

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

**Борщев
Глеб Геннадьевич**

**КОМПЛЕКСНАЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ МИОКАРДА СО
СТИМУЛЯЦИЕЙ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНОГО АНГИОГЕНЕЗА У
БОЛЬНЫХ ИБС С ДИФFUЗНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ КОРОНАРНОГО
РУСЛА**

Специальность: 14.01.26 - сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
**академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Шевченко Юрий Леонидович**

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА I. ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ ИБС С ДИФФУЗНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ КОРОНАРНОГО РУСЛА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДИК СТИМУЛЯЦИИ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНОГО НЕОАНГИОГЕНЕЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)...	17
1.1. Ишемическая болезнь сердца: значимость, методы лечения.....	17
1.2. Эволюция методов лечения больных ИБС.	20
1.3. Клеточные технологии в лечении пациентов с ИБС.....	34
1.4. Факторы роста как индукторы неоангиогенеза.	55
1.5. Возможность стимуляции ятрогенного неоангиогенеза при ИБС.	68
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	73
2.1. Общая характеристика исследования.	73
2.2. Характеристика материалов и методов экспериментального исследования.	75
2.2. Характеристика материалов и методов клинического исследования (лабораторный этап).....	78
2.3. Характеристика материалов клинического исследования (стационарный этап).	79
2.3.1. Первый этап исследования: оценка безопасности клинического применения предлагаемой методики.	84
2.3.2. Второй этап исследования: оценка клинической эффективности предлагаемой методики.	85
2.4. Характеристика материалов клинического исследования (амбулаторный	

этап).	90
2.5. Характеристика методов исследования.	90
2.5.1. Лабораторные исследования.	90
2.5.2. Инструментальные методы исследования.	91
2.6. Изучение качества жизни.	94
2.6. Статистическая обработка результатов исследований.	95

ГЛАВА III. МЕТОДИКИ ИНДУКЦИИ НЕПРЯМОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ..... 97

3.1. Характеристика лабораторных животных, включённых в исследование. Нормативная документация.	97
3.2. Экспериментальная часть. Характеристика оперативных вмешательств... 98	
3.2.1. Первая часть эксперимента – моделирование аварийной гипертрофии. ..	98
3.2.2. Вторая часть эксперимента – моделирование инфаркта миокарда.	106
3.2.3. Третья часть эксперимента – стимуляция неоангиогенеза.	109
.....	109
3.2.4. Подготовка обогащённой тромбоцитами плазмы крови.	111
3.2.5. Методика формирования аутологичной тканевой липидно-фибриновой матрицы, обогащённой тромбоцитами.	111
3.3. Полученные результаты и их обсуждение.	117
3.4. Морфологические данные.	119
3.5. Клиническое исследование реакции перикарда и эпикарда на различные воздействия.	125
3.5.1. Методы обработки эпикарда и перикарда в клинической практике.	128

ГЛАВА IV. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO..... 133

4.1. Источники факторов роста сосудов (VGEF) и пути их получения.	133
4.2. Полученные результаты и их обсуждение.	138

4.3. Исследование жировой ткани различной локализации для качественного и количественного определения МСК.	143
4.4. Разработка липидно-фибриновой матрицы как источника МСК и стимуляторов неоангиогенеза.	150

ГЛАВА V. ИНДУКЦИЯ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА У БОЛЬНЫХ ИБС С ДИФфуЗНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ КОРОНАРНОГО РУСЛА: ОПИСАНИЕ МЕТОДИК.

5.1. Методика ЮрЛеон I.	160
5.2 Методика ЮрЛеон II.	167

ГЛАВА VI. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИК ЮРЛЕОН.

.....	176
.....	176
6.1. Анализ интраоперационных осложнений.	176
6.2. Анализ воспалительных маркеров в периферической крови.	177
6.3. Бактериологический анализ.	180
6.4. Ультразвуковая динамическая оценка перикардита.	181
6.5. Наблюдение за пациентами в отдалённом периоде.	182

ГЛАВА VII. КЛИНИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ МЕТОДИК ЮРЛЕОН.

7.1. Анализ осложнений в ходе и в ранние сроки после операции.	185
7.2. Анализ выживаемости в отдалённом периоде.	187
7.3. Исследование функциональных резервов миокарда.	189
7.3.1. Результаты клинического опроса и обследования.	189
7.3.2. Результаты теста 6-минутной ходьбы.	191
7.3.3. Результаты эхокардиографии.	192
7.3.4. Результаты исследования перфузии миокарда.	197

7.3.5. Результаты коронарошунтографии.	201
7.4. Оценка качества жизни до операции, в ближайший и отдалённый периоды.	204
7.5. Клинико-инструментальный анализ состояния пациентов в отдалённом периоде.	207
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	216
ВЫВОДЫ	236
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	239
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	241

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД - артериальное давление
- a1АТ - альфа1-антитрипсин
- a2МГ - альфа2-макроглобулин
- БСК - болезни системы кровообращения
- БЦА – брахиоцефальные артерии
- ВГА - внутренняя грудная артерия
- ВТК – ветвь тупого края левой коронарной артерии
- ДИ – доверительный интервал
- ДВ – диагональная ветвь левой коронарной артерии
- ЗБВ – задняя боковая ветвь правой коронарной артерии
- ЗМЖВ – задняя межжелудочковая ветвь правой коронарной артерии
- ИБС - ишемическая болезнь сердца
- ИВЛ - искусственная вентиляция лёгких
- ИК - искусственное кровообращение
- ИМ - инфаркт миокарда
- ИМА – интермедиальная артерия
- ИМТ - индекс массы тела
- КДО - конечный диастолический объем
- КЖ – качество жизни
- КСО - конечный систолический объем
- КШ - коронарное шунтирование
- КШГ - коронарошунтография
- ЛЖ - левый желудочек
- ЛКА - левая коронарная артерия
- МСК – мезенхимальные стволовые клетки
- МСК-ЖТ – мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани
- НТ - нейрогенный тонус

ОВ – огибающая ветвь левой коронарной артерии
ОР – отношение рисков
ОНМК - острое нарушение мозгового кровообращения
ПКА - правая коронарная артерия
ПМ - показатель микроциркуляции
ПМЖА - передняя межжелудочковая артерия
МТ - миогенный тонус
МСК - мезенхимные стволовые клетки
МСК-ЖТ - мезенхимные стволовые клетки жировой ткани
РМ - реваскуляризация миокарда
СВКФ - стромально-васкулярная клеточная фракция
СД – сахарный диабет
Синхро-ОФЭКТ - синхронизированная с электрокардиограммой однофотонная эмиссионная компьютерная томография миокарда
СК – стволовые клетки
СКЖТ - стволовые клетки жировой ткани
СККМ - стволовые клетки костного мозга
СН - сердечная недостаточность
СКО - среднеквадратичное отклонение показателя микроциркуляции
СРБ - С-реактивный белок
УО - ударный объем
ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка
ФК - функциональный класс
ФР - фактор роста
ХБП - хроническая болезнь почек
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких
ЦВД – центральное венозное давление
ЧКВ - чрескожное коронарное вмешательство

ЧСС - частота сердечных сокращений

ЭКГ - электрокардиография, электрокардиограмма

ЭЗКТ - эндотелиальнозависимый компонент тонуса

ЭхоКГ - эхокардиография

BP (bodily pain) – интенсивность боли

VEGF – (Vascular endothelial growth factor) - фактор роста эндотелия сосудов

GH (general Health) – общее состояние здоровья

MH (mental Health) – психическое здоровье

PF (physical Functioning) – физическое функционирование

RE (role-Emotional) – ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием

RP (role-Physical Functioning) – ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием

SF (social Functioning) – социальное функционирование

VT (vitality) – жизненная активность

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Болезни системы кровообращения являются доминирующей причиной инвалидизации и смертности во всём мире. Несмотря на успехи профилактики, растёт заболеваемость ими взрослого населения, причём лидирующее место в этой патологии занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС). В России в 2016 г. (Росстат) от сердечно-сосудистых заболеваний умерло 513432 человек, в 2017 г. - почти на 18 тыс. человек больше. В 2016 г. 481780 человек умерло от ИБС (Федеральная Служба Государственной Статистики).

Совершенствование медикаментозной терапии в последние десятилетия позволило значительно снизить смертность и улучшить качество жизни пациентов с ИБС. Ведущую роль в лечении этой патологии занимает хирургический метод. С широким распространением операций коронарного шунтирования (КШ) связывают снижение смертности от ИБС, произошедшее в США в последние десятилетия (Бойцов С.А. и др., 2017; Ford E. S. et al., 2007). В России количество пациентов, оперированных по поводу ИБС, ежегодно увеличивается на 14-17%, из них с КШ – на 7-10% (Шевченко Ю.Л. и др., 2003; Бокерия Л.А. и др., 2012).

При всех достижениях терапевтических и хирургических методов лечения пациентов с ИБС существует довольно большая группа больных, которым консервативные методы уже не помогают, а хирургическая реваскуляризация технически не выполнима: диффузное поражение коронарных артерий, дистальная окклюзия, чрезвычайно высокий риск операции, наличие технических проблем (Бокерия Л.А., 1998). Кроме этого, существует группа пациентов с возвратной, прогрессирующей стенокардией, у которых КШ уже было выполнено, а повторная операция невозможна (Хубулава Г. Г. и др, 2009; Otsuji Y., 1997; Silva G., 2004; Fuchs S., 2006). Попытки лечения таких больных общепринятыми подходами и методами,

зачастую, приводят к усугублению течения болезни и к значимому повышению уровня периоперационной летальности и развитию осложнений (Шевченко Ю.Л. и др., 1998; Gaudino M. et al., 2004).

Более чем полувековой опыт хирургического лечения больных ИБС открыл множество фактов, на которые с позиции традиционного понимания данной проблемы невозможно найти ответы:

- после инфаркта миокарда (ИМ) пациенты изначально отмечают ухудшение, а затем улучшение самочувствия. При этом эффект суммируется после двух или трёх инфарктов;
- «неполная» реваскуляризация миокарда иногда даёт лучший клинический эффект и больший процент выживаемости, чем «полнососудистая»;
- улучшение состояния после КШ пациенты отмечают не сразу после операции, а по прошествии нескольких месяцев;
- многочисленные коронарошунтографии, выявляющие облитерацию шунтов, не всегда коррелируют с ухудшением клинической картины, в ряде случаев пациенты не отмечают возврата стенокардии;
- пациенты, у которых после КШ возникали осложнения, особенно воспалительные процессы в ране и средостенье, в случае успешного их разрешения показывали лучшие результаты регресса стенокардии в отдалённом периоде;
- многочисленные данные, доказывающие эффективность не прямой реваскуляризации миокарда, включая операции трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации миокарда, обосновывающие возможность улучшения кровоснабжения миокарда у пациентов, которым невозможно проведение операции прямой реваскуляризации или данная операция оказалась неэффективной (Allen K. et al. 1998; Whitlow P.L. et al., 1998.; Atluri P. et al., 2008).

Исследования и применение стволовых клеток, факторов роста сосудов заставили в последние годы пересмотреть подходы к лечению ранее «инкурабельных» больных ИБС (Калинин Р.Е. и др. 2017.; Калинин Р.Е. и др. 2018; Gao F. et al., 2007). Способность к физиологической реваскуляризации миокарда за счёт сосудов тканей, окружающих сердце, побуждают изучить возможные методы стимуляции данных процессов (Seiler C. et al., 2010).

Таким образом, проблема поиска новых современных методов лечения пациентов с диффузным поражением коронарного русла является актуальной на современном этапе развития медицины и представляет большую социальную значимость. Необходимо разработать оптимальную комбинацию методов лечения больных ИБС с диффузным поражением коронарного русла, не имеющих возможности для полной первичной или повторной прямой реваскуляризации, которая позволит увеличить отдалённую выживаемость, улучшить качество жизни (КЖ).

В настоящее время вопросы хирургической стимуляции экстракардиальной реваскуляризации миокарда у пациентов с диффузным поражением коронарного русла недостаточно освещены в литературе. Кроме того, не определены эффективность, безопасность, показания и противопоказания к выполнению таких вмешательств, возможные преимущества перед терапевтическими методами лечения.

Цель исследования:

Улучшить результаты лечения больных ИБС с диффузным поражением коронарного русла на основании разработки и применения комплексной программы хирургического лечения, сочетающей методы прямой и экстракардиальной реваскуляризации миокарда.

Задачи исследования:

1. Оценить клиническую безопасность комплексной реваскуляризации миокарда со стимуляцией экстракардиального ангиогенеза у больных ИБС с

диффузным поражением коронарного русла и её влияние на течение заболевания, результаты функциональных проб, качество и продолжительность жизни.

2. Исследовать сократительную функцию сердца у данной категории пациентов после применения комплексной хирургической методики лечения со стимуляцией неоангиогенеза путем ЭхоКГ мониторинга.

3. Изучить динамику перфузии миокарда по данным радионуклеидных методов исследования у больных ИБС с диффузным поражением коронарного русла после применения предлагаемой стратегии лечения.

4. Разработать и изучить эффективность методов инвазивной и интраоперационной обработки перикарда, направленной на стимуляцию неоангиогенеза.

5. Определить возможные источники получения факторов роста сосудов и содержание мезенхимальных стволовых клеток в жировой ткани различной локализации у больных ИБС.

6. Разработать субстанцию для стимуляции неоангиогенеза и способ ее использования.

7. Исследовать морфологические особенности ангиогенеза после применения методов стимуляции экстракардиальной реваскуляризации на экспериментальной модели инфаркта миокарда.

Научная новизна исследования.

В результате экспериментальных исследований *in vitro* впервые обоснована методика механической обработки перикарда и эпикарда во время проведения КШ, разработаны инструменты и доступы для выполнения операций миниинвазивным путем.

Изучено содержание факторов роста (VEGF) в различных тканях и жидкостях организма больного ИБС, предложены методы их выделения в интра- и послеоперационном периодах КШ для стимуляции неоангиогенеза.

Исследовано содержание мезенхимальных стволовых клеток в жировой ткани различной локализации (МСК-ЖТ) организма человека, страдающего от ишемии миокарда. Разработана инновационная липидно-фибриновая матрица, содержащая в своём составе факторы роста эндотелия, МСК-ЖТ. Обоснована возможность её применения при лечении пациентов с ИБС и диффузным поражением коронарных артерий.

В результате экспериментальных исследований *in vivo* определена морфологическая картина влияния применения методик стимуляции экстракардиальной реваскуляризации миокарда при моделировании ИМ. Показана их эффективность.

На большом клиническом материале показана эффективность применения методик стимуляции экстракардиальной реваскуляризации миокарда у пациентов с ИБС и диффузным атеросклеротическим поражением коронарного русла.

Выполнен сравнительный анализ ближайших и отдалённых результатов, проанализированы клиническая картина, продолжительность жизни, показатели сократительной способности миокарда, наличие ишемии по данным сцинтиграфии миокарда и показатели коронарошунтографий у групп пациентов после выполнения классического КШ и при применении методик ЮрЛеон I и II.

Практическая значимость

Разработана методика обработки перикарда и эпикарда и использования аутологических факторов роста эндотелия для применения в комплексном лечении пациентов с ИБС и диффузным поражением коронарного русла.

Предложен оригинальный способ стимуляции экстракардиальной реваскуляризации миокарда в сердечной мышце с использованием липидно-фибриновой матрицы, богатой факторами роста и МСК-ЖТ.

На экспериментальной модели ИМ обосновано клинико-

морфологическое применение предлагаемых методик экстракардиальной реваскуляризации миокарда.

Предлагаемые методы комплексной хирургической реваскуляризации миокарда у больных ИБС с диффузным поражением коронарного русла внедрены в клиническую практику и показано преимущество их применения.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. При хирургическом лечении больных ИБС с диффузным коронарным атеросклерозом, реваскуляризация миокарда должна осуществляться путем прямого шунтирования коронарных артерий и стимуляции ангиогенеза на поверхности сердца.
2. Наиболее доступным методом стимуляции неоангиогенеза во время коронарного шунтирования, является выполнение методики ЮрЛеон I, заключающейся в механической обработке эпикарда и перикарда с целью их десквамации и введении стерильного дренажного экссудата интраперикардиально на 2 сутки после операции.
3. Липидно-фибриновая матрица - аутологичный гуморальный субстрат, содержащий комплекс факторов роста, мезенхимальных стволовых клеток, заключённых в гелевую основу.
4. По возможности целесообразно применять методику ЮрЛеон II, включающую в себя механическую обработку эпикарда и перикарда, введение стерильного аспирата, подготовку и формирование липидно-фибриновой матрицы, размещение её в полости перикарда. Эта методика в большей степени стимулирует неоангиогенез, а также рекомендована при планировании операции с прогнозируемой большой кровопотерей.

Степень личного участия в работе

Автор принимал участие в качестве оперирующего хирурга и ассистента при лечении более 80% обследованных пациентов. Все эксперименты *in vivo* и *in vitro* выполнены лично автором. Им самостоятельно проанализированы

данные клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования всех включённых в исследование пациентов, собраны и проанализированы данные из историй болезни и прочей медицинской документации. Полученные результаты подвергнуты соискателем статистической обработке и использованы при подготовке и оформлении научных статей, в докладах на научно-практических конференциях.

Реализация результатов исследования

Основные результаты исследования внедрены в клиническую практику и используются в процессе обучения на кафедрах грудной и сердечно-сосудистой хирургии с курсом рентгенэндоваскулярной хирургии, хирургии с курсами травматологии, ортопедии и хирургической эндокринологии, хирургических инфекций, внутренних болезней, анестезиологии и реаниматологии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии, лучевой диагностики с курсом клинической радиологии Института усовершенствования врачей ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Научные положения диссертации используются в лекциях и практических занятиях, проводимых на кафедрах: грудной и сердечно-сосудистой хирургии с курсом рентгенэндоваскулярной хирургии, хирургии с курсами травматологии, ортопедии и хирургической эндокринологии Института усовершенствования врачей ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Апробация и реализация работы.

Основные материалы диссертации доложены на XIX Ежегодной сессии научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАН с всероссийской конференцией молодых учёных (Москва, 2015), XX Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2015), XXI Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2015), Всероссийском Конгрессе с международным участием «Хирургия XXI век:

соединяя традиции и инновации» (Москва, 2016), III международной научно-практической конференции «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия» (Смоленск, 2018), International Conference “Scientific research of the SCO countries: synergy and integration” February 11-12, 2019 (Beijing, Republic of China), XLVI Международной научно-практической конференции «Инновационные подходы в современной науке» (Москва, 2019).

Результаты научных исследований по теме диссертации опубликованы в 32 печатных работах, в том числе 17 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, характеристики экспериментальных и клинических материалов и методов исследования, пяти глав, посвящённых результатам собственных работ, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 282 страницах машинописного текста, иллюстрирована 101 рисунком, содержит 25 таблиц. Список литературы представлен 299 источниками литературы, из которых 82 отечественных и 217 иностранных авторов.

ГЛАВА I. ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ ИБС С ДИФфуЗНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ КОРОНАРНОГО РУСЛА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДИК СТИМУЛЯЦИИ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНОГО НЕОАНГИОГЕНЕЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

1.1. Ишемическая болезнь сердца: значимость, методы лечения

ИБС – наиболее значимое социально-экономическое заболевание во всём мире. Общая заболеваемость ИБС в России в 2014 году составляла 19,4% всей заболеваемости взрослого населения. У лиц старшего трудоспособного возраста она составила 30,5%, при этом 97,9% всех зарегистрированных случаев сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) имели место у взрослых [3,4]. В 2016 году (Росстат) от ССЗ умерло 513432 человек. В 2017 году наблюдался рост смертности почти на 18000 человек [6].

Утрата части функционирующего миокарда вследствие инфаркта, повторяющихся ишемий, сопровождается комплексом структурных изменений, включающих как повреждённые, так и неповреждённые участки миокарда. Эти изменения в структуре и геометрии камер сердца, именуемые "ремоделированием сердца", часто предшествуют клиническому проявлению сердечной недостаточности, могут самостоятельно усугублять систолическую и диастолическую дисфункцию желудочков и отрицательно влиять на КЖ и прогноз больных [58].

Среди больных ИБС особо тяжёлый контингент представляют пациенты с низкой сократительной способностью миокарда левого желудочка (ЛЖ) после перенесённых ИМ. Вероятность неблагоприятного прогноза прогрессивно нарастает по мере снижения фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ). Так, 5-летняя выживаемость больных ИБС с ФВ ЛЖ менее 35%, получавшим только медикаментозное лечение, по данным различных исследователей колеблется от 4% до 25% [7].

У больного с хронической формой ИБС запускаются эндогенные

защитные механизмы - неоваскуляризация, которая является совокупностью процессов ангиогенеза, артериогенеза и, потенциально, васкулогенеза. Однако данные процессы носят продолжительный характер и приводят к развитию внутрисистемных и межсистемных коллатералей при длительно существующем заболевании.

Лечение больных ИБС, в первую очередь, направлено на уменьшение клинических проявлений, а также на предотвращение развития ИМ. Традиционные методы фармакологического лечения направлены на защиту и поддержание деятельности сохранного миокарда, не вовлечённого в зону рубца. Многочисленные исследования показали преимущества использования активной хирургической тактики, в особенности у пациентов групп высокого риска. Yusuf S. и соавт. в пятилетней перспективе показали, что меньший риск летального исхода отмечался у пациентов после выполненного КШ (10,2%), по сравнению с больными, получавшими медикаментозное лечение (15,8%, $p < 0,001$). Данные семилетних наблюдений демонстрируют 15,8% летальность после КШ, против 21,7% случаев при медикаментозной терапии ($p < 0,001$). Анализ же десятилетних исследований фиксирует 26,4% летальных исходов у оперированных пациентов и 30,5% - у пациентов при медикаментозной терапии ($p < 0,05$) [295]. Рандомизированное контролируемое клиническое исследование сравнения исходов лечения больных ИБС терапевтическими, эндоваскулярными или хирургическими методами (MASS II) показало преимущество использования КШ, заключающееся в снижении количества рецидивов стенокардии, ИМ и смерти от кардиальных причин в десятилетней перспективе [143].

