты М.: Истоки, 2004. - 585 с.
113. Смолянинов А. Б. [и др.] // Клеточная терапия хронической ишемии нижних конечностей /АГ-инфо. - 2007. - № 3. - С. 10-15.
114. Соловьев, И. А. Роль ангиогенеза в сердечно-сосудистой патологии / И. А. Соловьев, В. В. Сопельняков // Клеточные технологии. - М., 2005. - С. 114-152.
115. Сосудистая хирургия по Хаймовичу. В 2 т. Т. 1 / под ред. Э. Ашера ; пер. с англ. под ред. А. В. Покровского. - М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. - 644 с.
116. СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ-КРЫС. Фейзиев Э.Э.О., Белоус А.С., Суковатых Б.С., Трубникова Е.В. Патент на изобретение RU 2734158 С1, 13.10.2020. Заявка № 2020111315 от 18.03.2020.
117. СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КОМБИНАЦИЕЙ СИМВАСТАТИНА И МОНОНУКЛЕАРНОЙ

- ФРАКЦИЕЙ АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА. Фейзиев Э.Э.О., Белоус А.С., Суковатых Б.С., Трубникова Е.В. Патент на изобретение RU.
118. СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КОМБИНАЦИЕЙ СИМВАСТАТИНА И УДЕНАФИЛА. Фейзиев Э.Э.О., Белоус А.С., Суковатых Б.С., Трубникова Е.В. Патент на изобретение RU 2727891 С1, 24.07.2020. Заявка № 2020111675.
119. СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КОМБИНАЦИЕЙ СИМВАСТАТИНА, УДЕНАФИЛА И МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИЕЙ АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА. Фейзиев Э.Э.О., Белоус А.С., Суковатых Б.С., Трубникова Е.В..
120. СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ СИМВАСТАТИНОМ/ Фейзиев Э.Э.О., Белоус А.С., Суковатых Б.С., Трубникова Е.В. Патент на изобретение RU 2726076 С1, 08.07.2020. Заявка № 2020111368 от 19.03.2020..
121. Староверов, И. Н. Новое в лечении больных с ХИНК / И. Н. Староверов, Ю. В. Червяков, Е. Г. Нерсесян // Материалы IV Конгресса хирургов. - Москвы, 2011. - С. 135.
122. Староверов, И. Н. Пути улучшения диагностики и хирургического лечения послеоперационных стенозов и окклюзий магистральных артерий нижних конечностей : автореф. дис. ... докт. мед. наук. : 14.01.26 / И. Н. Староверов : [Яросл. гос. мед. ак.].
123. Тепляков, А.Т. Сексуальная дисфункция у больных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы / А.Т. Тепляков, Е.Ю. Пушникова, Т.А. Степачева // Терапевт. арх. - 2002. - №10. - С. 77-80.
124. Худойбердиева М.Д. "ФАРМАКОТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКИХ

ОБЛИТЕРИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ АРТЕРИЙ НИЖНИХ
КОНЕЧНОСТЕЙ" Экономика и социум, по. 1-2 (80), 2021, pp. 691-693.

125. Чевгун С.Д., Туркменов А.М., Туркменова Э.М., Жынжыров Б.К., Джураева С.Д., Туркменов А.А., Рентгенхирургические эндоваскулярные методы реваскуляризации (баллонная ангиопластика со стентированием) периферических артерий у пациентов с критической.
126. Червяков Ю. В. // Возможности генной терапии в лечении хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / Хирургия. Журн. им. Н. И. Пирогова. - 2014. - № 4. - С. 40-45.
127. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Власенко О.Н. и др. Отдаленные результаты лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей методами не прямой реваскуляризации и не нотерапии // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2016. - Т. 22, №1. - С. 29-36.
128. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Деев Р.В. Результаты лечения больных с ХИНК препаратом на основе гена, кодирующего сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2011. - Т. 6, № 1. - С. 73.
129. Швальб П. Г. Эффективность и безопасность применения препарата Неоваскулген в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIВ-III фаза клинических испытаний) / [и др.] // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. // - 2011. - Т. 6, № 3. - С. 76-83.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Индивидуальные показатели артериального кровотока и микроциркуляции в группах с различными типами лечения в динамике

Фотоплетизмографический индекс (%)