Несмотря на огромные успехи коронарной хирургии, все виды оперативных вмешательств, которые направлены на восстановление тока крови по венечным артериям, являются, в известной степени, паллиативными и не оказывают значимого воздействия на основной процесс - атеросклероз,

инициировавший изменения в коронарных артериях (КА). Более того, эти операции фактически предназначены для выигрыша времени в надежде на локальную перестройку микроциркуляторного русла и компенсацию ишемических изменений за счёт образования новых коллатералей. Так, в 20-30% после выполненных коронарных ангиопластик возникает рестенозирование КА в течение шести месяцев. Несколько больший процент развития рестенозов регистрируется при эндартерэктомиях, лазерных интракоронарных абляциях и других физических методах, восстанавливающих просветы КА. Близкие по характеру проблемы стоят при КШ [66]. Приблизительно в 25-30% случаев калибр КА недостаточен для эффективного КШ [11,113]. Часть КА подвержена диффузным изменениям, и они также являются «нешунтабельными» [60]. Кроме того, часть сосудов подвержена диффузным изменениям на всём протяжении, что делает их так же «нешунтабельными». Таким образом, существует значительная группа больных, для которых выбор традиционных методов прямой реваскуляризации миокарда ограничен. К этой же группе относятся пациенты с диффузным поражением интрамуральных ветвей КА, а также пациенты ранее перенесшие операцию прямой реваскуляризации миокарда с плохим результатом [8,249,31,281,61]. Не менее сложна и проблема эффективной помощи больным, которые в анамнезе имеют два и более КШ и множественные ангиопластические процедуры [31,249,281]. Именно эти факты не позволяют останавливаться на достигнутых рубежах, а заставляет заново и творчески переосмыслить значение и необходимость стимуляции непрямо́й реваскуляризации и ангиогенеза в ишемизированных тканях сердца.

С целью комплексного понимания проблемы, необходимо обратиться к историческим предпосылкам в лечении пациентов с ИБС [9].

1.2. Эволюция методов лечения больных ИБС.

Изначально проблема имела приверженцев лишь терапевтического лечения. Более 135 лет назад один из величайших хирургов XIX века Christian Albert Theodor Billroth сказал: *«Всякий хирург, который попытается оперировать на сердце, должен потерять уважение коллег»*. Однако шли годы, и развитие хирургии невозможно было остановить. И уже в 1896 году по всему миру разошлось сообщение о том, что немецкий хирург Людвиг Рен успешно ушил рану сердца. Начавшись с этого события, кардиохирургия сегодня представляется одной из самых высокотехнологичных отраслей медицины [94].

Попытки хирургов в лечении стенокардии были предприняты ещё в конце XIX столетия. Первоначально этой проблемой занялись нейрохирурги совместно с терапевтами, позже к ним присоединились и специалисты в области грудной хирургии.

Операции, основной целью которых было устранение болевого синдрома путем воздействия на афферентные нервные пути сердца. В конце XIX века Francois-Frank С. А. предпринял попытку устранить сердечные боли путем пресечения симпатических стволов на шее [37,123]. В 1916 году Jonnesco Т. проводил удаление симпатических узлов - средних и нижних шейных ганглиев и первых грудные ганглиев с левой стороны. Его результат был настолько обнадеживающим, что он не оперировал с правой стороны. В более поздней модификации операции он также удалил верхние шейные ганглии. [163]. Fauteux М. в 1946 году применял пересечение задних корешков спинного мозга в сочетании с периаортальной симпатэктомией КА [114]. Все подобные вмешательства основывались как минимум на трёх принципах, реализуемых в ходе вмешательства: блокада передачи сосудосуживающих импульсов по вазомоторным нервам; перерыв в осуществлении кардиопрессорных рефлексов

и снижение в результате этого работы миокарда; блокада эфферентных импульсов.

Kocher Т. впервые выдвинул гипотезу причинно-следственной связи между гипотиреозом и атеросклерозом в 1883 году [171]. Он в 1902 году заметил, что после полной тиреоидэктомии пациент с стенокардией стал бессимптомным. Было высказано предположение, что повышенные гормоны щитовидной железы привели к увеличению потребности миокарда в кислороде и питательных веществах и, следовательно, вызвали ишемию. Воас (1926) впервые выполнил субтотальную тиреоидэктомию для лечения стенокардии, но безуспешно [212]. Levine S. A. в 1933 году провел полную тиреоидэктомию для снятия стенокардии и сообщил об этом опыте [185].

В 1933 г. Blumhart Н. L. комбинировал эти методы лечения и впервые выполнил операцию тиреоидэктомии в сочетании с шейной симпатэктомией. В нашей стране подобную операцию выполнил директор госпитальной хирургической клиники 1-го Московского медицинского института им. И. М. Сеченова профессор П.А. Герцен в 1938 г.

Предпринимались и принципиально другие попытки, направленные на снижение нагрузок на миокард и его работы. Так, Г.А. Рейнберг предложил облегчить работу сердца по преодолению отрицательного давления со стороны плевральных полостей посредством образования окна в центре диафрагмы, что обеспечивало функциональную абдоминальную транспозицию сердца. Первая такая операция была выполнена в 1953 году Е.Л. Березовым.

Но, несмотря на все эти разработки, уже тогда приходило осознание недостаточной эффективности подобных вмешательств. Результаты операций не оправдывали себя. Было очевидно: необходимо искать пути улучшения кровоснабжения миокарда.

В дальнейшем были предприняты попытки соединить интрамиокардиальную сосудистую сеть с полостью левого желудочка

воздействуя на эндокард насечками, либо его иссечением [138,289,167]. Эти работы получили своё продолжение при разработке искусственных трансмиокардиальных каналов методом акупунктуры, тунелирования миокарда левого желудочка, однако анализ результатов этих работ показал быстрое закрытие, фиброз и рубцевание создаваемых каналов. Использование лазерных технологий для выполнения процедуры непрямой реваскуляризации миокарда широко распространено в настоящее время.

Подшивание к поверхности перикарда других тканей.

В начале XX столетия некоторые учёные обратили внимание, что существует группа больных, у которых имеется несовместимая с жизнью полная облитерация коронарных сосудов при наличии обширных сращений сердца с перикардом [93]. Было выдвинуто предположение, что эти богато васкуляризированные сращения являются альтернативным источником кровоснабжения миокарда.

Метод поверхностной реваскуляризация миокарда заключается в подшивании к миокарду какого-либо хорошо васкуляризированного органа или ткани. Через определённый промежуток времени возникают сосудистые анастомозы, обеспечивающие приток крови из экстракардиального органа к миокарду, тем самым улучшается его кровоснабжение [252].

Начиная с 1933 г. проводили работы по увеличению коллатерального кровообращения в сердце и экстракардиальных анастомозов [92]. Они сделали вывод о том, что закрытие обеих КА совместимо с жизнью после предварительного создания сращения между сердцем и васкуляризирующей тканью, пригодной для создания коллатералей.

В 1935 году Векс С. опубликовал первую работу по прямым вмешательствам такого типа на сердце [92]. В 1935 г. ирландский хирург L. O'Shanghnessy подшил к поверхности сердца больного, страдавшего ИБС, сальник на ножке. К 1938 г. он располагал опытом 20 подобных операций [223].

Позднее была разработана методика кардиопневмопексии — подшивание к миокарду лёгкого, а также жировой клетчатки средостенья, однако выраженного клинического эффекта операция не имела. Л. С. Журавский (1963) разработал в эксперименте и применил в клинике метод еюнокардиопексии. Техника операции заключалась в выполнении левосторонней торакотомии, диафрагмотомии, затем в плевральную полость выводилась петля тонкой кишки; вскрывался перикард и после скарификации эпикарда и серозного покрова на кишке последняя подшивалась к эпикарду после предварительного наложения энтероэнтероанастомоза [21]. Однако последующие исследования не показали наличие значимого эффекта в отдаленном периоде.

В 1938 году, впервые в эксперименте, предложили для улучшения реваскуляризации сердца подшивать левую долю лёгкого к миокарду [187]. В дальнейшем эта операция широко использовалась в клинике. Сообщали о положительном эффекте у половины прооперированных больных [41]. Использовать для реваскуляризации миокарда кожный лоскут на ножке предложили J.Wedel (1955). Лоскут выкраивался в области верхушечного толчка и после перикардиотомии фиксировался к передней поверхности миокарда правого и левого желудочков [286].

В 1957 году Рейнберг Г. А. предложил операцию абдоминализации сердца с целью лечения ИБС. Техника операции состоит в рассечении диафрагмы и перикарда, в результате чего полость перикарда сообщается с брюшной полостью. При этом после перикардиотомии развиваются сращения, которые ведут к экстравазальной реваскуляризации миокарда [52].

В дальнейшем применялись различные методы миокардиопексий: подшивание к эпикарду грудной мышцы, лоскута межрёберных мышц [39], прямой мышцы живота и филатовского стебля. В экспериментальных исследованиях была показана возможность образования сосудистых

анастомозов между сальником и декапсулированной почкой после ее оментизации [41].

Кардиоперикардиопексия.

Использовать перикард как источник коллатерального кровоснабжения было предложено в 1932 г. В 1935 г. Roberts W.I. сообщил о возможности вызвать искусственный перикардит. В следующем году O'Shanghnessy стал применять алеуронатовую пасту с целью получения воспалительной реакции в полости перикарда. Beck C. использовал с этой же целью костяной порошок. Операции такого типа получили широкое распространение с 1939 г., когда Thomson L. применил для этой цели тальк. Техника операция была следующая: над 5-м левым рёберным хрящом делают разрез длиной в 7,5 см, достигающий до грудинно-реберного сочленения. После осторожного разделения тканей делают небольшой разрез в перикарде, через который отсасывают содержимое полости перикарда и вводят 5 мл 2% новокаина на поверхность эпикарда с целью предупредить возможное мерцание желудочков. Раствор новокаина через 5 мин. отсасывают; затем на переднюю поверхность и нижний и левый контуры сердца наносят примерно около 8 г стерильного талька; разрез на перикарде зашивают.

Thomson L. накопил большой опыт в области кардиопексии. Внутрибольничная смертность составила 10% (на 180 операций). В части случаев смерть, по мнению Thomson L., не была связана с самой операцией, а произошла по другим причинам — вследствие разрыва нераспознанной аневризмы брюшной аорты или диабетической комы; тем не менее, все эти случаи вошли в статистику операционной смертности.

Согласно опыту перечисленных авторов, вдвигание в полость перикарда стерильного безводного силиката магния (талька) является хорошим методом получения перикардиальных сращений; выраженная гиперемия возникала уже в ближайшие часы и держалась до 2—3 недель. Считалось, что эта гиперемия

способствует открытию уже существующих анастомозов и образованию новых. Beck С. при подобных вмешательствах использовал костный порошок [92].

По данным Bailey G.L. перикардальные боли после такой операции стихают в течение трёх дней; ангинозные же боли могут в дальнейшем совершенно исчезнуть. Если же эти боли все же возобновляются, то обычно они бывают слабее, чем до операции.

Отечественные авторы впервые создали асептический экзоперикардит путем обнажения перикарда и обработки его наружной поверхности тем или иным раздражающим веществом (преимущественно 5% или 7,5% раствором трихлоруксусной кислоты) и припудриванием крупнозернистым тальком [41].

Скарификация эпикарда.

Beck С. первым произвёл скарификацию эпикарда, предполагая, что в результате образования сращений между эпикардом и перикардом произойдёт прорастание эпикардиальных сосудов миокарда [93].

Наркен D.E использовали фенол с целью «устранения препятствия для врастания коллатеральных сосудов». Он пользовался также подшиванием к обнажённому миокарду язычковой доли лёгкого как богато васкуляризированного источника нового кровоснабжения. Операция состоит, таким образом, из следующих моментов: 1) дезэпикардиализации с помощью 95% фенола; 2) введения порошка; 3) пневмопексии. С введением этого метода как у экспериментальных животных, так и у людей частота аритмии во время операции уменьшилась, а общие результаты лечения улучшились. Из 18 больных, подвергнутых операции, не умер ни один; боли смягчились весьма значительно [145].

В 1952 году Огнев Б. В. опубликовал исследование, в котором отметил исчезновение ангинозных болей в сердце после нанесения 10—15 сквозных насечек на перикарде [45], а в 1962 году Никулин В. И. произвёл рассечение

перикарда полностью у двух больных и получил стойкий положительный эффект [44].

Использование сосудов грудной полости.

В 1940 г. для улучшения миокардиального кровотока выполняли перевязку большой вены сердца с созданием перикоронарной денервации и резекции сосудистых сплетений [115]. Основой для данной операции послужили сообщения различных исследователей, которые показали, что вмешательства на венозной системе способствуют раскрытию межкоронарных анастомозов [46,135,138]. Век С. (1948) предложил суживать венозный синус с последующим анастомозированием синуса с аортой. Несмотря на опасность осложнений, по сообщениям автора, эта операция обладала наиболее выраженным реваскуляризирующим эффектом среди всех вмешательств на венозных коллекторах сердца [81]. Однако широкого распространения данная методика не получила в связи с техническими сложностями и высокой летальностью [93].

Итальянским хирургом Fieschi D. (1939) была разработана операция двусторонней перевязке внутренних грудных артерий (ВГА) с целью увеличения кровотока к перикарду и сердцу. Механизм улучшения коронарного кровотока при этом осуществляется за счёт наличия коллатералей между внутренними грудными и венечными артериями и соответственном увеличении притока крови к венечным артериям после перевязки ВГА на уровне II — III межреберья [117]. Fieschi D. с успехом провёл эту операцию на пациенте, больном стенокардией. Однако данное вмешательство было забыто, и только после середины XX в. Battezzati M. сумел его возродить.

Первым, кому значительно удалось приблизиться к решению вопроса хирургического лечения больных ИБС, был канадский хирург, физиолог и исследователь Viniberg A. в 1945 г. в Монреале. Ему принадлежит приоритет в разработке первой в мире операции, которая действительно обеспечивала

повышение кровотока к ишемизированному миокарду. Операция Вайнберга стала важной ступенью в эволюции представлений о хирургическом лечении больных ИБС [282].

Её смысл заключался в имплантации специально подготовленного трансплантата внутренней грудной артерии в тоннель, сформированный в миокарде. Перед имплантацией свободный конец артерии перевязывался, а мелкие боковые веточки, напротив, оставлялись нелегированными. При имплантации одной артерии используют трансплевральный доступ, при имплантации двух артерий — трансстернальный. После мобилизации артерию пересекают на уровне VI межреберья, формируют туннель в миокарде и имплантируют в него кровотокающий конец артерии.

При разработке своей операции Viniberg A. опирался на сделанное Верном в 1933 году описание особых миокардиальных капилляров — синусоидов. Однако существование таких капилляров оставалось недоказанным: гистологическое исследование сосудистой сети миокарда давало противоречивые результаты. Тем не менее, было известно, что в период эмбриогенеза миокард обладает сосудистой сетью именно такого типа — синусоидного, которая позже замещается развитием системы коронарного кровообращения.

Вторым важным моментом, через который должен был реализовываться эффект от операции, был неоангиогенез. В 1955 году Bailey C., описывая свой опыт операции Вайнберга, отмечал: «Как у животных, так и у человека, перенёвших интрамиокардиальную имплантацию внутренней грудной артерии с постоянным истечением крови из ее ветвей, всегда наблюдается образование гематомы в пределах миокарда». Он же подметил уникальную особенность сердечной мышцы: «Губчатая структура миокарда позволяет абсорбировать весь дополнительно излившийся в него объем крови». Как было выяснено

позже в ходе различных исследований, образование гематомы является одним из факторов неоангиогенеза.

Таким образом, целью операции Вайнберга является создание ретроградного механизма коронарной перфузии через миокардиальный синусоид, а также развитие сосудистой сети миокарда. Согласно этому принципу образование такого анастомоза происходит следующим образом: кровь поступает через открытые мелкие ветви или отверстия в стенке ВГА в миокардиальный синусоид; далее кровь ретроградно поступает в мельчайшие артериолы КА, чему способствует активное сокращение миокарда. Со временем происходит образование «анастомоза» между синусоидом и артериолой КА, а также разрастание капиллярной сети миокарда за счёт накопления гематомы. Первые свои операции Viniberg A. отрабатывал в эксперименте в 1945 году и, получив удовлетворительные результаты, уже в 1950 году начал выполнять их в клинике.

Таким образом, операция Вайнберга заключалась в непрямой реваскуляризации коронарного русла и предшествовала эре коронарной хирургии.

Важную роль в хирургическом лечении больных ИБС сыграл в нашей стране А.Н. Бакулев (1961), последовательно выступавший за использование хирургических методов лечения больных как с хронической коронарной недостаточностью, так и с острым ИМ. Он предложил производить комбинированную операцию - перевязку ВГА для улучшения коронарного кровообращения в ближайшее после операции время и затем - кардиоперикардиопексию: оба этих вмешательства выполняли внеплеврально.

Метод трансмиокардиальной реваскуляризации.

Идея создания прямых коммуникаций между полостью и миокардом ЛЖ родилась после описания интрамиокардиальных синусоид [285]. Они впервые

описали прямые сосудистые коммуникации между КА и камерами сердца посредством миокардиальных синусоид, то есть сети прямых артерио-люминальных, артерио-синусоидальных, люмино-синусоидальных и люмино-венозных соединений. Подобная система кровоснабжения миокарда присутствует в основном у рептилий, в частности, у аллигаторов, у которых 70% миокарда перфузируется из полости ЛЖ и только 30% посредством КА. Развитие методов трансмиокардиальной реваскуляризации основывалось на особенностях эволюции миокардиального кровообращения [174]. Система кровообращения миокарда млекопитающих и человека сохранила некоторые черты кровообращения рептилий и более примитивных существ - через синусоиды [156,285]. У человека синусоидный тип кровоснабжения имеет место в эмбриональном периоде, затем в ходе онтогенеза он постепенно замещается на эпикардиально — коронарный. У новорождённых функционирующие синусоиды описаны при синдроме гипоплазии ЛЖ [126,133,224]. Существующее кровоснабжение миокарда при этом синдроме подтверждало возникшую идею о возможности создания канальцев желудочков для защиты миокарда от ишемии.

Попытки воспроизвести "эмбрионизацию сердца" начались с 1957 года, в эксперименте с помощью имплантации Т-образных полиэтиленовых катетеров разработали технику создания сообщений между полостью ЛЖ и миокардом [197]. Техника, которая породила современную методику трансмиокардиальной реваскуляризации, была предложена Р. Сен. Они создавали трансмиокардиальные каналы методом акупунктуры. Исследовалась принципиальная возможность поступления оксигенированной крови из полости ЛЖ в ишемизированный миокард [254]. Отечественный исследователь Ю.М. Ишенин (1986) разработал в эксперименте и применил в клинике метод туннелизации миокарда с помощью тубусного скальпеля [23], А.Я. Кононов и В.Т. Зайцев (1992) предложили для реваскуляризации имплантировать в миокард протез микрососудов с последующей обработкой внутрискладочного туннеля лазерным излучением [32].

Ближайшие результаты исследований были обнадеживающими, однако клеточная инфильтрация в зоне повреждения, быстрое разрастание фиброзной ткани и образование рубцов способствовали закрытию каналов и ограничивали применение этих методов [178,237]. Как показал анализ, быстрое закрытие, фиброз и рубцевание создаваемых каналов было вызвано преимущественно механической травмой. Поэтому существовала необходимость определить метод, при котором возможно было избежать грубого механического воздействия. В 1969 г. появилось сообщение о возможности использования лазеров в исследованиях сердечно-сосудистой системы [219]. Появилась возможность заменить грубую механическую силу в создании каналов на воздействие световой энергии. Использование лазера, как оказалось, предотвращает необходимость удаления тканей за счёт испарения внутриклеточной жидкости. Как показали исследования, воздействие не фокусированного лазера не влияет на сердечные сокращения, их частоту, артериальное давление и электрическую активность сердца. Это позволяет использовать его на бьющемся сердце. В этом же году изучили возможность трансмиокардиальной реваскуляризации ишемизированного миокарда с помощью 450 Вт CO₂-лазера, при этом луч лазера перфорировал миокард со стороны эпикарда с минимальным повреждением окружающих тканей [207]. В своих исследованиях они показали, что после перевязки передней нисходящей артерии животные имели смертность до 83%, в то же время смертность была нулевой, если перевязка артерии дополнялась трансмиокардиальной реваскуляризацией. Таким образом, трансмиокардиальные лазерные каналы оказывали выраженное протективное действие на ишемизированный миокард в ближайшие и отдалённые сроки после операции.

Прямая реваскуляризация миокарда.

Введение в клиническую практику в 1953 г. Gibbon D. ИК и в 1959 г. Sones F. селективной коронарографии позволили предпринять попытки по

осуществлению прямой реваскуляризации миокарда [59] Родоначальником коронарной эндартерэктомии стал американский хирург Bailey С.. Он разработал три её вида: прямую, антеградную и ретроградную – через устья КА в условиях ИК. Также Bailey С. разработал специальный инструментарий для осуществления данной процедуры, в том числе микрокюретки для КА. Эта операция впервые была выполнена на периферических артериях в 1948 году Dos Santos. Эндартерэктомия нередко осложнялась тромбозом КА с развитием ИМ, и летальность при этих вмешательствах была очень высокой. [51]. Первым обходное аортокоронарное шунтирование в 1962 году выполнил D. Sabiston (Дьюкский университет), однако оперированный больной спустя два дня умер, и сообщение об операции было опубликовано лишь в 1973. В 1964 году Н.Garret и М. De Bakey выполнили аортокоронарный шунт с использованием большой подкожной вены. Тем не менее, они опубликовали свои результаты в 1973 году. Поэтому первым об успешной операции сообщил Favaloro R. в 1967 г. (Кливленд, США), и с этого времени он начинает систематически осуществлять КШ. В 1964 г. хирург В. И. Колесов (Ленинград) создал анастомоз между ВГА и левой КА.

Несмотря на огромные успехи медицины и хирургии в частности, основными оперативным вмешательствами, на сегодняшний день, остаются аортокоронарное шунтирование и стентирование КА.

Оба вида оперативных вмешательств направлены на восстановление тока крови по венечным артериям и, следует отметить, что они в известной степени являются паллиативными и не оказывают значимого воздействия на основной процесс, инициировавший изменения в коронарных артериях - атеросклероз. Остаётся целый ряд больных, которым эти методы применить не удаётся. Это, прежде всего пациенты, у которых шунтирование КА технически не представляется возможным. Сюда входят диффузные атеросклеротические поражения КА, поражения дистального русла, либо КА малого диаметра,

непригодные для наложения анастомозов и ангиопластики. Более того эти операции фактически предназначены для выигрыша времени в надежде на локальную перестройку микроциркуляторного русла и компенсацию ишемических изменений за счёт образования новых коллатералей. Именно этот факт не позволяет останавливаться на достигнутых рубежах, а заставляет заново и творчески переосмыслить значение и необходимость стимуляции не прямой реваскуляризации и ангиогенеза в ишемизированных тканях сердца.

Но нельзя отрицать и фактор не прямой реваскуляризации, который имеет место во время любой открытой операции на сердце. При вскрытии перикарда и длительных манипуляциях внутри него, осуществляется довольно агрессивное воздействие – рассечение перикарда для создания доступа к сердцу, подкладывание салфеток, рассечение перикарда и миокарда в месте формирования анастомозов, установка дренажей в полость перикарда. Данные манипуляции приводят к повреждению как перикарда, так и эпикарда и в послеоперационном периоде наблюдается выделение серозной жидкости по дренажам из ретростерального и перикардиального пространства, как ответ на возникшее повреждение. Само возникновение асептического перикардита косвенно способствует развитию воспаления и образованию новых артериальных коллатералей. Особенно это заметно при выполнении повторных операций на сердце, когда доступ к сердцу представляет довольно сложную задачу, обусловленную большим количеством сращений между листками перикарда и эпикарда. При рассечении данных сращений определяется множество сосудов, заполненных артериальной кровью. При этом количество сосудов и сращений чётко коррелирует с величиной воздействия внешних факторов на перикард на данном участке. Особенно это выражено при использовании ВГА при ранее выполненном шунтировании. Отмечается прорастание сосудов по всей длине ВГА в перикард и анастомозирование ее веточек с передней межжелудочковой и диагональной артерии.

Недаром до внедрения прямой реваскуляризации миокарда, многие методы лечения ИБС имели своей целью добиться именно такой агрессии при помощи различных способов.

Мыш Г.Д. и соавт. в ходе ряда исследований показали, что из всех факторов по включению потенциальных резервов кровеносного русла наиболее выраженным эффектом, направленным на стимуляцию сосудистой активности, является асептическое воспаление [42].

В работе Шевченко Ю.Л. и соавт. при обследовании пациентов, перенесших КШ в отдалённом периоде, выявлено, что при селективной ангиографии ВГА отчётливо визуализируются новые сосудистые сети, прорастающие в перикард и миокард ЛЖ, являясь дополнительным источником кровоснабжения сердца. Это позволило сделать вывод о том, что выполнение операции КШ осуществляет реваскуляризацию миокарда не только прямым способом, но и косвенно, путем развития экстравазальной кровеносной сети [71].

Изучение морфофункциональных изменений миокарда, организация его микроциркуляторного русла, проницаемость его гемотканевого барьера при ишемии и ее коррекции различными методами реваскуляризации является одной из актуальных проблем современной кардиологии и морфологии [29,43,118,132,144,177]. Вопросам реваскуляризации миокарда, механизмам и эффективности ангиогенеза в стенке сердца при медикаментозной и хирургической коррекции ишемических изменений посвящено большое количество научных исследований [84,152,8]. На сегодняшний день в литературе имеются сведения о морфофункциональном состоянии кардиомиоцитов и кровеносных сосудов при воздействии на ишемизированный миокард лазера, механической пункции и химических агентов [104,213]. Однако эффективность разрабатываемых и применяемых методов различна и весьма часто недостаточна для однозначных показаний к их применению.

Таким образом, вопросы непрямой реваскуляризации миокарда являются актуальными на сегодняшний день. Возможность «усиления» операций шунтирования КА, а также выполнения самостоятельных операций с целью развития коллатерального непрямого кровоснабжения миокарда у пациентов, которым выполнение реваскуляризации миокарда невозможно, является нерешённой задачей медицины. Поиск эффективного метода, позволяющего направленно проводить реваскуляризацию в ишемизированных и/или гибернированных участках миокарда, может стать методом выбора для большей части пациентов с коронарной патологией.

1.3. Клеточные технологии в лечении пациентов с ИБС.

В течение последних нескольких лет актуальным предметом исследования стало изучение природы и функциональных особенностей различных популяций стволовых клеток (СК) во взрослом организме [130]. Понятие «стволовая клетка» объединяет в себе иерархию клеточных типов, потенциальность которых, т.е. способность дифференцироваться в различных направлениях, постепенно снижается: тотипотентная СК —> плюрипотентная —> мультипотентная —> унипотентная. Обычно СК подразделяют на две категории:

- Эмбриональная СК (тоти- и плюрипотентные клетки), включают в СК предимплантационного эмбриона, и СК — производные первичных клеток герминативного ряда в постимплантационном эмбрионе. Эмбриональные СК способны к неограниченному самообновлению, при формировании бластоцисты дифференцируются в производные всех трёх зародышевых листков [53].

- Региональные СК (мультипотентная СК), немногочисленная популяция частично коммитированных клеток, являющихся предшественниками дифференцированных клеток, типичных для тканей, в которых они

располагаются. Способны на протяжении всей жизни организма, в том числе и на этапе эмбриогенеза, поддерживать соответствующий клеточный компартмент [53]. СК способны к длительному пребыванию в покоящемся состоянии (фазе G₀ клеточного цикла), а при стимуляции – к самовоспроизведению (практически неограниченному числу симметричных делений с воспроизведением дочерних клеток без потери мультипотентности) либо к асимметричным митотическим делениям с воспроизведением унипотентных (частично дифференцированных) дочерних клеток [188,53]. Направление дифференцировки определяется специфичным тканевым микроокружением СК (нишей), продуцирующим комплекс ростовых факторов и цитокинов. Находясь в фазе G₀ клеточного цикла СК рефрактерны к внешним сигналам. СК способны мигрировать в пределах ткани, из которой они происходят и вне ее [157]. Региональные СК - недифференцированные клетки и большинство из них трудно идентифицировать морфологически. Однако они экспрессируют некоторые уникальные маркеры. Так, антигены CD34, CD 133 представлены на большинстве гемопоэтических СК (ГСК), Stro1 - на мезенхимальных, белок промежуточных филаментов нестин - в цитоплазме нейральных СК [53]. Фенотипическим маркером СК является интенсивная транскрипция генов группы MDR (multi drug resistance) и, как следствие, экспрессирование на клеточной мембране Р-гликопротеина — белка, ответственного за высокую лекарственную устойчивость СК [96]. Сегодня предметом актуальных споров и обсуждений является такое свойство региональных СК, как «пластичность», т.е. способность к редифференцировке с изменением спектра дифференцировочного потенциала. Согласно общепринятым представлениям коммитирование и дифференцировку клеток рассматривают как многоступенчатый, однонаправленный и необратимый процесс [242]. Однако в последних работах, посвящённых этой теме, были описаны случаи обратного коммитирования на разных стадиях

дифференцировки. Так ГСК костного мозга мезодермального происхождения дифференцируются в эпителий желчных протоков (клетки эндодермального происхождения) [179]. В системе *in vivo* достигнута дифференцировка мезенхимальных СК (мезодермального происхождения) в нейроны и глиальные элементы (эктодермального происхождения) [276].

МСК – это мультипотентные стволовые клетки мезодермального происхождения, отвечающие следующим критериям [110]:

1. Адгезия выделенной культуры к пластику.
2. Экспрессия кластеров дифференцировки (CD)105, CD73, CD90.
3. Отсутствие экспрессии CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79, CD19 и A-DR.
4. Способность дифференцироваться в жировую, костную и хрящевую ткань.

Преимуществами МСК перед другими видами стволовых клеток, потенциально применимых для клеточной терапии ССЗ, являются: лёгкая доступность для выделения, высокая скорость пролиферации, иммунопривилегированность, способность к хоумингу в повреждённую ткань, низкий риск аритмогенности и онкогенности.

На сегодняшний день основным источником для получения МСК является костный мозг [28]. однако эти клетки присутствуют практически во всех тканях взрослого организма:

- **жировой ткани (ЖТ)** [48,299],
- **коже** [275],
- **пульпе зуба** [12,137,112],
- **печени** [217],
- **синовиальных оболочках** [108],
- **скелетной мышце** [290],
- **легком** [180],
- **пуповинной крови** [1,57,235],

- амниотической жидкости [85,191] и
- плаценте [64].
- кроме того, источником МСК может служить периферическая кровь [57,65].

Особого внимания в качестве материала для клеточной терапии заслуживают МСК-ЖТ взрослого организма. Лёгкая доступность для выделения, в сочетании с высоким содержанием стволовых клеток положительно отличают ЖТ от КМ [50]. При этом многие исследователи отмечают большое сходство популяций МСК, полученных из этих двух источников [48] Однако, в последнее время проведён целый ряд исследований, посвящённых сравнению культуральных, секреторных и дифференцировочных свойств МСК из КМ и ЖТ, которые обнаружили особенности этих популяций. В своей работе С.У. Li et all (2015) отмечают ряд преимуществ МСК-ЖТ в отношении пролиферативной активности, иммуномодулирующего эффекта, а также секреции ряда факторов (фактора роста фибробластов (FGF), интерферона- γ (ИНФ- γ) и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1)). При этом МСК из КМ (МСК-КМ) показали лучшую способность к остеогенной и хондрогенной дифференцировке и более активно секретировали фактор стромальных клеток -1 (SDF-1) и гепатоцитарный фактор роста (HGF) [189]. По данным Р.И. Дмитриевой и соавт. (2012) на ранних пассажах (второй – четвёртый) МСК-КМ и МСК-ЖТ были сравнимы по таким важным характеристикам, как скорость пролиферации и потенциал к дифференцировке, но существенно отличались по экспрессии CD146+ (25 ± 5 % и 7 ± 3 % для МСК-КМ и МСК-ЖТ, соответственно) и уровню секреции сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), SDF-1, моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1) и трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1). Кроме того, уже на пассажах 3 -4 МСК-КМ проявляли признаки репликативного старения, в то время как большинство МСК-ЖТ не проявляли

данные признаки до 6–8 пассажа.

Было показано, что МСК-ЖТ обладают потенциалом к дифференцировке в кардиомиоциты *in vitro* [239]. Rangappa и соавт. первые описали появление спонтанно бьющихся клеток спустя неделю после добавления к МСК-ЖТ 5-азациитидина. На второй неделе дифференцировки 30% клеток формировали шароподобные структуры, которые спустя неделю начинали биться спонтанно. По данным иммуногистохимии данные структуры окрашивались на тяжёлые цепи миозина, тропонина I и α -саркомерного актинина [244].

В последующем была описана кардиомиоцитарная дифференцировка этих клеток и без добавления каких-либо веществ. В другом исследовании при высаживании стромально-васкулярной фракции жира на метилцеллюлозу через 6 суток обнаруживали у клеток контрактильную активность, а позже у некоторых и пейсмерную. Эти данные подтверждают наличие миогенных стволовых клеток в строме жира [240].

Рядом исследователей доказано, что МСК, полученные из жировой ткани (висцеральной и подкожной), содержат прогениторные клетки с ангиогенным потенциалом. Они способны к дифференцировке в зрелые эндотелиальные клетки и участвовать в формировании сосудов, являясь при этом основой для неоангиогенеза [206,239,240,192,193].

В ряде экспериментальных работ *in vivo* на модели ИМ трансплантация МСК-ЖТ приводила к улучшению морфофункциональных показателей сердца после инфаркта [90,231]. В экспериментальном исследовании Ниа Р. и соавт. проведено сравнение четырёх групп мышей. В эксперименте у всех животных моделировали ИМ и в последующем изучали фракцию выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) при помощи эхокардиографии. В первой группе комбинировалось введение МСК с сосудистым эндотелиальным ростовым фактором (ЭСФ), во второй группе проводилось лечение только МСК, в третьей группе - только ЭСФ, четвертая группа была контрольной. Выявлено,

что увеличение ФВ ЛЖ в первой группе значимо выше, чем во всех остальных группах ($p < 0,01$). При этом в первой группе большая часть меченных МСК имплантировалась в капилляры инфарктной зоны ($p < 0,01$), что и объясняет улучшение сократительной функции миокарда [154].

Перспективы использования кардиомиоцитов при лечении пациентов, перенесших ИМ, обсуждается в статье Gulbins Н. и соавт. (2002). Авторы пришли к мнению, что использование клеточной терапии значительно улучшает функцию сердечной мышцы в эксперименте. При этом не возникает этических разногласий при применении аутологичных клеток и тканей. Выявлено, что стволовые клетки, полученные в частности из эмбриональных тканей или клеток костного мозга, позволяют селективно замещать клетки водителей ритма, предсердные или желудочковые кардиомиоциты [139].

Впервые в Европе имплантацию аутологичных скелетных миобластов человеку в качестве дополнения к КШ выполнил Menasché Р. в 2001 году. Во время операции 72-летнему пациенту с ФВ ЛЖ 21% были имплантированы в миокард аутологичные поперечнополосатые миобласты. В послеоперационном периоде отмечено снижение класса стенокардии по NYHA с ФК III на ФК II, а также увеличение ФВ ЛЖ до 30%. Процедура была выполнена без каких-либо осложнений [204]. Menasché Р. и соавт. продолжили своё исследование и провели операции имплантации аутологичных миобластов ещё 9 пациентам с ишемической дисфункцией ЛЖ. $8,74 \cdot 10^8$ миобластов было введено в зону рубца ЛЖ. Отмечено улучшение класса стенокардии по NYHA с $2,7 \pm 0,2$ до $1,6 \pm 0,1$ ($p < 0,02$), увеличение ФВ ЛЖ с 24 ± 1 до $34 \pm 1\%$ ($p = 0,02$). Операция не была сопряжена с развитием осложнений в раннем и позднем послеоперационном периоде [205].

Siminiak Т. и соавт. в августе 2001 года сообщили о выполнении трансплантации аутологичных миобластов при лечении пациента со сниженной функцией ЛЖ после ИМ. Процедура была выполнена 55 летнему

пациенту, перенесшему трансмуральный ИМ передней стенки ЛЖ. Эхокардиографически выявлена зона акинезии верхушки и передней стенки ЛЖ, а также апикальных сегментов передней стенки МЖП. Отсутствие зон гибернации было подтверждено при выполнении стресс-эхокардиографии с добутамином. Трансплантация $1.2 * 10^6$ аутологичных миобластов в зону рубца, которые были получены при биопсии, выполнена во время КШ. Контрольная ЭхоКГ через 4 недели после операции, выявила улучшение сократимости ЛЖ, особенно в его апикальной области [258]. Продолжив исследование, Siminiak T. выполнил подобное вмешательство одной женщине и 9 мужчинам. Аналогично было показано улучшение функции сердечной мышцы в отдалённом периоде после операции. Данные были представлены на научной сессии Американской Сердечной Ассоциации [259].

В исследовании Orlic D. и соавт. стволовые клетки костного мозга реципиента (СККМ) были введены в периинфарктную зону во время выполнения КШ 6 пациентам, перенесшим ИМ. Пациенты удовлетворительно перенесли процедуру и были выписаны. Контрольное обследование проведено через 1 и 2 года. Выявлено значимое повышение ФВ ЛЖ у всех пациентов (с 37% до 48%), при этом не выявлено признаков отторжения тканей, развития инфекционных осложнений и желудочковых аритмий [229].

В большом контролируемом исследовании Perin E.C. и соавт. были включены пациенты повышенного риска (n=21). Они были разделены на 2 группы – в первой выполнялось лечение с использованием СККМ (n=14), во второй - без использования СККМ (n=7) – группа контроля. При этом СККМ вводились трансэндокардиально в повреждённые участки миокарда, которые выявлялись при электрофизиологическом картировании. Через 4 месяца выявлено увеличение ФВ ЛЖ с 20% до 29%, а также значимое снижение конечного систолического объёма у пациентов опытной группы. Технология признана безопасной и эффективной при лечении пациентов с ИБС и высоким

хирургическим риском [236].

В последующем многочисленные исследования также подтвердили факт о перспективах улучшения функции сердечной мышцы, как при имплантации стволовых клеток, полученных СККМ [142,265,267], так и поперечнополосатых мышечных клеток [296,258].

В Массачусетсе предложили использовать клеточные технологии при лечении пациентов с ишемической кардиомиопатией, которым предстоит трансплантация сердца. Во время выполнения процедуры имплантации аппарата вспомогательного кровообращения, производили имплантацию аутологичных поперечнополосатых миобластов в сердечную мышцу. В последующем после проведения трансплантации, сердце реципиента было изучено. Выявлено, что имплантированные клетки не только выживают, но и встраиваются в сердечную мышцу, развивая клеточные связи с собственными клетками сердца [232].

Итоги лечения пациентов с СН путем использования стволовых клеток были подведены в 2015 году в мета-анализе Fisher S. A. и соавт. Проанализированы результаты 31 исследования, включавшие в себя 1521 наблюдение. Выявлено, что проводимое лечение снижает риск летального исхода и повторной госпитализации, ввиду прогрессирования СН. Использование клеточной терапии снижает ФК стенокардии, улучшает работоспособность пациентов, увеличивает ФВ ЛЖ и улучшает КЖ. Кроме того лечение ассоциировано со снижением уровня мозгового натрийуретического пептида при отсутствии увеличения количества возникновения аритмий [119].

При интракоронарном введении МСК-ЖТ по сравнению с контролем регистрировалось увеличение перфузии повреждённого участка миокарда, однако изменения в сократительной способности сердца, оценённые по ФВ ЛЖ, выявлены не были [182].

Фенотип региональных СК различается в зависимости от органной принадлежности, но одни и те же СК, мигрируя в другой орган, вероятно, могут менять фенотип и дифференцировочный потенциал под влиянием нового микроокружения. Существует также предположение, что мультипотентные СК сохраняются во многих органах после рождения и при стимуляции могут пролиферировать и дифференцироваться в соответствии микроокружения данного органа [280]. Если последняя гипотеза корректна, то функционально региональные СК близки к мультипотентным. В большинстве случаев пластичность СК проявляется в экспериментах, моделирующих патологический процесс. Так вовлечение ГСК в процесс неоваскуляризации описано на ишемической модели [88]. Миогенная дифференцировка СК костного мозга наблюдалась при имплантации СК мышам mdx (мышечная дистрофия Дюшена) [105]. Вероятно, СК, воспринимая внешние сигналы, мигрируют к очагу повреждения, где пролиферируют и дифференцируются в соответствии с локальным микроокружением.

На сегодняшний день существует несколько основных теорий, объясняющих механизм действия МСК на сердце после ишемического повреждения:

1. Выработка МСК биологически активных веществ в зоне повреждения [38,208,245].
2. Дифференцировка МСК в гладкомышечные клетки (ГМК) сосудов и эндотелиоциты [30,230,257].
3. Дифференцировка МСК в кардиомиоциты сократительного миокарда [36,228,274].
4. Стимулирующее воздействие на резидентные стволовые клетки сердца (РСКС) [33,203,146].

Способность мезенхимальных СК дифференцироваться в кардиомиоциты *in vitro* продемонстрировали Makino et al., (1999). В своём эксперименте они

выделяли стромальную фракцию костномозговых стволовых клеток, используя их способность к адгезии при культивировании, после обработки 5-азацитидином, клетки формировали структуры подобные кардиомиоцитам: с центральнопозиционированным ядром, типичной поперечной исчерченностью, наличием предсердных гранул. Клетки соединялись друг с другом при помощи вставочных дисков, экспрессировали белки, специфичные для фетальных кардиомиоцитов и генерировали потенциалы действия, характерные прежде всего для клеток синусного узла, а также для вентрикулярных миоцитов [195]. Впервые способность аутологичных взрослых стволовых клеток костномозгового происхождения участвовать в процессах репарации при повреждении миокарда была продемонстрирована Orlic D. et al., (2002). В эксперименте моделировался ИМ путем наложения лигатуры на переднюю нисходящую КА. Клетки костного мозга получали от трансгенной линии мышей, экспрессирующей зелёный флюоресцирующий белок, причём выбиралась *Lyn-/c-kit+* популяция. Эта популяция инъецировалась непосредственно в очаг инфаркта. Анализ результатов проводился через 9 суток после имплантации. Исследование сердец мышей-реципиентов показало формирование новых сосудов, уменьшение площади ИМ на 48%, при этом регенерация миокарда распространялась на все 3 слоя стенки ЛЖ. При этом регенерировавшие клетки содержали зелёный флюоресцирующий белок. Уменьшались размеры полостей сердца и функциональные показатели сердечной деятельности. Эти исследования стали предпосылкой для продолжения работ по изучению неоваскуляризации с использованием «клеточных технологий» [228].