Группы	I		II		III		IV	
	исход	через 60 д	исход	через 60 д	исход	через 60 д	исход	через 60 д
1	34,3	20,6	46,3	30,4	32,1	25,7	44,2	23,6
2	45,4	26,6	36,1	30,2	33,2	32,7	28,1	43,9
3	44	27,2	36	23,3	42,1	29,2	43,4	26,8
4	25,2	32	29,3	35,3	28,4	31,7	30,4	34,3
5	27,2	20,6	38,2	29,1	33,6	30,1	40,1	28,8
6	41,9	36,7	37,6	32,7	44,9	35,1	34,2	30,5
7	37,7	35,4	30,9	38,8	29,5	24,9	45	32,1
8	37	24,4	45,2	23,7	44,9	37,2	41,1	46,8
9	35,7	26	25,1	26,7	43,8	35,9	25	34,1
10	42,3	28,7	45,9	30	28,4	36,1	23,8	44,2
11	25,8	30,6	35,9	36,3	36	36,6	28,5	45,9
12	28,3	27	34,6	45,1	45,1	34,7	45,7	45,4
13	39,5	32	32,6	26,1	37,6	38	29,4	35,5
14	26,4	29,9	29,1	40,5	34,3	23,5	38,1	26,7
15	24,4	33,4	32,4	35,2	31,1	36,5	46,4	45,8
16	35,5	32,6	46,9	34,4	25,1	29,4	23,9	38,3
17	34,4	24,7	38,7	37	43,4	32,3	28,9	29,4
18	36,7	22,7	26,3	39	34,1	33,9	28	34
19	40,6	34,2	24,4	26,7	26,1	35,8	40,6	33,1
20	41,4	32,7	30,9	25,5	28,4	43,4	41,1	29,7
среднее (M)	35,2	28,9	35,1	32,3	35,1	33,1	35,3	35,4
ошибка (m)	1,5	1,1	1,6	1,4	1,5	1,1	1,8	1,7

Приложение 2

Реовазографический индекс при исследовании голени

Группы	I		II		III		IV	
	исход	через 60 д	исход	через 60 д	исход	через 60 д	исход	через 60 д
1	0,23	0,13	0,24	0,25	0,4	0,25	0,35	0,27
2	0,17	0,19	0,27	0,2	0,17	0,19	0,36	0,29
3	0,26	0,13	0,24	0,32	0,19	0,22	0,33	0,17
4	0,36	0,27	0,24	0,27	0,43	0,18	0,22	0,17
5	0,4	0,25	0,19	0,14	0,36	0,3	0,29	0,33
6	0,4	0,15	0,4	0,18	0,42	0,32	0,32	0,38
7	0,18	0,3	0,16	0,18	0,3	0,31	0,33	0,36
8	0,23	0,33	0,33	0,38	0,45	0,17	0,37	0,3
9	0,31	0,12	0,24	0,26	0,34	0,26	0,3	0,26
10	0,27	0,23	0,39	0,35	0,34	0,35	0,26	0,41
11	0,26	0,32	0,4	0,17	0,43	0,4	0,43	0,23
12	0,23	0,26	0,32	0,38	0,26	0,34	0,19	0,38
13	0,36	0,34	0,4	0,14	0,15	0,33	0,16	0,14
14	0,34	0,13	0,34	0,21	0,32	0,18	0,15	0,37
15	0,42	0,19	0,27	0,32	0,3	0,34	0,29	0,13
16	0,25	0,34	0,39	0,19	0,24	0,17	0,42	0,24
17	0,45	0,2	0,24	0,19	0,25	0,16	0,22	0,38
18	0,19	0,17	0,18	0,33	0,22	0,3	0,41	0,34
19	0,39	0,2	0,32	0,17	0,25	0,13	0,22	0,18
20	0,3	0,2	0,31	0,41	0,39	0,29	0,18	0,32
среднее (M)	0,3	0,22	0,29	0,25	0,31	0,26	0,29	0,28
ошибка (m)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Приложение 3