Наряду с экспериментальными исследованиями по трансплантации эмбриональных стволовых клеток, в настоящее время осуществляются широкие научно-исследовательские программы по экспериментальному культивированию аутологичных эндотелиоцитов. Кроме того, имеется ряд

работ, посвященных экспериментальному обоснованию и даже клиническому использованию гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток.

Представляют интерес экспериментальные исследования разных специалистов при моделировании ИМ в эксперименте и дальнейшее введение миоцитов, как в перикард, так и непосредственно в миокард опытных животных. Koh G.Y. и соавт. (1993) инъецировали клетки, которые были выращены *in vitro*, в миокард сингенных мышей. Данные клетки представляли собой иммортализованную мышечную клеточную линию C₂C₁₂-миобластов, которые были получены из сателлитных клеток бедренных мышц мышей. *In vitro*, когда митоген удаляется, эти фиксированные клетки выходят из клеточного цикла и возвращаются в свою программу митогенной экспрессии генов. Впоследствии наблюдаются слияние клеток и дифференцировка в поперечнополосатые многоядерные миотубы. При оценке данных клеток, которые были имплантированы в миокард, было отмечено, что они не только выживают, но и проходят дифференцировку и имплантируются в миокард [172]. Эта же группа исследователей доказала возможность миокардиального клеточного замещения с АТ-1 кардиомиоцитами. Данные клетки при инъекции в миокард мышей формировали долговременные внутрикардиальные трансплантаты без отрицательного воздействия на сердечную функцию [173].

Методика моделирования ИМ в эксперименте с дальнейшим введением эмбриональных кардиомиоцитов в миокард и оценка ЭКГ у экспериментальных животных подробно описана в монографии Шевченко Ю.Л. и Матвеева С.А. (2005). Полученные данные свидетельствуют о возможности вызывать пролиферацию кардиомиоцитов при инъекции суспензии клеток в миокард крысы. Основной эффект имплантации обеспечивается мощной индукцией репаративных процессов в месте ишемического повреждения. При этом вводимые клетки не обладают иммунологической антигенностью. В месте введения клеток не отмечено клеточной инфильтрации и каких-либо

патологических изменений. Структура мышечной ткани сохраняется, определяется выраженная васкуляризация места имплантации [76,77,78,73,72,76,75,80].

Впервые в Европе имплантацию аутологичных скелетных миобластов человеку в качестве дополнения к КШ выполнил Menasché P. в 2001 году. Во время операции 72-летнему пациенту с ФВ ЛЖ 21% были имплантированы в миокард аутологичные поперечнополосатые миобласты. В послеоперационном периоде отмечено снижение класса стенокардии по NYHA с ФК III на ФК II, а также увеличение ФВ ЛЖ до 30%. Процедура была выполнена без каких-либо осложнений. В последующем многочисленные исследования также подтвердили факт о перспективах улучшения функции сердечной мышцы, как при имплантации стволовых клеток, полученных из костного мозга реципиента, так и поперечнополосатых мышечных клеток [204].

В дальнейшем, Menasché P. и соавт. продолжили своё исследование и провели операции имплантации аутологичных миобластов ещё 9 пациентам с ишемической дисфункцией ЛЖ. $8,74 \cdot 10^8$ миобластов было введено в зону рубца ЛЖ. Отмечено улучшение класса стенокардии по NYHA с 2.7 ± 0.2 до 1.6 ± 0.1 ($p < 0,02$), увеличение ФВ ЛЖ с 24 ± 1 до $34 \pm 1\%$ ($p = 0,02$). Операция не была сопряжена с развитием осложнений в раннем и позднем послеоперационном периоде [205].

Наряду с этим сложным и многогранным лечебным эффектом заместительной клеточной терапии возможно использование отдельных ростовых факторов с целью стимуляции ангиогенеза. Существует все больше доказательств в пользу гипотезы о том, что секретируемые МСК паракринные факторы, а именно, цитокины и факторы роста (ФР), играют важную роль в процессах репарации миокарда после ишемического повреждения [62,134].

МСК способны секретировать огромное разнообразие цитокинов и ФР [55]. Среди этих молекул наиболее важными являются: VEGF [40], FGF, IGF-1,

TGF β [18] и интерлейкин (ИЛ) - 6, HGF, ангиопоэтин - 1 (Ang-1), SDF и тромбоцитарный фактор роста (PDGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) [147].

Опосредованные МСК паракринные эффекты на миокард многообразны и их можно подразделить на несколько основных групп [208,288]:

1. Антиапоптотический эффект.
2. Противовоспалительный эффект.
3. Воздействие на внеклеточный матрикс миокарда.
4. Воздействие на метаболизм миокарда.

Неоваскуляризация, опосредованная МСК и включающая в себя ангиогенез и артериогенез, имеет значительную роль в восстановлении повреждённого миокарда. Несмотря на доказательства того, что МСК-КМ способны встраиваться в сосудистые структуры, некоторые исследования показывают, что лишь небольшое количество сосудов миокарда содержат клетки донора. Тем не менее, МСК-КМ приводят к значительному увеличению плотности капилляров и развитию коллатерального кровотока при их трансплантации в ишемизированную зону. Соответственно, предполагается, что возникающее проангиогенное и проартериогенное действие может быть опосредовано секрецией стволовыми клетками соответствующих цитокинов и ФР [170]. Исследования последних лет показали, что в условиях гипоксии МСК активно синтезируют проангиогенные и проартериогенные цитокины, такие как оксид азота, VEGF, FGF, IGF-1 [215,294]. Эти секретируемые молекулы способны стимулировать дифференцировку клеток-предшественников эндотелиоцитов в зрелые эндотелиоциты и ГМК [134].

Y.L. Tang и соавт. (2005) продемонстрировали увеличение выраженности неоваскуляризации в модели ИМ на крысах после трансплантации

аутологичных МСК. При этом отмечалось увеличение уровня проангиогенных факторов (FGF, VEGF, SDF-1) в миокарде животных подопытной группы. Усиление неоваскуляризации и, как следствие, улучшение перфузии ишемизированного миокарда было продемонстрировано в работе А.А. Матюкова и соавт. (2006) при аутооттрансплантации МСК. Интрамиокардиальное введение среды, в которой производилось культивирование МСК, животным с ишемическим повреждением сердца приводило к улучшению функциональных возможностей сердца, увеличению плотности капилляров и уменьшению размеров зоны ИМ [160].

Неоваскуляризация, индуцированная паракринными факторами МСК, является комплексным процессом, опосредованным различными сигнальными путями. Так, например, молекулярные эффекты, опосредованные SDF-1, которые активируют эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS) [271], и эффекты HGF, опосредованные через сигнальный путь кальциневрина [140], показали свою роль в неоваскуляризации миокарда после ишемии.

МСК способны реализовывать положительные эффекты на миокард, сохранивший жизнеспособность после ИМ, за счёт регуляции уровня синтеза большого числа противовоспалительных и провоспалительных факторов. Становится все больше доказательств способности, трансплантированных МСК уменьшать экспрессию таких провоспалительных цитокинов, как фактор некроза опухолей - альфа (ФНО- α), ИЛ-1 β и ИЛ-6. С другой стороны, МСК стимулируют секрецию противовоспалительных субстанций: TGF- β , простагландина E₂, ИЛ-4, ИЛ-10, HGF, индоламин-2,3-диоксигеназы, монооксида азота, гемоксигеназы 1 (HO-1), растворимого фактора человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) - G5 [56,22,54,288].

В экспериментах *in vitro* паракринное действие МСК на иммунные клетки было продемонстрировано при сокультивировании МСК и Т-лимфоцитов.

Воздействие на внеклеточный матрикс миокарда.

Большинство экспериментов показали, что трансплантация МСК может влиять на ремоделирование внеклеточного матрикса посредством модуляции активности матриксных металлопротеиназ и продукции эндогенного ингибитора ММР (TIMP), а также усиления экспрессии антифибротических факторов, способствующих ослаблению ремоделирования сердца после ИМ.

МСК способны напрямую воздействовать на фибробласты сердца, что было показано *in vitro* при добавлении культуральной среды МСК к культуре фибробластов сердца. При этом отмечалось увеличение экспрессии антипролиферативных генов: эластина и миокардина, а также снижение экспрессии генов коллагена I и III типов [225].

В многочисленных экспериментальных работах, посвящённых изучению кардиопротективного действия МСК на миокард после ишемического повреждения, было продемонстрировано значимое усиление ангиогенеза после проведения клеточной терапии [36,86,28,74]. Однако механизм этого феномена остаётся не до конца понятным и, кроме стимуляции ангиогенеза проангиогенными факторами, секретируемыми МСК, предполагается возможность направленной дифференцировки МСК в эндотелиоциты и ГМК с последующим встраиванием этих клеток во вновь образующиеся сосуды. Например, в исследовании J. Oswald и соавт. (2004) была продемонстрирована способность взрослых МСК человека дифференцироваться *in vitro* в клетки, фенотипически и функционально сходные с эндотелиоцитами [230]. В исследованиях *in vivo* получен ряд доказательств, что при трансплантации МСК в зону ИМ увеличивается экспрессия CD31, фактора Виллебранда и гладкомышечного α -актина по сравнению с группой контрольного ИМ, что сопровождается увеличением плотности капилляров и приводит к увеличению функциональных показателей сердца [161,257].

W. Dai и соавт. (2005) в своём исследовании продемонстрировали

способность аллогенных МСК сохранять жизнеспособность в миокарде после ИМ в течение 6 месяцев и экспрессировать маркёры, характерные для гладкомышечного и эндотелиального фенотипа. Авторы также отмечали увеличение глобальной сократительной функции ЛЖ, однако этот эффект имел транзиторный характер и его появление связывали с ранним паракринным действием МСК [107].

Несмотря на эти доказательства, некоторые исследователи считают, что МСК не дифференцируются в эндотелиальные клетки и ГМК, а превращаются в перициты, которые стабилизируют структуру формирующихся новых сосудов [190]. Учитывая все вышеприведённые данные, необходимо отметить, что в большинстве исследований на животных лишь ограниченное количество трансплантированных МСК проявляли фенотипические признаки эндотелиоцитов и ГМК, что ставит под сомнение ведущую роль прямой трансформации МСК в клетки сосудов в их проангиогенном действии.

Способность к направленной дифференцировке МСК в клетки, фенотипически сходные с кардиомиоцитами, была показана в экспериментах *in vitro* с использованием 5-азациитидина в качестве химического стимула кардиомиогенной дифференцировки [35]. В работе S. Makino и соавт. (1999) сообщалось об изменении морфологии почти 30 % клеток с фибробластоподобной на палочкообразную форму, характерную для кардиомиоцитов, а также о появлении на поверхности этих клеток маркеров, свойственных фетальным кардиомиоцитам, а именно: фактора, стимулирующего миоциты (MEF) 2A и MEF 2D [195]. С помощью электронной микроскопии в полученных клетках были выявлены саркомеры – структуры, являющиеся неотъемлемым элементом кардиомиоцитов. Важной находкой явилось обнаружение на поверхности клеток функционально компетентных М - холинорецепторов, а также α - и β -адренорецепторов [141].

Несмотря на вполне обнадеживающие данные, полученные *in vitro*,

вопрос о способности МСК к направленной дифференцировке в кардиомиоциты в условиях ишемизированного миокарда *in vivo* до сих пор остаётся открытым [238,222]. В ряде работ была показана способность й части трансплантированных МСК экспрессировать тропонин Т и некоторые другие маркёры, характерные для кардиомиоцитов [36,272], что, впрочем, нельзя рассматривать как убедительные данные, свидетельствующие в пользу эффективной трансформации стволовых клеток в зрелые, функционально полноценные кардиомиоциты.

Высказывается предположение о способности к репрограммированию полностью дифференцированных взрослых кардиомиоцитов в состояние клеток- предшественников. Данный процесс, именуемый дедифференцировкой, может быть опосредован МСК [100]. Недавно А. Acquistapace и соавт. (2011) было показано, что совместное культивирование МСК человека разного происхождения со зрелыми кардиомиоцитами мыши приводит к репрограммированию кардиомиоцитов в состояние, подобное клеткам - предшественникам кардиомиоцитов. Было выявлено увеличение экспрессии маркеров, характерных для предшественников кардиомиоцитов (GATA-4, Nkx-2,5 и Mef-2C), а также маркера пролиферации Ki-67. Одновременно отмечалось снижение уровня экспрессии маркеров зрелых кардиомиоцитов - десмина, α -актина и тропонина I, что согласуется с возникновением процесса дедифференцировки кардиомиоцитов [83].

Миграция мезенхимных стволовых клеток в зону ишемического повреждения.

В течение первых 7 суток после ИМ наблюдается острый воспалительный процесс [2,63,124], что сопровождается образованием в повреждённой ткани разнообразных медиаторов воспаления, цитокинов и ФР. Важнейшим компонентом воспаления является активация и миграция в

повреждённый миокард различных типов лейкоцитов, что способствует процессу заживления. [34,87]. Основными факторами, влияющими на миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, являются ИЛ-8, ИЛ-10, MCP-1, макрофагальный белок воспаления (MIP)-1 α и MIP-1 β , HGF и SDF-1 [221,216]. Некоторые из активированных биологических факторов, такие как SDF-1 и HGF, также вовлечены в стимуляцию миграции МСК [220]. В свою очередь, МСК экспрессируют рецептор 4 типа к С-Х-С хемокину (CXCR4) и с-Met, которые являются рецепторами для SDF-1 и HGF, соответственно. В эксперименте обработка МСК провоспалительными цитокинами увеличивала адгезию и способность этих клеток к миграции [169], указывая на способность МСК давать адаптивный ответ на воспалительные сигналы.

В начале процесса миграции в зону ИМ МСК сталкиваются с необходимостью преодоления эндотелиального барьера. В связи с этим на поверхности МСК был обнаружен ряд поверхностных молекул адгезии: молекула адгезии сосудистого эндотелия - 1 (VCAM-1), β -1 интегрин, очень поздний антиген - 4 (VLA-4), молекула межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), ICAM-3, CD44 [194]. Более того, МСК секретируют матриксные металлопротеиназы, такие как MMP-2, которые также облегчают проникновение в инфарктную зону [266]. На основе анализа проведённых исследований можно сделать вывод, что секреция VCAM-1, VLA-4, β 1 интегрина и MMP-2 играет ключевую роль в адгезии и эмиграции МСК [251,266].

Использование жировой ткани при лечении пациентов с ИБС.

В исследованиях последних лет пристальное внимание уделяется проблеме использования жировой ткани при лечении пациентов с ИБС. Стоит отметить, что интактная жировая ткань — это богатая кровеносными сосудами, самообновляющаяся структура, состоящая из адипоцитов (зрелых клеток жировой ткани), стромально-васкулярной клеточной фракции (СВКФ) и

поддерживающей волокнистой стромы. СВКФ является уникальным клеточным комплексом, содержащим стволовые клетки жировой ткани — СКЖТ (которые являются ключевым компонентом СВКФ), эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, перициты, фибробласты, клетки крови, включая В- и Т-лимфоциты. Следует отметить, что жировая ткань взрослого человека наиболее богата стволовыми клетками по сравнению с другими их источниками (в частности, в 1 см³ этой ткани содержится в 100-1000 раз больше стволовых клеток, чем в 1 см³ костного мозга).

Обновление адипоцитов происходит за счёт МСК-ЖТ — мультипотентных мезенхимных стромальных клеток, которые митотически активны и способны дифференцироваться в адипо- и ангиогенном направлениях, за счёт чего и поддерживается адипо- и ангиогенез. Локализуются предшественники адипоцитов преимущественно периваскулярно. МСК-ЖТ оказывают существенное влияние на репаративные процессы в зоне ишемии и повреждения тканей, а именно:

- осуществляют неоангиогенез — за счёт дифференцировки МСК-ЖТ в эндотелиальные клетки, активации эндотелиальных прогениторных клеток и продукции проангиогенных факторов;
- обладают значительной секреторной активностью: МСК-ЖТ продуцируют широкий спектр проангиогенных факторов и факторов роста - цитокинов, таких как FGF, HGF, VEGF, TGFβ, GM-CSF, SDF-1, IL-6,-8,-17, NGF, TIMP-1 и TIMP -2, ангиогенин, ангиопоэтин-1, плацентарный фактор роста, благодаря которым наблюдается выраженная активация процессов васкуляризации в области их присутствия;
- осуществляют регенерацию адипоцитов за счёт своей антиапоптотической активности и дифференцировки в адипоциты;
- экспрессируют mRNA антиапоптотического фактора ICF, который

известен также и как митоген, стимулирующий адипогенез;

- влияют на модуляцию местных воспалительных реакций.

Эти возможности жировой ткани являются обоснованием использования данных клеток для стимуляции ангиогенеза.

При этом наряду с развитием применения клеточных технологий при лечении пациентов с ИБС, велись обширные исследования по влиянию эндогенных факторов роста на процессы неоангиогенеза и обеспечению коллатерального кровообращения в ишемизированных тканях сердца.

На сегодняшний день существует несколько основных путей введения клеточных продуктов, в том числе МСК, с целью терапии ишемического повреждения сердца:

1. Интрамиокардиальное (в зону инфаркта или в периинфарктную зону) [186];
2. Интракоронарное [82,211];
3. В полость ЛЖ [91,284];
4. Внутривенное введение [82,131].

Интрамиокардиальное введение имеет ряд существенных преимуществ, таких как высокая эффективность, локальное действие, небольшое количество используемых клеток и относительно низкий процент осложнений [127]. Более того, на сегодняшний день возможности применения интрамиокардиального введения стволовых клеток в доклинических исследованиях на крупных животных и в клинической практике расширяются благодаря появлению относительно малоинвазивных методик, например, установки для электромеханического картирования и трансэндокардиального прецизионного введения клеток [102]. С другой стороны, интракоронарный и внутривенный пути введения все ещё являются более доступными и простыми методиками.

Важные данные были получены при сравнении внутривенного и интракоронарного введения МСК в клиническом исследовании [82] при

лечении рефрактерной стенокардии. Данные проведённой работы показали отсутствие значимых различий двух исследуемых путей введения по улучшению КЖ пациентов, повышению толерантности к физической нагрузке, повышению ФВ ЛЖ.

Монослой, содержащие мезенхимные стволовые клетки.

Первым исследованием в области использования монослоя, содержащего МСК для восстановления сердца после ИМ, стала работа Y. Miyahara и соавт. (2006). Посев МСК-ЖТ на термочувствительную подложку с последующим транзиторным охлаждением до 20 °С приводили к спонтанному отслоению клеточного пласта от подложки [209]. Аппликация клеточного пласта на эпикард через 4 недели после перевязки левой КА у крыс приводила к уменьшению размера рубца, улучшению функции ЛЖ и увеличению выживаемости животных. Кардиопротективные эффекты фрагментов МСК слоя, выращенного на гидрогеле из метилцеллюлозы, после интрамиокардиальной трансплантации были выше по сравнению с традиционным введением одиночных нативных МСК в опытах на крысах [283] и свиньях [155] в модели ИМ. Применение монослоя МСК через 4 недели после ИМ у крыс приводило также к увеличению содержания протективных цитокинов: IGF-1, SDF-1, фактор, индуцируемый гипоксией-1 альфа (HIF-1 α) и VCAM-1 в зоне аппликации.

Гидрогелевые каркасы.

В последние 10 лет накоплена значительная информация об использовании каркасов из полимеров природного и синтетического происхождения для улучшения кардиопротективных свойств МСК. В 2008 г. H.J. Wei и соавт. (2008) показали, что локальное применение накладок, содержащих многослойно организованные МСК, приводило к улучшению функции ЛЖ и увеличению экспрессии ангиогенных факторов в сердце крысы

после ИМ [287]. Пришивание коллагенового каркаса, содержащего МСК, к эпикарду после ИМ, приводило к улучшению перфузии, уменьшению размера рубца, улучшению сократимости и снижению выраженности ремоделирования [202]. Имплантация каркасов на основе гиалуроновой кислоты, заселённых МСК в гетеротопически трансплантированное сердце после ИМ, приводила к увеличению васкуляризации и уменьшению фиброза трансплантата [120].

Множество различных типов синтетических каркасов, заселённых МСК, обеспечивали улучшение кардиопротективных свойств МСК по сравнению со свободными стволовыми клетками. Наиболее популярными материалами для создания каркасов являются: поли(лактид-ко-эпсилон-капролактон) [162], силанизированный гидрогель гидроксипропил метилцеллюлозы [198], полисахариды [181], пористый полиэтиленимин, смешанный с поли(D,L-лактат-ко-гликолевая кислотой) [183], поли-(этиленгликоль)-бетта-поликапролактон-(додекандиовая кислота)- поликапролактон-поли(этиленгликоль) и альфа-циклодекстрин-гидрогель [103]. Примерами композитных матриц для иммобилизации МСК являются: коллаген I типа – глюкозаминогликан [292], альгинат / хитозан [101], поли-(ε-капролактон) / желатин [164].

Когда эти многоклеточные структуры подшивали к эпикарду после перевязки КА, они вызвали повышенную миграцию МСК в область ИМ, улучшение функции ЛЖ, а также уменьшение размеров рубца по сравнению с результатами для нативных МСК.

1.4. Факторы роста как индукторы неоангиогенеза.

Развитие процессов пролиферации и репарации невозможно без наличия необходимых факторов роста, которые вырабатываются в организме человека при необходимости или могут быть введены из вне для стимуляции данных процессов [24,25,26,27,69].

Несмотря на способность миокарда стимулировать неоваскуляризацию в ответ на прогрессирующее уменьшение артериального кровотока, в подавляющем большинстве случаев этот ответ довольно ограничен и недостаточно компенсирует снижение кровоснабжения. В ситуациях, когда естественный неоваскуляризационный ответ достаточен, чтобы предотвратить некроз миокарда, но недостаточен для сохранения нормальной сократимости сердечной мышцы даже в покое, формируется гибернированный миокард, что проявляется локальным снижением сократимости с целью уменьшения расходования кислорода и восстановления баланса между его доставкой и потреблением [168]. Гибернированный миокард жизнеспособен, но через какое-то время может привести к апоптозу кардиомиоцитов, ремоделированию миокарда и структурным изменениям, включающим потерю контрактильного субстрата кардиомиоцитов, а также увеличение количества интерстициальной соединительной ткани, ведущее к необратимому миокардиальному фиброзу.

В 1787 британский хирург D. Hunter впервые описал ангиогенез [246]. Это комплексный процесс, включающий четыре стадии: протеолитическое разрушение базальной мембраны сосудов и межклеточного матрикса, миграция и прикрепление эндотелиальных клеток, их пролиферация и, наконец, формирование тубулярных структур [49].

Начальный этап – включение ангиогенеза. Недостаточное кровоснабжение ведёт к гипоксии вследствие уменьшения диффузии кислорода. Гипоксия - главный стимул ангиогенеза. Происходит активация метаболических путей, регулируемых такими белками, как индуцируемый гипоксией фактор 1, что ведёт к увеличению экспрессии проангиогенных факторов, включая VEGF и факторы роста фибробластов. В тот момент, когда действие проангиогенных факторов превышает действие антиангиогенных, эндотелиальные клетки переходят из обычного дремлющего состояния в активное. Этот момент называется "включением ангиогенеза". После

происходит разрыв базальных мембран и внеклеточного матрикса, главным образом, в результате повышения активности матриксных металлопротеиназ. Эти изменения матрикса способствуют миграции эндотелиальных клеток во внесосудистое пространство, где они начинают размножаться. Затем клетки организуются в трубочки с просветом, образуя новую капиллярную сеть. По ходу этого процесса привлекаются перициты, которые прикрепляются к новым сосудам и стабилизируют их. До этой точки созревания целостность и выживание эндотелиальных клеток зависят от VEGF [273].

Ангиогенез – процесс регулируемый, и в организме человека регуляция осуществляется группой ангиогенных и антиангиогенных факторов, обеспечивающих формирование новых сосудов. Логическим завершением процесса ангиогенеза можно считать артериогенез. В противоположность ангиогенезу, артериогенез является процессом развития *de novo* коллатеральных кондуитов с формированием сосудов, способных значительно увеличивать кровоток [149,214].

Таким образом, ангиогенез индуцируется тогда, когда метаболические потребности превышают перфузионную способность существующих сосудов. По-видимому, механизм этого адаптивного ответа в том, что относительный недостаток кислорода приводит к повышению ангиогенных стимулов. Паракринный механизм влияния заключается в действии на рост сосудов в тканях с низким уровнем перфузии. Существует ряд клеток, способных повышать уровень VEGF *in vitro* во время гипоксии, к которым относятся фибробласты, миоциты гладкой и поперечнополосатой мускулатуры, пигментный эпителий сетчатки, астроциты и эндотелиальные клетки, а также некоторые опухолевые клетки [14,15,16,13].

Таким образом, ангиогенез индуцируется тогда, когда метаболические потребности превышают перфузионную способность существующих сосудов.

Молекулярные механизмы, регулирующие НВ, контролируются

многочисленными про- и антиангиогенными растворимыми полипептидами, такими как сосудистый эндотелиальный фактор роста - vascular endothelial growth factor (VEGF), ангиопоэтины, фактор роста фибробластов - fibroblast growth factor (FGF), тромбоцитарный фактор роста, трансформирующий фактор роста-Р (TGFP), фактор некроза опухоли-а (TNF- а), колониестимулирующие факторы, такие как G-CSF и GM-CSF, СХС хемокины и др., активирующие или подавляющие процессы НВ [98]. К тому же, некоторые мембрансвязанные белки играют огромную роль в НВ (интегрины, кадгеринины, синдеканы, эфрины). Механические стимулы также могут обладать про- и антиангиогенными эффектами [184,298].

Рассмотрим отдельно полипептиды, влияющие на процессы неоангиогенеза.

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF).

VEGF первоначально был открыт как неопознанный опухолевый фактор, повышающий сосудистую проницаемость. Однако впоследствии был определён как белок, усиливающий пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов.

Учитывая, что VEGF - это стресс индуцированный белок, его регуляция сравнивается с другими кислород - и глюкозорегулируемыми белками, поэтому физиологический и ростовой ангиогенез можно рассматривать как адаптационный ответ на дефицит кислорода. Для того чтобы кислород и питательные вещества поступали в достаточном количестве, каждая клетка макроорганизма должна быть близко расположена к капилляру. В 1989 г. несколько независимых групп учёных получили данные в пользу индукции VEGF гипоксией и гипогликемией. По данным ряда авторов VEGF функционирует в динамическом сочетании с цитокинами, их растворимыми рецепторами и антагонистами, протеолитическими ферментами, регулирующими их освобождение из внеклеточного матрикса [49].

Фактор роста эндотелия сосудов (или фактор проницаемости сосудов) является основным регулятором ангиогенеза. Его важнейшая роль подтверждается тем, что мыши, имеющие всего один аллель нормального VEGF-A, погибают внутриутробно. В большинстве опухолей человека концентрация VEGF повышается, что сопровождается усилением инвазивности, склонностью к рецидивам и худшим прогнозом [273].

VEGF экспрессируется эндотелиальными клетками, макрофагами, тромбоцитами, обладает выраженной митогенной активностью по отношению к эндотелиоцитам, но лишён данного свойства для других видов клеток. Экспрессия VEGF регулируется гипоксией. Сосудистый фактор индуцирует реакции, позволяющие эндотелиальным клеткам пролиферировать, мигрировать, собираться в трубки и формировать связанную сеть, выживать и усиливать свою проницаемость.

По-видимому, механизм этого адаптивного ответа в том, что относительный недостаток кислорода приводит к повышению ангиогенных стимулов. Паракринный механизм влияния заключается в действии на рост сосудов в тканях с низким уровнем перфузии. Существует ряд клеток, способных повышать уровень VEGF *in vitro* во время гипоксии, к которым относятся фибробласты, миоциты гладкой и поперечнополосатой мускулатуры, пигментный эпителий сетчатки, астроциты и эндотелиальные клетки, а также некоторые опухолевые клетки.

VEGF индуцируется гипоксией в большинстве, если не во всех клетках *in vitro*. Эксперименты, проведённые в клеточных монослоях, показали, что VEGF может быть независимо индуцирован гипоксией или гипогликемией. Интересен факт, что не происходит индукции VEGF в культивируемых клетках глиомы, лишённых и кислорода, и глюкозы. Повышение экспрессии VEGF требует синтеза белка, который не может идти при двойном стрессе. Способность реагировать на гипоксию и гипогликемию даёт преимущество в ситуации,

когда существует дефицит только одного из метаболитов. Неясно, однако, проходят ли эти два ответа через два разных пути, или они вырабатывают общий медиатор, действующий как проксимальный индуктор VEGF. Исследования разных метаболитов, накапливаемых во время гипоксии и гипогликемии по отношению к их способности непосредственно индуцировать VEGF, не дали убедительных результатов. Показано, что VEGF индуцируется аденозином, а также ионами кобальта. Это свидетельствует о том, что белок гема может быть вовлечён в этот процесс.

Снижение уровня VEGF обуславливает апоптоз эндотелия, ведущий к обструкции просвета и регрессии сосудов. VEGF стимулирует миграцию эндотелиальных клеток путем усиления подвижности и увеличения экспрессии матричных металлопротеиназ и плазминогенных активаторов. Сосудистый фактор роста обеспечивает выход из сосудов плазменных белков (фибронектин, фибриноген, факторы коагуляции) и активирует экспрессию тканевого фактора (клеточный инициатор коагуляции крови), что ведёт к формированию зацепок для мигрирующих эндотелиальных, гладкомышечных и воспалительных клеток. Кроме того, VEGF может влиять на ангиогенез путем рекрутирования лейкоцитов (продуцирующих ангиогенные факторы) посредством стимуляции экспрессии адгезирующих рецепторов лейкоцитов. VEGF играет существенную роль в формировании просвета капилляров. VEGF121 и VEGF165 увеличивают, тогда как VEGF189 снижает диаметр просвета. Разные физиологические функции VEGF зависят от определённых уровней VEGF [116,125,159]

Предполагается, что экстравазальный фибриноген и другие белки плазмы приводят к образованию фибринового геля, выполняющего роль субстрата эндотелиального и других ростовых факторов. VEGF осуществляет свои эффекты через рецепторы эндотелиальных клеток, каждый из которых обладает тирозинкиназной активностью: VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, соответствующие различным изоформам пептида.

Фактор роста фибробластов (FGF).

Кроме VEGF в процессе ангиогенеза принимают участие другие факторы роста, одним из них является фактор fibroblast growth factor (FGF – фактор роста фибробластов). Идентифицировано более 20 структурно родственных членов семейства FGF. Они осуществляют свою ангиогенную активность путем взаимодействия с различными поверхностными рецепторами эндотелиальных клеток. Фактор роста фибробластов (в отличие от VEGF) специфичен не только для эндотелиальных клеток, его рецепторы обнаружены на многих других клетках, включая фибробласты и гладкомышечные клетки сосудов. FGF (также, как и VEGF) стимулирует многие функции эндотелиоцитов, такие как пролиферация, миграция, внеклеточная протеолитическая активность и трубчкообразование. Выделяют два типа рецепторов для FGF: рецепторы высокой (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4) и низкой аффинности, находящиеся на плазматической мембране.

В наибольшей степени исследованы два представителя этого - aFGF (кислый или FGF-1) и bFGF (щелочной или FGF-2) [109,153]. Факторы роста фибробластов связываются со своими высоко аффинными рецепторами на поверхности эндотелиальных и гладкомышечных клеток [166]. Наряду с митогенным действием, представители семейства FGF стимулируют продукцию эндотелием различных протеаз, в том числе активаторов плазминогена и коллагеназы, способных к ферментативному расщеплению внеклеточного матрикса. bFGF также способен улучшать микроциркуляцию в ишемизированных зонах [233]. Как и VEGF, bFGF стимулирует вазодилатацию, и его системное введение способно приводить к значительной гипотензивной реакции [279]. Сосуды в ишемизированной ткани особенно чувствительны к сосудорасширяющему действию факторов роста. После восстановления кровотока нормализуется как чувствительность микрососудов к вазодилатирующему действию ростовых факторов, так и экспрессия

рецепторов факторов роста. Ишемия приводит к усилению экспрессии FGF и его рецепторов [95], параллельно со стимуляцией роста эндотелиальных клеток. У больных с хронической ишемией уровень bFGF в сыворотке крови значительно ниже, чем у больных с острой ишемией [263], однако подобные различия достоверно не отражаются на прогнозе больных. Эти данные свидетельствуют о том, что хотя bFGF в эксперименте увеличивал коллатеральную циркуляцию, улучшал функцию и перфузию ткани, изменения в уровне эндогенного bFGF у больных с острой ишемией не оказывали протективного действия [165,270].

Трансформирующий фактор роста (TGF α).

TGF α был впервые выделен более 20 лет назад из культуры клеток саркомы по его способности стимулировать способность эпидермального фактора роста вызывать трансформацию и пролиферацию не-неопластических (non-neoplastic) фибробластов [196,247]. В настоящее время известно более 30 структурно сходных представителей семейства TGF α , включая TGF α 1. Эти цитокины были разделены на подгруппы согласно сходству последовательности и специфической направленности сигнальных систем, в семействах TGF α i [255]. TGF α связан с широким спектром биологических процессов, включая клеточную пролиферацию, рост, дифференцировку и апоптоз. TGF α играет роль в патофизиологии различных заболеваний сердечно-сосудистой системы. В ответ на гемодинамическую перегрузку [248] и ишемию миокарда [158] кардиомиоциты синтезируют и секретируют TGF α 1. Действие TGF α опосредовано взаимодействием рецепторов I и II типов, стимулированным лигандами [148].

Фактор роста гепатоцитов (HGF).

Фактор роста гепатоцитов (HGF) исходно считался специфическим для гепатоцитов фактором роста. Однако сейчас известно, что он является фактором роста с большим количеством функций и его рецептор c-met

присутствует не только на эпителиальных клетках, но и на кардиомиоцитах, эндотелиальных и гематопоетических клетках [210]. Основными функциями HGF является стимуляция митогенеза, усиление клеточной подвижности, морфогенез и обеспечение выживания клеток [226]. Соответственно, HGF потенциально может модифицировать некоторые ключевые процессы ангиогенеза, что объясняет благоприятный эффект повышения уровня HGF у пациентов с острым коронарным синдромом [243].

HGF является мощным ангиогенным фактором, что может иметь большое значение в условиях ишемии миокарда [268]. В нескольких экспериментальных работах HGF обладал протективным эффектом при ишемии/реперфузии миокарда. Оно К. с соавт. показали повышение экспрессии HGF и его рецептора на экспериментальной модели инфаркта миокарда [227]. Это указывает на то, что активация системы HGF может быть частью защитной программы в условиях острой ишемии миокарда. Важно, что экспрессия HGF быстро возрастает при многих патологических процессах, тогда как повышение экспрессии рецептора HGF специфично для ишемии миокарда. Кроме того, Nakamura с соавт. [201,277] обнаружили, что введение HGF крысам на модели ишемии/реперфузии приводит к значительному подавлению апоптоза в миокарде, ограничению инфарктной зоны и улучшению сердечной функции, тогда как введение антител, нейтрализующих HGF, увеличивало зону инфаркта и смертность от сердечной недостаточности. Другие исследования выявили, что HGF обладает кардиопротективным действием у пациентов с нестабильной стенокардией. Основной мишенью HGF являются сосудистые эндотелиальные клетки. В эксперименте было показано, что HGF восстанавливает вызванную ишемией эндотелиальную дисфункцию, поддерживает эндотелий-зависимую регуляцию коронарного кровотока [293]. HGF также стимулирует пролиферацию гематопоетических клеток-предшественников. Недавние исследования продемонстрировали, что гематопоетические клетки-

предшественники способствуют регенерации эндотелия после деэндотелизации [218]. Таким образом, кроме ангиогенных эффектов, HGF способен вызывать регенерацию эндотелия, обеспечивая улучшение выживания клеток и подавляя апоптоз. Учитывая вышеизложенное, повышенный уровень HGF в сыворотке может соответствовать лучшему клиническому прогнозу у больных ИБС, благодаря комбинации его кардио- и васкулопротективного эффектов. Вероятно, мероприятия, увеличивающие уровень HGF в крови больных, могут быть благоприятными для пациентов с прогностической точки зрения [129,261].

Урокиназа.

Результаты исследований Парфёновой Е. В. и Ткачука В. А. позволяют высказать гипотезу о том, что одним из новых потенциально терапевтических генов для генной терапии, направленной на предотвращение рестеноза и стимуляцию ангиогенеза, может быть ген урокиназы [47].

Для многих про-ангиогенных факторов роста, секретируемых клетками в латентной или мембранно-связанной форме, необходим их перевод в активное состояние под действием ряда протеолитических ферментов, осуществляющих процессинг латентных форм или расщепление компонентов межклеточного матрикса, ограничивающих биологическую активность связанных с ними факторов роста. Основной каскад системы, обеспечивающий внеклеточный протеолитический процессинг, включает активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа), плазмин, а также металлопротеиназы. Урокиназа, превращающая плазминоген в плазмин, протеазу широкой субстратной специфичности, секретируется клетками крови и сосудов и является одним из компонентов системы фибринолиза, препятствующей образованию тромбов. Но наиболее важная функция урокиназы - обеспечение подвижности (миграции) клеток, а, следовательно, регуляция таких процессов, как рост сосудов, ранозаживление, инвазия клеток и метастазирование [262].

Урокиназа, непосредственно или через образование плазмينا, осуществляет высвобождение связанных в матриксе и активацию латентных факторов роста, таких как bFGF, VEGF, HGF, инсулиновый фактор роста (IGF), эпидермальный фактор роста (EGF) и TGF β [241].

Роль урокиназы в ангиогенезе впервые была отмечена на моделях васкуляризации роговицы, а также при опухолевом ангиогенезе [297]. Помимо локализации протеолиза на клеточной поверхности связывание урокиназы с ее рецептором опосредует миграцию эндотелиальных клеток и формирование капилляроподобных трубочек через механизм, независимый от её протеолитической активности, связанный с активацией внутриклеточных сигнальных систем. Для образования капилляроподобных трубочек в фибриновом матриксе под действием ангиогенных факторов роста также необходимо присутствие урокиназы и ее связывание с рецептором [176].

Многими группами было показано, что экспрессия про-ангиогенных факторов роста (VEGF, bFGF, TGF β 3) в значительной степени находится под контролем гипоксии, в условиях которой происходит усиление их синтеза. При гипоксии также наблюдалась повышенная экспрессия рецептора урокиназы [97].

Роль витаминов в неоангиогенезе.

Витамины играют большую роль во многих биохимических реакциях организма, влияя на различные клеточные функции. Выявлено влияние различных витаминов на процессы неоангиогенеза, однако множество работ продемонстрировали отрицательное влияние витаминов на процессы ангиогенеза [175,199,200,297,106,122,68].

Применение факторов ангиогенеза в клинической практике.

Как известно, первые химически не идентифицированные факторы были выделены из злокачественных опухолей в середине XX века. Folkman J. выдвинул гипотезу о том, что прогрессирующее развитие злокачественных

опухолей зависит от их васкуляризации [121]. Позднее Svet-Moldavsky G.J. и Chimishkyan K. L. (1977) высказали идею о возможности применения выделенных из опухолей факторов ангиогенеза для лечения ИБС [269]. Позднее эта методика получила общеупотребимое название «терапевтический ангиогенез».

Многочисленные исследования описывают клиническое применение факторов роста для стимуляции ангиогенеза. Так, В. Shumacher с соавт. выполняли миокардиальные инъекции FGF пациентам во время проведения коронарного шунтирования. В зоне введения ангиогенных факторов роста почти в 3 раза увеличилась перфузия миокарда за счет развития микрососудистого русла [256].

F.W. Sellke с соавт. проводили введение bFGF в эпикардальную жировую ткань пациентам с миокардиальной ишемией при выполнении коронарного шунтирования. В течение 3 месяцев после проведённых операций не было получено никаких данных о токсических влияниях bFGF на печень, почки, кровь. Авторы отмечают выраженное увеличение перфузии в зоне ишемии [253]. Также опытным путем доказано, что естественная смесь факторов роста, введённая в зону ишемии, значительно более активно стимулирует ангиогенез, чем введение отдельных факторов FGF или VEGF.

Первые результаты клинического применения терапевтического ангиогенеза с использованием гена человека VEGF165 представили Л.А. Бокерия с соавт. [5]. Авторы отмечают безопасность и эффективность применения данной методики, как альтернативного способа реваскуляризации тканей при ишемии в случаях, когда применение стандартных методов реваскуляризации является невозможным.

В дальнейшем данные о применении нативных плазмид с генами VEGF для лечения пациентов с ХИИК представил А.В. Гавриленко. В контролируемом исследовании было доказано, что генно-инженерные

стимуляторы ангиогенеза могут быть эффективно использованы в комплексном лечении пациентов с ХИНК, демонстрируя при этом приемлемую переносимость и безопасность. Показано, что технологии терапевтического применения факторов роста могут быть использованы как в качестве самостоятельного метода лечения, так и в сочетании с реконструктивными сосудистыми операциями для улучшения отдалённых результатов последних [13,10].

В международном исследовании VIVA тестировали внутрикоронарное введение рекомбинантных факторов роста (VEGF у 178 больных ИБС, не являющихся оптимальными кандидатами для хирургической или эндоваскулярной реваскуляризации). Через 120 суток после интракоронарного введения белка сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF-1) в группе, получавшей большие дозы, отмечалось уменьшение выраженности стенокардии, однако, не подтверждённое объективными данными при сравнении радиоизотопной перфузии миокарда и коронароангиографии [150].

В исследовании FIRST - FGF в различных формах вводились непосредственно в эпикард, в КА или внутривенно пациентам с тяжёлыми формами ИБС. В ходе этих исследований, включавших небольшое количество больных и проводившихся без использования плацебо открытым методом, было показано значительное улучшение клинической симптоматики стенокардии и переносимости физической нагрузки.

Наиболее оптимистичные результаты использования факторов роста были получены в исследовании AGENT. Исследование проведено как плацебо контролируемое, группу плацебо составили 10 больных ИБС, основную группу — 60. В исследовании AGENT (Angiogenic GENE Therapy) через 12 недель после интракоронарного введения гена FGF4 в составе аденовируса с нарушенной репликацией (Ad5-FGF4), детальный анализ подгрупп выявил улучшение показателей тредмил-теста у пациентов с длительностью исходной

нагрузочной пробы менее 10 минут [136,151].

Первым исследованием, продемонстрировавшим неоспоримое клиническое улучшение у пациентов с тяжёлой стенокардией, явилось широкомасштабное рандомизированное исследование генной терапии REVASC (Randomized Evaluation of VEGF for Angiogenesis in Severe Coronary disease) [128]. Сравнивались 2 группы больных: в одной проводилась инъекция интрамиокардиально в стенку ЛЖ посредством миниторакотомии гена VEGF121 в составе аденовируса с нарушенной репликацией (Ad-VEGF121), в другой продолжалась оптимальная медикаментозная терапия. Значительное улучшение по данным тредмил-теста (увеличение времени до появления болей и до возникновения депрессии сегмента ST 1 мм и более) было выявлено через 26 недель, а происходящее клиническое улучшение наблюдалось уже от 3-х месяцев после процедуры.

1.5. Возможность стимуляции ятрогенного неоангиогенеза при ИБС.