Реовазографический индекс при исследовании стопы

Группы	I		II		III		IV	
	исход	через 60 д	исход	через 60 д	исход	через 60 д	исход	через 60 д
1	0,29	0,13	0,27	0,2	0,21	0,15	0,2	0,23
2	0,2	0,14	0,31	0,22	0,19	0,23	0,22	0,23
3	0,27	0,29	0,3	0,25	0,29	0,2	0,28	0,27
4	0,12	0,16	0,21	0,13	0,28	0,23	0,13	0,23
5	0,29	0,17	0,24	0,09	0,27	0,18	0,29	0,16
6	0,13	0,15	0,14	0,16	0,28	0,15	0,24	0,25
7	0,27	0,25	0,21	0,12	0,26	0,25	0,25	0,15
8	0,29	0,16	0,28	0,2	0,26	0,15	0,21	0,16
9	0,29	0,18	0,11	0,26	0,29	0,15	0,14	0,17
10	0,28	0,17	0,22	0,17	0,15	0,19	0,31	0,17
11	0,19	0,12	0,17	0,25	0,22	0,17	0,2	0,24
12	0,21	0,12	0,23	0,13	0,27	0,22	0,27	0,28
13	0,17	0,09	0,33	0,09	0,34	0,24	0,16	0,17
14	0,28	0,18	0,29	0,18	0,33	0,21	0,22	0,28
15	0,16	0,25	0,4	0,13	0,21	0,13	0,23	0,19
16	0,2	0,18	0,17	0,23	0,22	0,17	0,13	0,28
17	0,26	0,11	0,22	0,22	0,19	0,12	0,34	0,25
18	0,25	0,1	0,13	0,21	0,19	0,24	0,33	0,23
19	0,19	0,12	0,33	0,23	0,19	0,21	0,22	0,21
20	0,19	0,18	0,2	0,15	0,16	0,16	0,28	0,24
среднее (M)	0,23	0,16	0,24	0,18	0,24	0,19	0,23	0,22
ошибка (m)	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Приложение 4
Лодыжечно - плечевой индекс

Группы	I		II		III		IV	
	исход	через 60 д	исход	через 60 д	исход	через 60 д	исход	через 60 д
1	0,17	0,11	0,18	0,14	0,35	0,14	0,42	0,41
2	0,28	0,13	0,22	0,24	0,36	0,16	0,22	0,32
3	0,19	0,18	0,4	0,2	0,28	0,3	0,38	0,24
4	0,42	0,24	0,38	0,14	0,24	0,22	0,23	0,36
5	0,3	0,27	0,3	0,28	0,36	0,15	0,25	0,2
6	0,26	0,14	0,22	0,13	0,4	0,22	0,17	0,27
7	0,31	0,23	0,22	0,3	0,41	0,22	0,37	0,36
8	0,4	0,1	0,37	0,29	0,39	0,23	0,44	0,36
9	0,27	0,14	0,23	0,29	0,28	0,31	0,32	0,23
10	0,23	0,11	0,35	0,2	0,19	0,15	0,36	0,21
11	0,39	0,12	0,38	0,18	0,35	0,21	0,33	0,26
12	0,28	0,12	0,2	0,18	0,29	0,19	0,39	0,32
13	0,3	0,21	0,38	0,16	0,23	0,25	0,16	0,28
14	0,31	0,23	0,24	0,3	0,2	0,21	0,36	0,23
15	0,17	0,12	0,43	0,17	0,2	0,22	0,19	0,36
16	0,32	0,11	0,19	0,13	0,39	0,2	0,37	0,26
17	0,3	0,09	0,43	0,29	0,19	0,2	0,14	0,25
18	0,37	0,17	0,22	0,2	0,23	0,29	0,27	0,33
19	0,41	0,21	0,23	0,17	0,4	0,28	0,2	0,29
20	0,41	0,19	0,42	0,21	0,29	0,21	0,33	0,34
среднее (M)	0,3	0,16	0,3	0,21	0,3	0,22	0,3	0,29
ошибка (m)	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01

Полученные патенты в рамках исследования

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11) **2 735 838**⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)
A61K 31/22 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 9/10 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G09B 23/28 (2020.08); A61K 31/22 (2020.08); A61K 35/28 (2020.08); A61P 9/10 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020111726, 21.03.2020
 (24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 21.03.2020
 Дата регистрации:
 09.11.2020
 Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 21.03.2020
 (45) Опубликовано: 09.11.2020 Бюл. № 31
 Адрес для переписки:
 305000, Курская обл., г. Курск, ул. Радищева,
 33, ФГБОУ ВО "КГУ"

(72) Автор(ы):
 Фейзиев Эльвин Эйнулла Оглы (RU),
 Белоус Александр Сергеевич (RU),
 Суковатых Борис Семенович (RU),
 Трубникова Елена Владимировна (RU)
 (73) Патентообладатель(и):
 Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Курский государственный
 университет" (RU)
 (56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2618622 C1, 04.05.2017. RU
 2507597 C2, 20.02.2014. US 20150374758 A1,
 31.12.2015. Виноградова Е.В., Белоусова Е.С.,
 Семенец И.А. Особенности метаболического
 ответа мышечной ткани на длительное
 введение высокой дозы симвастина (зокора)
 /В книге: 5-я итоговая научная сессия молодых
 учёных РостГМУ. Сборник материалов. 2018.
 С. 60-62. СЕМЕНЕЦ И. (см. прод.)