Ятрогенный неоангиогенез представляет собой новую тактику улучшения перфузии ишемизированных тканей с помощью усиления естественных, но недостаточных процессов неоваскуляризации. Разработке этой лечебной тактики способствовало развитие современных представлений о молекулярных и клеточных механизмах регуляции роста и ремоделирования кровеносных сосудов. Толчок к интенсивному исследованию этих механизмов был дан Folkman J., предложившим гипотезу о том, что прогрессирующее развитие злокачественных опухолей зависит от их васкуляризации [121]. Было показано, что опухоль продуцирует в большом количестве фактор, стимулирующий рост сосудов, который вскоре после этого Svet-Moldavsky G.J, Chimishkyan K.L. предложили использовать для реваскуляризации ишемизированного миокарда и лечения ИМ [269]. В дальнейшем большое количество экспериментальных и некоторые небольшие нерандомизированные исследования показали огромный терапевтический потенциал данной концепции. Однако, по данным больших

плацебо-контролируемых клинических исследований не подтвердилась однозначная эффективность стимуляции ростовыми факторами направленного неоваскулогенеза в ишемизированном миокарде.

Рост и образование сосудов в постнатальном периоде развития организма осуществляется через ангиогенез, артериогенез и васкулогенез. Ангиогенез представляет собой образование новых капилляров от посткапиллярных венул, которое осуществляется через активацию эндотелиальных клеток (ЭК), экспрессию в них протеаз, деградацию внеклеточного матрикса, пролиферацию и миграцию этих клеток, образование ими первичных высокопроницаемых сосудистых структур, последующую стабилизацию и "взросление" этих структур за счёт привлечения перицитов и гладкомышечных клеток (ГМК) и организации их в сложную трехмерную сосудистую сеть [19,99]. Основным стимулом к ангиогенезу при физиологических и патологических состояниях является недостаток кислорода (гипоксия или ишемия), который через активатор транскрипции факторов ангиогенеза – индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), индуцирует экспрессию многих ангиогенных факторов и прежде всего основного регулятора ангиогенеза как в эмбриональном, так и в постнатальном периоде развития организма – фактор роста (ФР) эндотелия сосудов (VEGF) и его рецепторов. VEGF избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию ЭК, их предшественников и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к нему, увеличивает сосудистую проницаемость, способствуя пропотеванию белков плазмы в околососудистое пространство, которое необходимо для миграции ЭК, индуцирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и образование NO, что способствует вазодилатации и стимулирует экспрессию протеаз, разрушающих связи между ЭК и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток. В процессе стабилизации и "взросления" вновь образованной незрелой сосудистой сети участвует ряд факторов: ангиопоэтин-1, подавляющий пролиферацию ЭК,

уменьшающий сосудистую проницаемость, способствующий привлечению перицитов; тромбоцитарный ФР (PDGF), привлекающий перициты и ГМК; трансформирующий ФР-бета 1 (TGF-beta 1), стимулирующий синтез белков матрикса. Процесс ангиогенеза строго регулируется ФР во времени и пространстве, и это необходимо учитывать при планировании тактики терапевтического ангиогенеза. Недостаточный физиологический ангиогенез, обусловленный недостаточной продукцией ФР или экспрессией их рецепторов, либо увеличенной продукцией его ингибиторов, может способствовать нарастанию тяжести ишемических заболеваний (ИБС, хронической ишемии нижних конечностей). Ангиогенез приводит к увеличению плотности капиллярной сети в ишемизированных тканях и уменьшению периферического сосудистого сопротивления, что необходимо для обеспечения перфузии тканей, однако без артериогенеза он недостаточен для полноценной реваскуляризации.

Артериогенез – формирование коллатеральных сосудов из нефункционирующих артериолярных соединений – представляет собой наиболее эффективный процесс реваскуляризации, обеспечивая кровоток в обход места окклюзии. Важнейшим стимулятором артериогенеза является увеличение напряжения сдвига выше места окклюзии, обусловленное увеличением кровотока, что способствует экспрессии молекул адгезии ЭК и последующей аккумуляции моноцитов в стенке сосуда, секретирующих большое количество ФР, из которых основными регуляторами артериогенеза являются ФР фибробластов (FGF), а также PDGF, VEGF и СХС-хемокины [17,291]. В многочисленных работах показана значительная индивидуальная вариабельность состояния естественных механизмов неоваскуляризации, вероятно, генетически детерминированных, что может влиять и на эффективность ангиогенной терапии [250,278,234].

Васкулогенез – это формирование *in situ* кровеносных сосудов из прогениторных ЭК. Васкулогенез тесно ассоциирован с ангиогенезом и

является обязательным участником формирования новых сосудистых отростков и неоваскуляризации, как физиологической (в ишемизированных тканях) [89], так и патологической (в опухолях) [260,111]. Цель терапевтического ангиогенеза – обеспечить реваскуляризацию ишемизированных тканей за счёт стимуляции естественных процессов образования и роста сосудов. Стратегия ангиогенной терапии включает в себя снабжение этих тканей экзогенными факторами роста в виде рекомбинантных белков или генетических конструкций, стволовыми или прогениторными клетками, мобилизацию эндогенных стволовых и прогениторных клеток из костного мозга или тканевого депо, а также сочетание этих воздействий.

Таким образом, проблема ИБС занимает одно из ведущих мест среди важнейших медицинских проблем XXI века. Являясь распространённым заболеванием, она стоит первой среди основных причин смертности, а также временной и стойкой утраты трудоспособности населения в развитых странах мира и является одной из главных в развитии СН.

Больные с постинфарктным кардиосклерозом, диффузным поражением коронарных артерий, отсутствием возможности выполнения полной хирургической реваскуляризации миокарда, составляют многочисленную группу больных ИБС, тем самым, вызывая особый интерес среди практикующих врачей к вопросам ведения больных данной категории и выбора оптимальных методов лечения, особенно у пациентов, ранее уже перенесших КШ. Судьба этих больных во многом зависит от качества и своевременности диагностики, а в последующем и от адекватности проводимого современного терапевтического и хирургического лечения.

При этом появились данные о возможности использования новых методов лечения подобных больных, направленные на стимуляцию неоваскуляризации и репаративных процессов в миокарде. Перспективным

направлением является изучение клеточной терапии и применению факторов роста в лечении пациентов с ИБС.

С каждым годом использование клеточной терапии в практическом здравоохранении у больных с ишемической дисфункцией миокарда приобретает все большее значение. Метод клеточной трансплантации в настоящее время считается наиболее перспективным для стимуляции регенерационно-репаративных процессов в миокарде. В течение последних лет эта процедура была введена в клиническую практику для улучшения результатов лечения пациентов с ишемической дисфункцией миокарда. Вместе с тем, функциональность микроциркуляторного русла миокарда и проницаемые характеристики гемокапилляров, интенсивность ангиогенеза в сердечной мышце при непрямой реваскуляризации миокарда и усилении процессов репарации и регенерации кардиомиоцитов на фоне ишемии не изучены.

Использование мезенхимальных стволовых аутологичных клеток жировой ткани в комплексе с применением факторов роста эндотелия и создание условий для неоангиогенеза – новый и неизученный метод лечения наиболее тяжёлой категории пациентов с ИБС. При этом используемые клетки, будучи аутологичными для реципиента, снимают с врача этические, юридические и организационные проблемы получения донорских клеток, а также устраняют необходимость иммуносупрессивной терапии, которая обычно требуется после трансплантации эмбриональных и фетальных клеток.

Поиск эффективного метода, позволяющего направленно проводить неоваскуляризацию в ишемизированных и/или гибернированных участках миокарда, может стать методом выбора для большой части пациентов с коронарной патологией. Основой такого метода может стать использование «клеточных технологий» в сочетании с применением непрямой реваскуляризацией.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Общая характеристика исследования.

Настоящее исследование является проспективным и состоит из двух основных частей - экспериментального и клинического. Эксперименты *in vivo*, во время которых исследовали морфологические особенности ангиогенеза после применения методов стимуляции экстракардиальной реваскуляризации на экспериментальной модели инфаркта миокарда, были проведены на 50 кроликах обоих полов породы «шиншилла». Вторая часть исследования была посвящена изучению методов обработки перикарда и эпикарда.

Клиническая часть в свою очередь состояла из лабораторного этапа, во время которого исследовали содержание факторов роста эндотелия в различных тканях пациентов с и без ИБС, количественно изучали содержание мезенхимальных стволовых клеток в жировой ткани различной локализации. Моделировали и получали липидно-фибриновую матрицу для стимуляции неоангиогенеза.

Внедрение предлагаемой программы в клиническую практику было разделено на стационарный этап, во время которого оценивали безопасность предлагаемых методов лечения, а также эффективность во время ближайшего послеоперационного периода. Амбулаторно продолжали наблюдение за пациентами в течение 7 лет – анализировали клиническую картину, показатели качества жизни, данные инструментальных методов исследования (ЭхоКГ и сцинтиграфии миокарда), а также выполняли коронарошунтографии для визуальной оценки неоваскуляризации (рис.1).



Рис.1. План исследования.

2.2. Характеристика материалов и методов экспериментального исследования.

Эксперименты *in vivo* на 50 кроликах обоих полов породы «шиншилла» массой 3200 ± 600 г проведены в соответствии с ГОСТ 10993.6 – 2009 и с требованиями «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708 н от 23.08.2010).

Все манипуляции с животными проведены согласно принципам гуманного отношения к животным в соответствии с Международными рекомендациями, а также с соблюдением биоэтических норм и требований Международного комитета по науке.

Документы:

1. ГОСТ Р ИСО 10993.6-09 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследование местного действия после имплантации».
2. Санитарные правила № 1045-73 по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник.
3. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Реаниматология. – 1993. - №1 – С. 29.
4. Правила лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №267 от 19.06.2003).
5. Требования Международного комитета по науке по использованию в экспериментальных исследованиях лабораторных животных // Бюллетень ИКЛАС. – 1978. - № 24. – С. 4-5.

Животных содержали в стандартных условиях, соответствующих «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», по 1 особи в

поликарбонатной клетке. В качестве подстила использовали древесные опилки лиственных пород.

Животные получали стандартный корм для лабораторных животных. Кормление и потребление жидкости выполнялось в соответствии с ГОСТ 33215-2014, «Межгосударственный стандарт руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» п.6.6, п.6.7. Микробиологический статус кормов и жидкости соответствовал и не оказывал негативного влияния на результаты проводимого теста. Микробиологический статус воды соответствовал СанПиН 2.1.4.1074-01 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения» и не оказывал негативного влияния на результаты проводимого теста.

Животные были адаптированы в лаборатории в течение 14 суток до начала эксперимента. Во время этого периода осуществляли ежедневный осмотр внешнего состояния животных. Во время карантина все кролики оставались здоровыми.

Животных распределяли по группам рандомизированно. Каждому животному присваивали индивидуальный номер, помечаемый индивидуальным окрашиванием, и фиксируемый на карточке клетки.

У лабораторных животных до проведения оперативного вмешательства оценивалась масса тела, регистрировались показатели ЭКГ и ЭхоКГ. Интраоперационно выполняли постоянную запись ЭКГ в 3 стандартных и трёх усиленных отведениях.

В послеоперационном периоде проводили контроль массы тела, регулярно (на 1, 3, 7, 10 и 21 сутки как после первичного вмешательства, так и повторного) регистрировали показатели ЭКГ и ЭхоКГ.

В конечной стадии выводили животных из эксперимента. В последующем проводился макроскопический осмотр полости перикарда и сердечной мышцы в интактных областях и зоне индуцированного ИМ.

Для микроскопического анализа подготавливали препараты спаек между перикардом и эпикардом, а также 3 сегмента поперечно срезанного миокарда одинаковой толщины (апикальный, средний, базальный) дистальнее лигатуры на ПМЖВ. После фиксации каждый фрагмент ткани помещали в 10 % раствор нейтрального формалина на 4 суток и заливали в парафин, затем изготавливали срезы толщиной 7 мкм по общепринятой методике.

Окраска гематоксилином, эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. При этом выполняли качественную и количественную оценку структурных изменений в очагах инфаркта, рубце и пограничных участках. Количественную оценку реваскуляризации проводили в пограничной к рубцу зоне. В каждом препарате в пяти последовательных полях зрения при увеличении $\times 10$, $\times 20$ и $\times 40$ подсчитывали количество всех сосудистых элементов (артериол, капилляров, венул, вен и синусов).

Экспериментальная часть работы проведена на кафедре патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Смоленский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (зав. кафедрой профессор, д.м.н. О.В. Молотков).

Для оценки реакции перикарда и эпикарда на различные воздействия внешних факторов при повреждении его мезотелиального слоя (десквамации) с целью активации процессов неоангиогенеза проведена серия клинических исследований. Методом случайной выборки были отобраны 15 пациентов, находившихся на лечении в клинике грудной и сердечно-сосудистой хирургии им. Св. Георгия, отделении сердечно-сосудистой хирургии НМХЦ им Н.И. Пирогова и поступивших для выполнения АКШ. Во время операции часть перикарда площадью 4x4 см подвергали воздействию абразивных и механических (тальк, обработка перчаткой), химических (60% и 96% этиловый

спирт, раствор йода 2% спиртовой, сода кальцинированная), физических (локальный нагрев до 80-90°C). В дальнейшем оценивали реакцию перикарда путем иссечения обработанных участков перикарда и проведения гистологического исследования. Все пациенты дали информированное согласие на проведение исследования.

2.2. Характеристика материалов и методов клинического исследования (лабораторный этап).

Вторая часть исследования была посвящена поиску возможных источников факторов роста сосудов в организме больных ИБС и путей их получения и применения. Исследование проведено в клинике грудной и сердечно-сосудистой хирургии им. Св. Георгия, отделении сердечно-сосудистой хирургии НМХЦ им Н.И. Пирогова. В качестве определяемого источника стимуляции неоангиогенеза был выбран фактор роста эндотелия сосудов (VGEF).

Случайным образом были выбраны 22 пациента, находившихся на лечении в данный период в отделении сердечно-сосудистой хирургии, поступивших для выполнения хирургической реваскуляризации миокарда. Всем больным при поступлении в клинику на основании данных анамнеза и клинической картины установлен диагноз ИБС, который подтверждён данными инструментального обследования. У каждого пациента было получено информированное согласие на проведение исследования. Во время выполнения прямой реваскуляризации миокарда проводилось изъятие и предварительная подготовка тканевого материала:

1. Жировой ткани в области инволютивно изменённого тимуса;
2. Эпикардальной жировой ткани;
3. Участка ЛВГА;
4. Участка перикарда;
5. Фрагмент большой подкожной вены;

6. Фрагмент резецированного ушка правого предсердия.

В дальнейшем в лабораторных условиях проводилась окончательная подготовка материала и исследование факторов роста.

Третья часть исследования посвящена поиску источника мезенхимальных стволовых клеток в организме больных ИБС и путей их получения и применения. Случайным образом были выбраны 20 пациентов, находившихся на лечении в данный период в отделении сердечно-сосудистой хирургии, поступивших для выполнения хирургической реваскуляризации миокарда. Всем больным при поступлении в клинику на основании данных анамнеза и клинической картины установлен диагноз ИБС, который подтверждён данными инструментального обследования. У каждого пациента было получено информированное согласие на проведение исследования. Во время операции прямой реваскуляризации миокарда проводилось изъятие тканевого материала (жировой ткани области инволютивно измененного тимуса, перикардальной жировой ткани, жировой ткани передней брюшной стенки) и детальный его анализ.

Четвертая часть исследования: на основании полученных данных предложена липидно-фибриновая матрица, отвечающая всем необходимым требованиям субстрата, стимулирующего неоангиогенез.

2.3. Характеристика материалов клинического исследования (стационарный этап).

Клиническая часть исследования включает анализ данных комплексного обследования больных ИБС, находившихся на стационарном лечении в Национальном медико-хирургическом Центре им. Н.И Пирогова Минздрава России с января 2008 по январь 2018 года. За данный период 4150 пациентам выполнено коронарное шунтирование.

Критерии включения в исследование:

- клинические проявления ИБС III-IV ФК;
- резистентность к традиционной медикаментозной терапии и отсутствие возможности для эндоваскулярной реваскуляризации миокарда, множественное поражение коронарных артерий;
- отсутствие гемодинамически значимой патологии клапанного аппарата сердца;
- отсутствие возможности выполнить полную реваскуляризацию миокарда по различным причинам.

Критерии исключения:

- возможность для чрескожного коронарного вмешательства, стентирования КА, хирургического ремоделирования ЛЖ или кардиальной ресинхронизирующей терапии;
- возможность выполнения полной хирургической реваскуляризации миокарда;
- выраженные почечная и печёночная недостаточность;
- наличие тромбоза ЛЖ или предсердия;
- гемодинамически значимая патология клапанного аппарата сердца;
- наличие онкозаболеваний.

Из 4150 пациентов 1864 подходили под перечисленные критерии. Причины невозможности выполнить полную реваскуляризацию миокарда изложенным в таблице 1.

Причины отказа от полной хирургической реваскуляризации миокарда.

Параметр	Количество пациентов (%)
Малый диаметр КА	1131 (60,7%)
Окклюзия КА и отсутствие коллатерального кровообращения в данной области	478 (25,6%)
Наличие стента в данной области и техническая невозможность выполнения шунтирования	48 (2,6%)
Интрамиокардиальное расположение КА	90 (4,8%)
Кальцинирование КА	102 (5,5%)
Наличие ранее сформированного коронарного шунта в данной области	15 (0,8%)

Работа состоит из двух частей:

1. Оценка безопасности клинического применения предлагаемой методики в сочетании с выполнением традиционной реваскуляризации у больных ИБС.
2. Оценка клинической эффективности предложенной методики в сочетании с выполнением традиционной открытой неполной реваскуляризации миокарда в сравнении с изолированной неполной реваскуляризацией.

Для проведения первой части исследования были случайно отобраны 40 пациентов (20 пациентов на первичном этапе разработки методики ЮрЛеон I и 20 пациентов после модификации методики – ЮрЛеон II), поступивших для хирургической реваскуляризации миокарда. В дополнении к традиционному КШ в условиях ИК этим пациентам выполнены методики ЮрЛеон. Проведён анализ послеоперационного периода и оценены как клинические, так и лабораторно-инструментальные показатели на предмет

воздействия комбинированной методики. Контрольную группу составили 30 случайных пациентов, которым выполнили полную реваскуляризацию миокарда в условиях ИК.

Для проведения второй части исследования было проспективно сформировано две группы пациентов. Все они были рандомизированы при поступлении, используя генератор случайных чисел, и распределены на 2 группы, в зависимости от выбранной тактики лечения:

I группа (1 опытная, n=865) - традиционную хирургическую реваскуляризацию миокарда дополняли методикой десквамации эпикарда и перикарда, а также дополнительным введением дренажного аспирата в первые сутки после операции. Методика получила название ЮрЛеон I;

II группа (контрольная, n=865) - выполняли общепринятую хирургическую реваскуляризацию миокарда;

III группа (2 опытная, n=134) - традиционную хирургическую реваскуляризацию миокарда дополняли механической обработкой эпикарда и перикарда, введением дренажного аспирата в первые сутки после операции, подготовку и формирование липидно-фибриновой матрицы, размещение её в полости перикарда. Методика получила название ЮрЛеон II (Рис. 2).



Рис. 2. План исследования.

Исследование проведено в соответствии с протоколом и стандартными операционными процедурами. Они гарантируют строгое соблюдение требованиям следующих документов согласно Good Clinical Practice:

1. ICH Harmonized Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice 1996.
2. Directive 91/507/EEC, The Rules Governing Medicinal Products in the European Community.
3. Declaration of Helsinki, concerning medical research in humans (Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human

Subjects, Helsinki 1964, amended Tokyo 1975, Venice 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996, Edinburgh, 2000). Протокол, согласительная форма и другие документы, касающиеся объекта исследования, рассмотрены и утверждены независимыми членами этического комитета ФГБУ «НМХЦ им Н.И Пирогова» Минздрава России.

2.3.1. Первый этап исследования: оценка безопасности клинического применения предлагаемой методики.

В исследование включено 40 пациентов (20 пациентов на первичном этапе разработки методики ЮрЛеон I и 20 пациентов после модификации методики – ЮрЛеон II), поступивших для хирургической реваскуляризации миокарда. Контрольную группу составили 30 случайных пациентов, которым было запланировано КШ.

Преобладали пациенты мужского пола (мужчин было 31 (80%), женщин – 9 (20%).

Всем пациентам при поступлении в клинику на основании данных анамнеза и клинической картины установлен диагноз ИБС, который был подтверждён данными инструментального обследования. Запланирована хирургическая реваскуляризация миокарда в условиях ИК. Выполнить полную реваскуляризацию миокарда не представлялось возможным по причинам, изложенным в табл. 1

Во время операций первой группе пациентов (n=20), наряду с выполнением КШ, проведена методика ЮрЛеон I (скарификация перикарда и эпикарда абразивной перчаткой и скальпелем во время операции и введение отделяемого по дренажам интраперикардially в первые сутки после операции).

Во второй группе пациентов (n=20), наряду с КШ, проведена методика ЮрЛеон II (скарификация перикарда и эпикарда абразивной перчаткой и

скальпелем во время операции, подготовка липидно-фибриновой матрицы с размещением её в полости перикарда с последующим введением отделяемого по дренажам интраперикардially в первые сутки после операции).

Интраоперационно были взяты посевы на аэробную микрофлору из полости перикарда, подготовленной и имплантированной матрицы. В послеоперационном периоде кроме этого проводился бактериологический контроль отделяемого из полости перикарда.

В послеоперационном периоде у пациентов оценивали выраженность воспалительной реакции: определялся уровень острофазовых белков альфа1-антитрипсина, альфа2-макроглобулина и С-реактивного белка (СРБ). Кроме этого проанализирована динамика лейкоцитоза и появление сдвига лейкоцитарной формулы.