RU
 2 7 3 5 8 3 8
 C 1

RU
 2 7 3 5 8 3 8
 C 1

(54) СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КОМБИНАЦИЕЙ СИМВАСТАТИНА И МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИЕЙ АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА

(57) Реферат:
 Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии и хирургии, может быть использовано для моделирования критической ишемии скелетной мышцы. Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастина и мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга, заключающийся в экспериментальном моделировании на крысах критической ишемии скелетной мышцы и проведении ее коррекции путем внутривенного введения симвастина в дозе 0,86 мг/кг 1 раз в сутки ежедневно в течение 14 дней и однократным парантеральным введением

мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга на 7-е сутки после моделирования критической ишемии по 50 мкл в 4 точки: паравазально над паховой связкой в место отхождения от внутренней подвздошной артерии латеральной артерии, огибающих бедренную кость, под паховой связкой в область поверхностной артерии, огибающей подвздошную кость, в область отхождения мышечной ветви бедренной артерии *t. muscularis*, место прикрепления гребенчатой и длинной приводящей мышц бедра, в верхнюю треть икроножной мышцы. Вышеописанный способ позволяет корректировать ишемию скелетной мышцы симвастином и мононуклеарной



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G09B 23/28 (2020.02); A61K 31/351 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2020111368, 19.03.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.03.2020

Дата регистрации:
08.07.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.03.2020

(45) Опубликовано: 08.07.2020 Бюл. № 19

Адрес для переписки:
305000, Курская обл., г. Курск, ул. Радищева,
33, ФГБОУ ВО "КГУ"

(72) Автор(ы):

Фейзинов Эльвин Эйнулла Оглы (RU),
Белоус Александр Сергеевич (RU),
Суковатых Борис Семенович (RU),
Трубникова Елена Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Курский государственный
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2618622 C1, 04.05.2017. RU
2618621 C1, 04.05.2017. И.А. СЕМЕНЕЦ.
Некоторые особенности изменения обменных
процессов в мышцах при длительном введении
симвастина и тиоктовой кислоты в
эксперименте / Казанский медицинский
журнал, 2018, т. 99, N 3, стр. 450-455. P. A.
COWLED et al. Statins Inhibit Neutrophil
Infiltration in Skeletal Muscle (см. прод.)

(54) СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ СИМВАСТАТИНОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии и хирургии, может быть использовано для моделирования критической ишемии скелетной мышцы. Способ фармакологической коррекции экспериментальной ишемии скелетной мышцы симвастином включает экспериментальное моделирование критической ишемии мышц

голень, где симвастин вводят внутривенно в дозе 1,71 мг/кг 1 раз в сутки, ежедневно в течение 28 дней. Изобретение обеспечивает разработку способа фармакологической коррекции критической ишемии мышц голени у экспериментальных животных симвастином. 1 пр., 1 табл.

(56) (продолжение):

Reperfusion Injury / Journal of Surgical Research, 2007, 141, pages 267-276.

RU 2 7 2 6 0 7 6 C 1

RU 2 7 2 6 0 7 6 C 1



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G09B 23/28 (2020.02); A61K 31/351 (2020.02); A61K 31/519 (2020.02); A61K 35/28 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2020111727, 21.03.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.03.2020Дата регистрации:
08.07.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.03.2020

(45) Опубликовано: 08.07.2020 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

305000, Курская обл., г. Курск, ул. Радищева,
33, ФГБОУ ВО "КГУ"

(72) Автор(ы):

Фейзинов Эльвин Эйнулла Оглы (RU),
Белоус Александр Сергеевич (RU),
Суковатых Борис Семенович (RU),
Трубникова Елена Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Курский государственный
университет" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2618622 C1, 04.05.2017. RU
2507597 C2, 20.02.2014. RU 2507596 C1,
20.02.2014. И.А. СЕМЕНЕЦ. Некоторые
особенности изменения обменных процессов
в мышцах при длительном введении
симвастатина и тиаголовой кислоты в
эксперименте / Казанский медицинский
журнал, 2018, т. 99, N 3, стр. 450-455. P.A.
COWLED et al. Statins Inhibit Neutrophil (см.
прод.)(54) СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ
ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КОМБИНАЦИЕЙ СИМВАСТАТИНА, УДАНАФИЛА И
МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИЕЙ АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии и хирургии, и может быть использовано для моделирования критической ишемии скелетной мышцы. Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина, уданафила и мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга включает экспериментальное моделирование критической ишемии мышц голени, где симвастатин вводят

внутрижелудочно в дозе 0,86 мг/кг, уданафил вводят внутрижелудочно в дозе 0,86 мг/кг 1 раз в сутки ежедневно в течение 7 дней и мононуклеарную фракцию аутологичного костного мозга вводят однократно парентерально на 7-е сутки после моделирования критической ишемии по 50 мкл в 4 точки. Изобретение обеспечивает разработку способа фармакологической коррекции критической ишемии мышц голени у экспериментальных животных симвастатином. 1 пр., 1 табл.