Провели анализ в периферической крови динамики (перед операцией, через 20-24 час. и на 3-е и 7-е сутки) маркеров повреждения миокарда (КФК МВ фракции, тропонин I).

В раннем и позднем послеоперационном периоде выполняли контроль ЭхоКГ и выполняли УЗИ полости перикарда и плевральных полостей с целью оценки накопления жидкости, как реакцию перикарда на имплантацию липидно-фибриновой матрицы.

2.3.2. Второй этап исследования: оценка клинической эффективности предлагаемой методики.

Во всех группах преобладали пациенты мужского пола (мужчин было 1353 (72,5 %), женщин – 511 (27,5 %) (табл. 2).

Табл. 2.

Распределение пациентов по возрасту и полу.

Параметры	I группа (n=865)		II группа (n=865)		III группа (n=134)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
пол						
мужской	712	76,4	653	70,1	106	79,1
женский	220	23,6	279	29,9	28	20,9

Всем пациентам при поступлении в клинику на основании данных анамнеза и клинической картины установлен диагноз ИБС, который был подтверждён данными инструментального обследования.

Основные жалобы больных на этапе госпитализации представлены в табл.3

Табл. 3.

Жалобы больных при госпитализации.

Показатель	I группа (n=865)	II группа (n=865)	III группа (n=134)
стенокардитические боли	823 (95,1%)	848 (98%)	129 (96,3%)
одышка	658 (76%)	690 (79,3%)	103 (76,9%)
головокружение	193 (22,3%)	158 (18,3%)	32 (23,9%)
периферические отеки	291 (33,6%)	315 (36,4%)	58 (43%)

Пациенты всех групп имели высокий функциональный класс стенокардии по классификации Канадского кардиологического общества (CCS) (табл. 4).

Табл. 4.

Распределение пациентов по функциональным классам стенокардии CCS.

Функциональный класс стенокардии (CCS)	I группа (n=865)		II группа (n=865)		III группа (n=134)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
III	424	49	333	38,5	65	48,5
IV	441	51	532	61,5	69	51,5

Пациенты, включённые в исследование, имели следующие сопутствующие заболевания и факторы риска (табл. 5).

Табл. 5.

Характер факторов риска.

Факторы риска	I группа (n=865)	II группа (n=865)	III группа (n=134)
мультифокальный атеросклероз	614 (70,9%)	586 (67,7%)	68 (50,7%)
ИМ в течение 90 суток	268 (30,9%)	305 (35,3%)	43 (32,1%)
сниженная ФВ ЛЖ	356 (41,2%)	380 (43,9%)	49 (7,5%)
неврологический дефицит	48 (5,5%)	39 (4,5%)	10 (21,6%)
ХБП (1 и более стадии)	295 (34,1%)	245 (28,3%)	29 (21,6%)
СД	253 (29,2%)	270 (31,2%)	35 (26,1%)
Ожирение	305 (35,3%)	320 (36,9%)	41 (30,6%)
ХОБЛ	569 (65,8%)	520 (60,1%)	79 (58,9%)
значимые нарушения ритма сердца в анамнезе	231 (26,7%)	248 (28,7%)	35 (26,1%)
эндоваскулярные операции на сердце в анамнезе	430 (49,7%)	415 (47,9%)	68 (50,7%)

При ЭхоКГ анализе параметров ЛЖ у пациентов в исследуемых группах, получены следующие данные (табл.6).

Табл. 6.

Характеристика показателей ЛЖ при ЭхоКГ до операции (M±m).

Параметры	I группа (n=865)	II группа (n=865)	III группа (n=134)
КДО ЛЖ (мл)	130±20,4	128,38±16,5	168,6±10,8
КСО ЛЖ (мл)	57,2±18,5	56,08±13,32	58,6±1,82
МЖП (см)	1,26±0,18	1,21±0,17	1,1±0,2
Зст. (см)	1,14±0,13	1,09±0,14	1,0±0,1
ФВ (%)	53,4±6,4	54,5±5,9	54,9±5,6

Для оценки расположения коронарных сосудов, преимущественного типа кровоснабжения сердца, а также для определения степени и характера

поражения венечных артерий перед оперативным лечением выполняли селективную коронарографию в 5 стандартных проекциях. Определяли тип кровоснабжения сердца, характер поражения КА, сохранность периферического русла.

Преимущественно был правый тип кровоснабжения сердца. В 35% встречался сбалансированный тип и реже всего (14%) встречался левый тип кровоснабжения (табл.7).

Табл. 7.

Распределение пациентов по типу кровоснабжения сердца.

Тип кровоснабжения	I группа (n=865)		II группа (n=865)		III группа (n=134)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
правый	513	55	485	52	71	53
левый	101	10,8	102	11	15	11
сбалансированный	318	34,2	345	37	49	36

Поражение основных венечных бассейнов представлено в таблице (табл.8).

Табл. 8.

Гемодинамически значимое поражение КА.

Характер поражения	I группа (n=865)	II группа (n=865)	III группа (n=134)
ствол ЛКА	386 (44,6%)	420 (48,6%)	55 (41%)
ПМЖА	858 (99,2%)	835 (96,5%)	129 (96,3%)
ДВ-1	452 (52,6%)	380 (43,9%)	65 (48,5%)
ДВ-2	150 (17,3%)	192 (22,2%)	60 (44,8%)
ОВ	763 (88,2%)	745 (86,1%)	95 (70,9%)
ВТК-1	685 (79,2%)	695 (8%)	99 (73,9%)
ВТК-2	751 (86,8%)	710 (82,1%)	93 (69,4%)
ИМА	478 (55,3%)	430 (49,7%)	65 (48,5%)
ПКА	830 (96%)	847 (97,9%)	120 (89,6%)
ЗБВ	458 (52,9%)	486 (56,2%)	69 (51,5%)
ЗМЖВ	593 (68,6%)	550 (63,6%)	75 (56%)

Выполнена стратификация пациентов по различным шкалам риска (Табл. 9)

Табл. 9.

Стратификация пациентов по шкалам риска (M±m).

Параметры	I группа (n=865)	II группа (n=865)	III группа (n=134)
Шкала EuroSCORE II	4,36±0,69	4,39±0,89	4,45±0,38
Шкала SYNTAX	35±4,2	35,7±3,1	36,9±2,2

Всем пациентам выполнялась хирургическая реваскуляризация миокарда, согласно критериям: ACC/AATS/АНА/ASE/ASNC/SCAI/SCCT/STS Appropriate Use Criteria for Coronary Revascularization in Patients With Stable Ischemic Heart Disease (2017) и в соответствии с руководствами по хирургическому лечению больных ИБС ESC/EACTS Guidelines on Myocardial Revascularisation (2014).

В послеоперационном периоде все пациенты получали только медикаментозную терапию, соответствующую текущим рекомендациям «ACC/АНА/ААТS/PCNA/SCAI/STS Focused Update of the Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease», 2014 год; национальным рекомендациям ОССН, РКО и РНМОТ по диагностике и лечению ИБС и ХСН (табл. 10).

Табл. 10.

Медикаментозная терапия.

Группы препаратов	I группа (n=865)	II группа (n=865)	III группа (n=134)
Антиагреганты	865 (100%)	865 (100%)	134 (100%)
бета-блокаторы	510 (93,6%)	825 (95,4%)	129 (96,3%)
и-АПФ	310 (35,8%)	318 (36,8%)	40 (29,9%)
Статины	860 (99,4%)	859 (99,3%)	134 (100%)
Диуретики	298 (34,5%)	310 (35,8%)	45 (33,6%)

2.4. Характеристика материалов клинического исследования (амбулаторный этап).

После выписки из стационара пациенты наблюдались в течение 7 лет (1 и 2 группы) и 3 лет (3 группа). Наблюдение включало в себя опросы по телефону для проведения функциональных тестов, а для инструментального исследования, пациенты прибывали в стационар.

В отдалённом периоде оценивали изменение ФК стенокардии, тест 6-ти минутной ходьбы, выполняли ЭхоКГ исследование и сцинтиграфию миокарда.

Отдельной группе пациентов (158 больных) выполнялась коронарошунтография (рассмотрены в разделе 2.5.).

2.5. Характеристика методов исследования.

Первичное исследование включало в себя сбор анамнеза, осмотр, тест 6-ти минутной ходьбы, опросник КЖ (SF- 36), стандартные лабораторные анализы. Больной подписывал информированное согласие об участии в исследовании, проводилась беседа с его родственниками.

2.5.1. Лабораторные исследования.

Всем больным выполняли: клинический анализ крови (гематологический анализатор XS-1000i, Sysmex, Japan); коагулограмму (система исследования гемостаза СА-600, Sysmex, Japan); биохимический анализ крови (автоматический биохимический анализатор Olympus AU400, Beckman Coulter Inc., USA); исследование тропонина Т и I (иммунохимический анализатор Access®2, Beckman Coulter Inc.) в послеоперационном периоде; измерение показателей кислородного статуса крови (анализатор ABL800 FLEX Radiometer).

2.5.2. Инструментальные методы исследования.

Спектр выполняемых инструментальных обследований включал: рентгенографию грудной клетки; ЭхоКГ; ЭКГ; коронарографию; УЗИ органов брюшной полости; эзофагогастродуоденоскопию; УЗИ внечерепных отделов БЦА и сосудов нижних конечностей; синхро-ОФЭКТ миокарда с ^{99m}Tc -технетрилом.

ЭКГ регистрировали в 12 стандартных отведениях (I, II, III, aVR, aVL, aVF, V₁-V₆) на аппарате Schiller AG. Анализировали следующие данные: частота сердечных сокращений; ритм сердца; характеристика зубцов, комплексов и сегментов ЭКГ (форма, вольтаж и длительность) в различных отведениях.

ЭКГ выполняли на следующих этапах: непосредственно до подачи пациента в операционную, сразу после перевода больного в ОРИТ, минимум дважды ежедневно в процессе нахождения больного в ОРИТ, 1 раз в 3 суток при пребывании пациента в отделении и перед выпиской. При необходимости, эти исследования проводились чаще.

Интраоперационный мониторинг ST-сегмента проводили с помощью системы Datex Ohmeda S/5, позволяющей рассчитывать элевацию и депрессию сегмента ST в 7 отведениях (I, II, III, aVR, aVL, aVF, V₅).

Рентгенологическое исследование органов грудной клетки выполняли всем больным в двух стандартных проекциях: прямой и левой боковой. Специалистом оценивались размеры тени средостеня и лёгочный рисунок.

ЭхоКГ выполняли на аппарате «General Electric Vivid 7» с использованием трансторакальных и, при необходимости, транспищеводных датчиков. ЭхоКГ выполняли до операции; при необходимости, интраоперационно; ежедневно, при нахождении больного в ОРИТ; 1 раз в 4 суток при пребывании пациента в отделении и перед выпиской.

Учитывали следующие показатели: размер и объем ЛП; размер ПЖ.

Состояние ЛЖ оценивали по КДО, КСО, УО, КДР, КСР, толщина МЖП и ЗСЛЖ. Исследовали функцию клапанного аппарата сердца. Регионарную и глобальную систолическую функцию ЛЖ измеряли по формулам Theiholz и Simpson. Регистрировали следующие формы локального нарушения сократимости миокарда: гипокинезию и акинезию.

При анализе локальной сократимости ЛЖ использована схема его сегментарного строения. Анализ включал в себя 6 базальных, 6 средних, 4 апикальных и 1 истинно апикальный сегмент. Сегменты в базальной и средней частях ЛЖ: передний, переднеперегородочный, нижнеперегородочный, нижний, нижнебоковой, переднебоковой. В апикальной части ЛЖ различали 4 сегмента: передний, перегородочный, нижний и боковой. Отдельно выделен истинно апикальный сегмент.

Всем пациентам в предоперационном периоде выполняли цветное дуплексное сканирование внечерепных отделов БЦА и сосудов нижних конечностей. Исследование проводили на аппарате Voluson E 8. Оценивали следующие показатели: состояние просвета сосуда, соотношение толщины интима-медиа, наличие деформаций сосуда, атеросклеротических бляшек, тромбов, их структуру и размеры. При этом степень стеноза артерии определяли на основании скоростных характеристик кровотока, планиметрического измерения степени стеноза по площади атеросклеротической бляшки и измерения степени стеноза по отношению к диаметру артерии.

ЭКГ синхронизированная однофотонная эмиссионная компьютерная томография (синхро-ОФЭКТ с ^{99m}Tc-технетрилом).

Для оценки наличия зон стресс-индуцированной ишемии, а также определения объёма рубцового поражения миокарда ЛЖ пациенты были обследованы с помощью синхро-ОФЭКТ до операции и в позднем

послеоперационном периоде (6 мес. – 5 лет после операции).

Изначально, используя тест DASI, определяли возможность выполнения нагрузки пациентом. Далее исследование проводили по стандартному клиническому протоколу: нагрузка – покой. В качестве нагрузочного теста выполняли велоэргометрическую пробу под контролем ЭКГ, АД и ЧСС. Нагрузку начинали с 25 Вт, и увеличивали каждые 3 мин. на 25 Вт. Тест прекращали при достижении субмаксимальной ЧСС или одного из критериев - более за грудиной, выраженной одышки и усталости, нарушений ритма или снижения АД в сравнении с предыдущими измерениями. Радиофармпрепарат (РФП) вводили внутривенно на пике нагрузки, после чего нагрузку продолжали ещё в течение 1 мин. Регистрацию накопления РФП выполняли через 40 мин. после введения РФП. Сканирование осуществлялось на комбинированной системе - ОФЭКТ/КТ «Discovery NM/CT 670» (GE Medical Systems).

Запись изображения проводили в 32 проекциях, начиная с левой передней косой, в матрицу 64x64x8, с ротацией детекторов на 180⁰. Время экспозиции на одну проекцию составляло 30 секунд. Регистрация изображений синхронизировалась по R-зубцу ЭКГ пациента. Для полуколичественного анализа сцинтиграмм использовали метод полярного картирования («бычий глаз») с использованием стандартной программы «Autoquant».

Трактовка всех результатов исследований выполнялась совместно с сотрудниками отделения радионуклеидной и функциональной диагностики Национального медико-хирургического Центра им. Н.И Пирогова (руководитель - профессор Вахромеева М.Н.).

Коронарография.

Всем пациентам в предоперационном периоде выполняли селективную коронарографию, изображение записывали в цифровом формате. Артериальный доступ осуществляли по методике Seldinger. У больных с

атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей применяли пункцию правой лучевой артерий.

Коронароангиографию левой КА выполняли в 4 стандартных проекциях: правая косая 150 и 450, левая косая проекция 600, левая боковая 900. При необходимости для лучшей визуализации проксимальных отделов передней нисходящей артерии (ПНА) и огибающей артерии в некоторых случаях применяли дополнительные проекции: левая передняя косая (450-750), каудо-краниальная (300) проекция, левая косая гепатоклюничная. Коронарографию правой КА выполняли в стандартных проекциях: правой косой 450, левой косой 600, и левой боковой проекциях 900 от сагиттальной оси.

Трактовка результатов проводилась совместно специалистами по рентгенэндоваскулярной диагностике и кардиохирургами. Определяли преимущественный тип кровоснабжения сердца, локализацию, характер и степень поражения коронарного русла.

2.6. Изучение качества жизни.

Для исследования КЖ использовали опросник SF-36, состоящий из 36 пунктов, которые сгруппированы в 8 шкал: физическое функционирование, ролевое (физическое) функционирование, боль, общее здоровье, жизнеспособность, социальное функционирование, эмоциональное состояние и психическое здоровье. Показатели каждой шкалы варьируют между 0 и 100, где 100 представляет полное здоровье.

Количественно оценены следующие показатели:

1. Физическое функционирование (Physical Functioning – PF) - степень, в которой физическое состояние ограничивает выполнение физических нагрузок;
2. Ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием (Role-Physical Functioning – RP) – влияние физического состояния на повседневную деятельность;

3. Боль (Bodily pain – BP) оценивает интенсивность боли и ее влияние на способность заниматься повседневной деятельностью;
4. Общее состояние здоровья (General Health – GH) – оценка больным своего состояния здоровья в настоящий момент и перспектив лечения;
5. Жизненная активность (Vitality – VT) оценивает самооценку пациентом своих сил и энергии;
6. Социальное функционирование (Social Functioning – SF) – степень ограничения физическим или эмоциональным состоянием социальной активности;
7. Ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием (Role-Emotional – RE), - степень влияния эмоционального состояния выполнению работы или другой деятельности;
8. Психическое здоровье (Mental Health – MH) - общий показатель настроения, наличия депрессии, тревоги или положительных эмоций.

Шкалы группируются в два показателя – «физический компонент здоровья» и «психологический компонент здоровья».

Исследование качества жизни проводили до операции и в отдалённом периоде при контрольном осмотре и обследовании. При невозможности контрольного осмотра после выписки анкетирование осуществляли по телефону.

2.6. Статистическая обработка результатов исследований.

Базу данных формировали на персональном компьютере в электронных таблицах Excel пакета MS Office 2013 («Microsoft Corporation», USA). Вся полученная информация подвергнута статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа в программе Statistica (Version 6.1.478.).

Показатели описательной статистики включали определение следующих

величин: число наблюдений (n), среднее квадратичное отклонение для количественных величин, абсолютное число (%) для качественных.

Для суждения о значимости различий количественных переменных в случае распределения, близкого к нормальному, использовали t -критерий Стьюдента, в противном случае – U -критерий Манна-Уитни.

При оценке дихотомических переменных, ввиду небольшого числа наблюдений, в отдельных группах использовали точный тест Фишера. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Выживаемость пациентов выражалась графически построением кривой выживаемости.

Расчёты проводились на персональном компьютере.

ГЛАВА III. МЕТОДИКИ ИНДУКЦИИ НЕПРЯМОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.

Для оценки морфологических изменений при стимуляции непрямой реваскуляризации миокарда проведено экспериментальное исследование *in vivo*. С целью моделирования клинической ситуации больного ИБС, осложнённой инфарктом миокарда и гипертонической болезнью, проведён эксперимент, первым этапом которого было создание гипертрофии левого желудочка, затем искусственно вызывали инфаркт, который лечили исключительно стимуляцией ангиогенеза.

3.1. Характеристика лабораторных животных, включённых в исследование. Нормативная документация.

Эксперименты *in vivo* проведены на 50 кроликах обоих полов породы «шиншилла» массой 3200 ± 600 г в соответствии с ГОСТ 10993.6 – 2009 и с требованиями «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708 н от 23.08.2010).

Животные были адаптированы в лаборатории в течение 14 суток до начала эксперимента. Во время этого периода осуществляли ежедневный осмотр внешнего состояния животных, все кролики оставались здоровыми.

Животных распределяли по группам рандомизированно. Каждому животному присваивали индивидуальный номер, помечаемый индивидуальным окрашиванием и фиксируемый на карточке клетки.

3.2. Экспериментальная часть. Характеристика оперативных вмешательств.

Экспериментальная часть исследования состояла из двух операций. Во время первой регистрировали основные инструментальные данные, включая ЭКГ и ЭхоКГ. Создавали искусственный стеноз аорты для развития аварийной гипертрофии миокарда. Далее проводили динамическое наблюдение и обследование лабораторных животных в течение 21 суток.

На 21-23 сутки выполняли второе оперативное вмешательство, направленное на моделирование ИМ у лабораторного животного и проведение манипуляций для стимуляции неоангиогенеза и репаративных процессов в полости перикарда.

Через 21-23 суток выводили животных из эксперимента согласно ГОСТ 33215-2014, п.6.11., с проведением аутопсии и гистологического исследования материала.

3.2.1. Первая часть эксперимента – моделирование аварийной гипертрофии.

Перед операцией животным проводилась премедикация путем внутривенного введения ксилазина гидрохлорида Xyla (Interchemie werken "De Adelaar" BV) в дозе 3 мг/кг (Рис.3).



Рис. 3. Установка катетера для инфузии препаратов.

В течение 15 минут изучали состояние периферического кровообращения в предварительно эпилированных кожных покровах внутренней поверхности левого бедра методом лазерной доплеровской флоуметрии с помощью аппарата ЛАКК-М (НПП «Лазма»). Оценивали средние значения перфузии: показатель микроциркуляции (ПМ), среднее квадратичное отклонение показателя микроциркуляции (СКО), а также нейрогенный тонус (НТ), миогенный тонус (МТ) и эндотелиальнозависимый компонент тонуса (ЭЗКТ) (Рис.4).

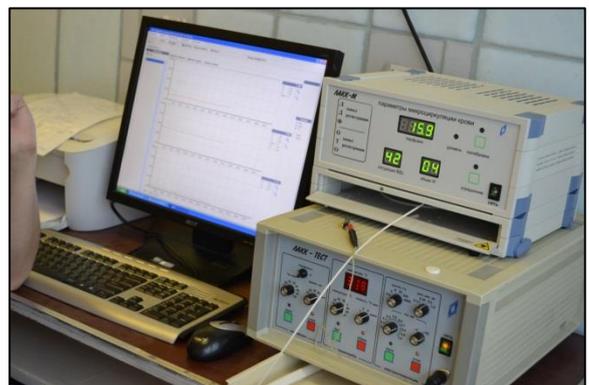


Рис. 4. Доплеровская флоуметрия для изучения состояния периферического кровообращения.

У всех животных регистрировали ЭКГ в трёх стандартных и трёх усиленных отведениях (Рис. 5) на аппарате ЭК12Т-01-"Р-Д" (НПП «Монитор»).



Рис. 5. Регистрация ЭКГ лабораторным животным.