(56) (продолжение):

Infiltration in Skeletal Muscle Reperfusion Injury / Journal of Surgical Research, 2007, 141, pages 267-276.

Стр.: 1

RU 2 7 2 6 0 7 7 C 1

RU 2 7 2 6 0 7 7 C 1

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G09B 23/28 (2020.02); A61K 31/351 (2020.02); A61K 31/519 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2020111675, 20.03.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.03.2020Дата регистрации:
24.07.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.03.2020

(45) Опубликовано: 24.07.2020 Бюл. № 21

Адрес для переписки:
305000, Курская обл., г. Курск, ул. Радищева,
33, ФГБОУ ВО "КГУ"

(72) Автор(ы):

Фейзинов Эльвин Эйнулла Оглы (RU),
Белоус Александр Сергеевич (RU),
Суковатых Борис Семенович (RU),
Трубникова Елена Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Курский государственный
университет" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2618622 C1, 04.05.2017. RU
2618621 C1, 04.05.2017. P.A. COWLED et al.
Statins Inhibit Neutrophil Infiltration in Skeletal
Muscle Reperfusion Injury / Journal of Surgical
Research, 2007, vol. 141, N 2, pages 267-276. И.А.
СЕМЕНЕЦ. Некоторые особенности
изменения обменных процессов в мышцах при
длительном введении симvastатина и
тиоктовой (см. прод.)(54) СПОСОБ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ
ИШЕМИИ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КОМБИНАЦИЕЙ СИМВАСТАТИНА И УДЕНАФИЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в
частности к экспериментальной фармакологии и
хирургии, может быть использовано для
моделирования критической ишемии скелетной
мышцы. Способ фармакологической коррекции
экспериментальной ишемии скелетной мышцыкомбинацией симvastатина и уденафила включает
экспериментальное моделирование критической
ишемии мышц голени, где симvastатин вводят
внутрижелудочно в дозе 0,86 мг/кг и уденафил
вводят внутрижелудочно в дозе 0,86 мг/кг 1 раз
в сутки ежедневно в течение 14 дней. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

кислоты в эксперименте / Казанский медицинский журнал, 2018, т. 99, N 3, стр. 450-455.

RU 2 7 2 7 8 9 1 C 1

RU 2 7 2 7 8 9 1 C 1



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G09B 23/28 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020111315, 18.03.2020

(24) Дата начала отчета срока действия патента:
18.03.2020

Дата регистрации:
13.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.03.2020

(45) Опубликовано: 13.10.2020 Бюл. № 29

Адрес для переписки:
305000, Курская обл., г. Курск, ул. Радищева,
33, ФГБОУ ВО "КГУ"

(72) Автор(ы):

Фейзиев Эльвин Эйнулла Оглы (RU),
Белоус Александр Сергеевич (RU),
Суковатых Борис Семенович (RU),
Трубникова Елена Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Курский государственный
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2726077 C1, 08.07.2020. RU
2518965 C1, 10.06.2014. RU 2210816 C2,
20.08.2003. SU 1101875 A1, 07.07.1984.
ШАПОВАЛОВА Е.Ю. и др. Комплексная
оценка способов моделирования трофической
язвы у мыши при хронической ишемии
нижней конечности в опытной модели.
Результаты научных исследований: теория и
практика: мат.-лы I международн. научн.-
практ. (см. прод.)

(54) СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ-КРЫС

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной хирургии, и может быть использовано для моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных – крыс. Производят комплексное оперативное удаление участка магистральных сосудов, включающих бедренную, подколенную, переднюю и заднюю большеберцовые артерии и вены, а также седалищный нерв. Способ обеспечивает возможность моделирования критической ишемии

нижних конечностей у экспериментальных животных за счет комплексного оперативного удаления участка магистральных сосудов, включающих бедренную, подколенную, переднюю и заднюю большеберцовые артерии и вены, а также седалищный нерв, что является максимально приближенной моделью к критической ишемии у человека при облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

конференции. Вологда 2015, стр.5-9. ВОРОНОВ Д.А. и др. Стимуляция ангиогенеза в улучшении результатов хирургического лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: экспериментальное