Для оценки состояния макрогемодинамики выполняли эхокардиографическое исследование сердца (Рис. 6) на аппарате Mindrei z6 (Mindrey Medical International Limited), датчик микроконвексный 6с2р 5.0- 8.5 МГц. Оценивали толщину задней стенки левого желудочка (ЗСтЛЖ), конечный систолический и диастолический размер левого желудочка (КДР и КСР), ФВ ЛЖ, скорость кровотока в устье аорты; диаметр аорты перед началом операции, непосредственно после ушивания раны и на 21 сутки после моделирования аварийной гипертрофии миокарда.



Рис. 6. Регистрация ЭхоКГ лабораторным животным.

Хирургическое вмешательство выполняли под общей анестезией посредством внутривенного введения комбинации тилетамина гидрохлорида и золазепам гидрохлорида Zoletil (Virbac Sante Animale) в дозе 10 мг/кг. Во время оперативного вмешательства у кроликов сохранялось самостоятельное дыхание, что исключало необходимость ИВЛ.

Предварительная подготовка операционного поля выполнялась путем выбривания шерсти в проекции грудины, отступая от ее края парастернально на 3 см. Внутривенно седатированного кролика укладывали на хирургическом столе на спину, его конечности фиксировали в положении максимального разгибания (Рис. 7).



Рис. 7. Укладка лабораторного животного на операционном столе.

Оперативное вмешательство проводили в асептических условиях с использованием одноразового и многоразового стерильного хирургического инструментария и одноразового стерильного хирургического материала (перевязочный и шовный).

После трёхкратной обработки операционного поля кожным антисептиком Cutasept F (BODE Chemie GmbH, Hamburg) лабораторное животное и операционный стол накрывали двумя стерильными пелёнками. Брюшистым скальпелем №23 (Feather, Osaka) парастернально слева выполняли разрез кожи в проекции II-V рёбер длиной около 3-5 см. Далее послойно и также парастернально слева иссекали фасцию и мышцы до рёберно-грудинных сочленений, которые рассекали ножницами поочерёдно, начиная от II ребра в каудальном направлении. Одновременно и постепенно, не повреждая париетальный листок плевры левого лёгкого, иссекали поперечную фасцию до тех пор, пока восходящий отдел аорты не оказывался полностью доступным для дальнейших манипуляций (Рис. 8).

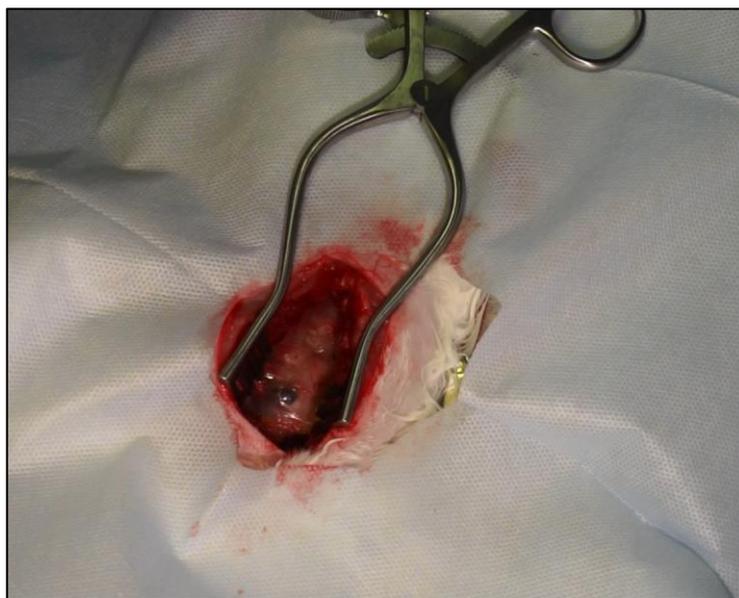


Рис. 8. Доступ к сердцу и восходящей аорте у лабораторного животного.

Интраоперационный гемостаз проводили с помощью компрессии и при неэффективности посредством прошивания мягких тканей биodeградируемой нитью PDS™II USP 3-0/4-0/5-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson International, Diegem).

Края раны отграничивали салфетками. С помощью ранорасширителя Кули (Cooley) или Вейтлэнера (Weitlaner) с тупоконечными зубцами рану разводили. Тупым путем, не повреждая перикард, выделяли восходящую аорту на 1 см выше синуса Вальсальвы. Вокруг аорты для прямого измерения ее диаметра с помощью диссектора проводили шелковую нить Mersilk™ USP 1/2/3 (Ethicon®, Johnson & Johnson International, Diegem). С помощью нити определяли длину предварительно стерилизованного «холодным» методом нейлонового крепежного хомута Nootech (Ningbo Sharkward Electronics Co. LTD, Ningbo) шириной 2,5 мм – 2/3 от исходного диаметра восходящей аорты (Рис. 9). Скальпелем наносили соответствующую отметку.

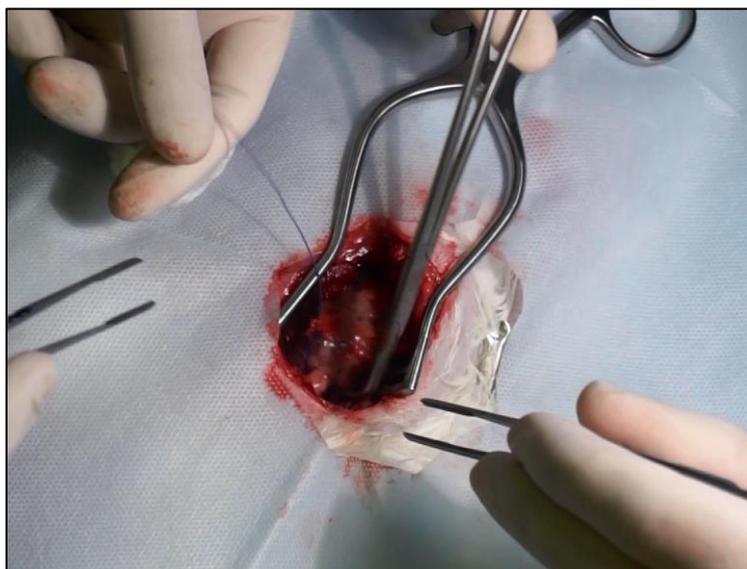


Рис. 9. Определение длины крепёжного хомута с помощи нити.

С помощью диссектора хомут проводили вокруг аорты и затягивали до метки. Остаток отрезали на уровне замка-застёжки (Рис. 10). Критерием правильно проведённой обструкции являлось сужение диаметра аорты в месте формирования стеноза на $1/3$ от исходного диаметра.

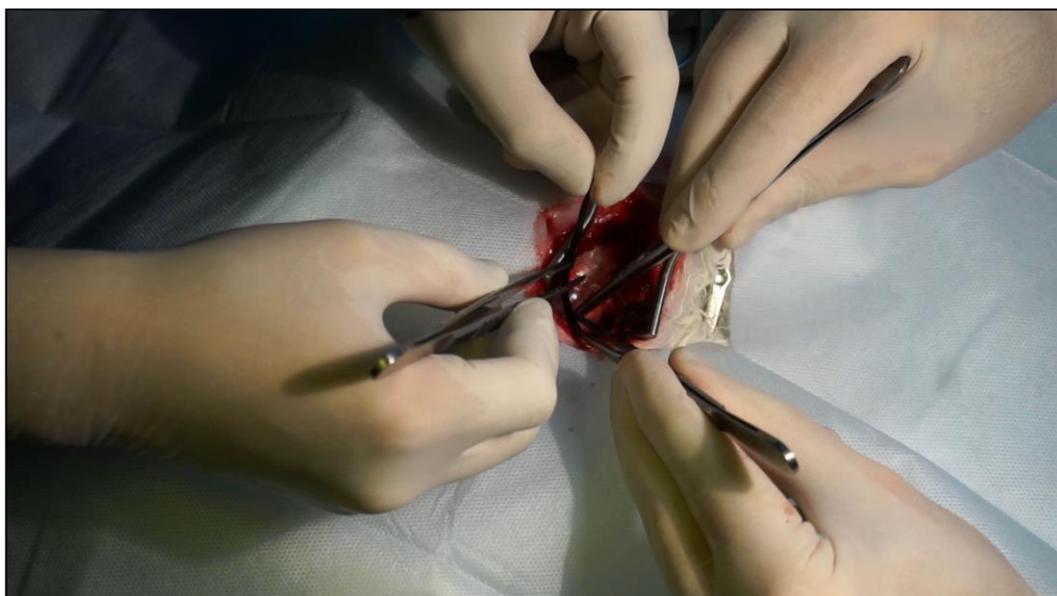


Рис. 10. Наложение хомута на восходящую часть аорты.

Состояние микроциркуляции в миокарде изучали до наложения хомута и непосредственно после его затягивания в области верхушки сердца.

Средостенные промывали 0,02% водным раствором хлоргексидина биглюконата и санировали, проводили контроль гемостаза. Если в ходе вмешательства была вскрыта левая плевральная полость, то к верхушке легкого устанавливали дренаж из инфузионной системы SFM (SFM Hospital Products GmbH, Berlin), который выводили контрапертурно через разрез кожи у каудального края раны и подшивали, а затем герметично подключали к шприцу, с помощью которого удалялся воздух из плевральной полости. Дренаж извлекали через 2 часа после оперативного вмешательства.

Рану послойно ушивали биodeградируемой нитью Vicryl™Plus USP 1/2/3 (Ethicon®, Johnson & Johnson International, Diegem): отдельными узловыми швами ребра фиксировали к грудине, мышцу и подкожную клетчатку сводили непрерывным обвивным швом, кожу также сводили непрерывным обвивным швом. Рану обрабатывали раствором антисептика Cutasept F и с помощью лейкопластыря Ролепласт (ООО «Новые перевязочные материалы», ООО «Биотекфарм», Жучки) покрывали асептической марлевой салфеткой New Life (ООО «Хлопчатобумажная компания «Навтeкс», Наволоки) (Рис. 11). После ушивания раны проводили повторную регистрацию ЭКГ и оценивали состояние периферического кровообращения в кожных покровах. Перевязка проводилась 1 раз в сутки, кожный шов удаляли на 7-10 суток после операции.



Рис. 11. Окончательный вид операционной раны.

Изучение состояния кожной микроциркуляции и регистрацию ЭКГ проводили под наркозом у всех животных на 1, 3, 7, 10 и 21 сутки после моделирования стеноза. На 21 сутки после обеспечения хирургического доступа к сердцу под наркозом проводили повторное изучение состояния микроциркуляторного русла ЛЖ у всех животных.

3.2.2. Вторая часть эксперимента – моделирование инфаркта миокарда.

Премедикация, общая анестезия и предварительная подготовка операционного поля - аналогично первой операции.

Предварительная подготовка операционного поля выполнялась путем выбривания шерсти в проекции грудины, отступая от ее края парастернально на 3,0 см. Внутривенно седатированного кролика укладывали на хирургическом столе на спину, конечности фиксировали в положении максимального разгибания.

Оперативное вмешательство проводили в асептических условиях с использованием одноразового и многоразового стерильного хирургического инструментария и одноразового стерильного хирургического материала (перевязочный и шовный).

После трехкратной обработки операционного поля кожным антисептиком Cutasept F (BODE Chemie GmbH, Hamburg) лабораторное животное и операционный стол накрывали двумя стерильными пелёнками. Брюшистым скальпелем размера №23 (Feather, Osaka) парастернально слева выполняли разрез кожи в проекции V-IX рёбер длиной около 3-5 см дистальнее первичного доступа. Далее послойно и также парастернально слева иссекали фасцию и мышцы до реберно-грудинных сочленений, которые рассекали ножницами поочередно, начиная от V ребра в каудальном направлении. Одновременно и постепенно, не повреждая париетальный листок плевры левого лёгкого и

перикард, иссекали поперечную фасцию до тех пор, пока сердце не оказывалось полностью доступным для дальнейших манипуляций.

Подготавливали аутологичную жировую ткань из подкожной жировой клетчатки и из эпикардальной жировой ткани при вскрытии перикарда (у животных 3 группы).

Интраоперационный гемостаз проводили методом компрессии и при неэффективности - прошиванием мягких тканей биodeградируемой нитью PDS™II USP 3-0/4-0/5-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson International, Diegem).

Края раны отграничивали салфетками. С помощью ранорасширителя Кули (Cooley) или Вейтлэнера (Weitlaner) с тупоконечными зубцами рану аккуратно разводили.

Перикард рассекали ножницами в проекции передней межжелудочковой ветви (ПМЖВ) левой коронарной артерии. ПМЖВ прошивали и перевязывали в дистальной 1/3 (Рис. 12) полипропиленовой нитью с атравматической иглой Prolene™ USP 5-0/6-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson International, San Lorenzo).

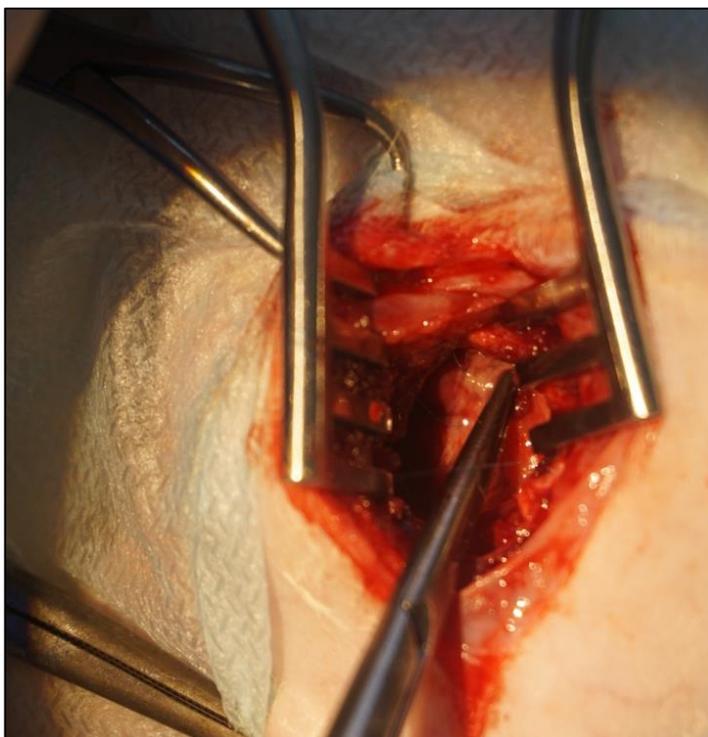


Рис. 12. Перевязка ПМЖА для моделирования инфаркта миокарда.

Наступление ишемии верифицировали визуально и по ЭКГ критериям: элевации сегмента ST, наступлению ишемических аритмий (рис. 13).

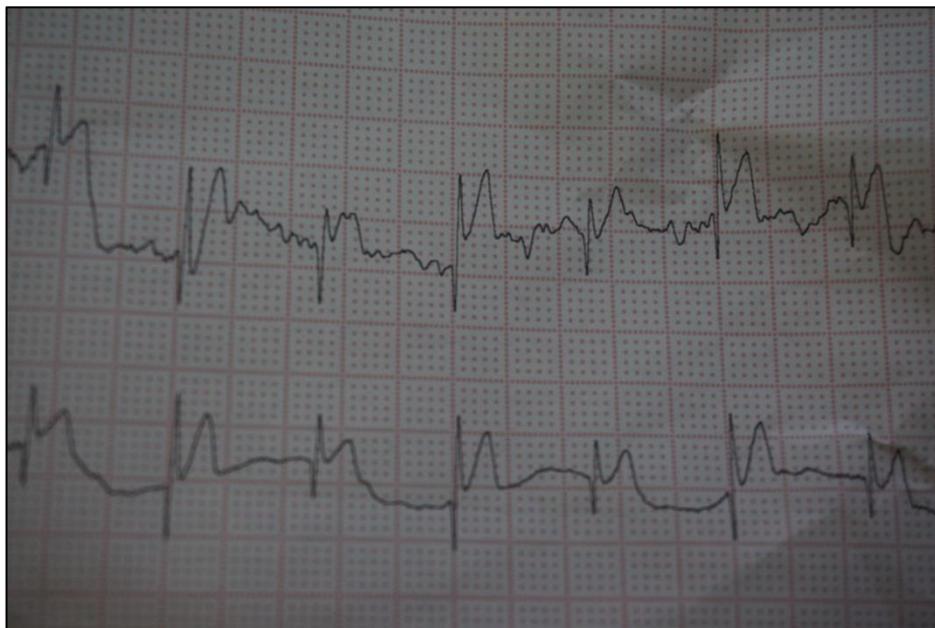


Рис. 13. ЭКГ после перевязки ПМЖА .

Полость перикарда ушивалась нитью пролен 6.0. Выполнялось стандартное ушивание операционной раны.

Средостенье промывали 0,02% водным раствором хлоргексидина биглюконата и санировали, проводили контроль гемостаза. Если в ходе вмешательства была вскрыта левая плевральная полость, то к верхушке устанавливали дренаж из инфузионной системы SFM (SFM Hospital Products GmbH, Berlin), который выводили контрапертурно через разрез кожи у каудального края раны и подшивали, а затем герметично подключали к шприцу, с помощью которого удаляли воздух из плевральной полости. Дренаж извлекали через 2 часа после оперативного вмешательства.

Рану послойно ушивали. Перевязка проводилась 1 раз в день, кожный шов удалялся на 7-10 сутки после операции.

3.2.3. Третья часть эксперимента – стимуляция неоангиогенеза.

Для исследования влияния предлагаемых методик на процессы неоангиогенеза, сформированы 3 группы животных (Рис. 14):

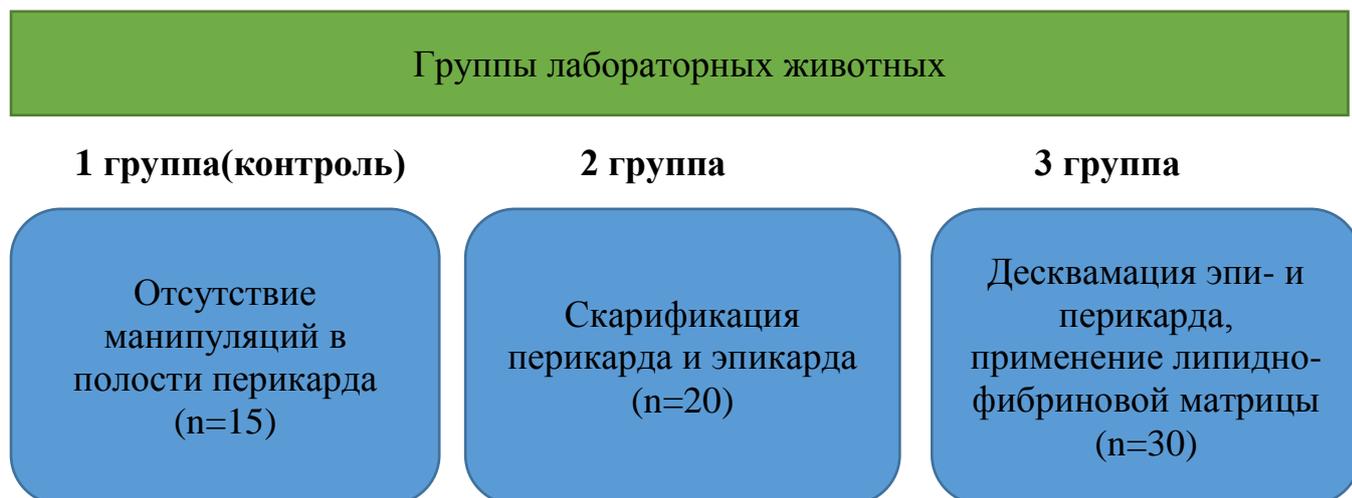


Рис. 14. План исследования

1 группа (15 животных) – контрольная – в полость перикарда вводили стерильный 0,9% раствор хлорида натрия, манипуляций в перикарде не проводили. Выполнялось стандартное ушивание операционной раны.

2 группа (20 животных) – опытная группа – в полости перикарда выполняли скарификацию перикарда и эпикарда. Полость перикарда ушивали нитью пролен 6.0. Выполняли стандартное ушивание операционной раны.

3 группа (15 животных) – опытная группа – в полости перикарда выполняли скарификацию перикарда и эпикарда. Проводили изъятие эпикардального жира с дальнейшим изготовлением липидно-фибриновой матрицы, обогащённой тромбоцитами, и размещением ее в полости перикарда над местом моделирования инфаркта миокарда (Рис. 15-16).

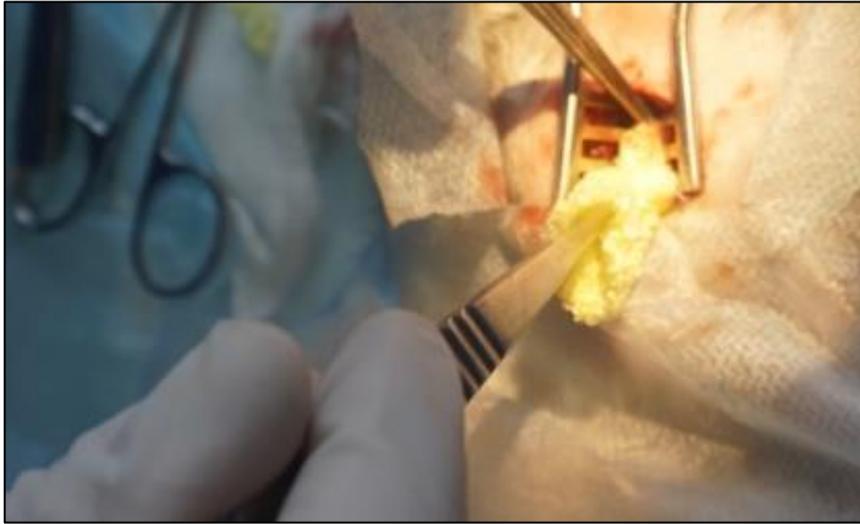


Рис. 15. Десквамация перикарда и эпикарда при помощи инструмента.

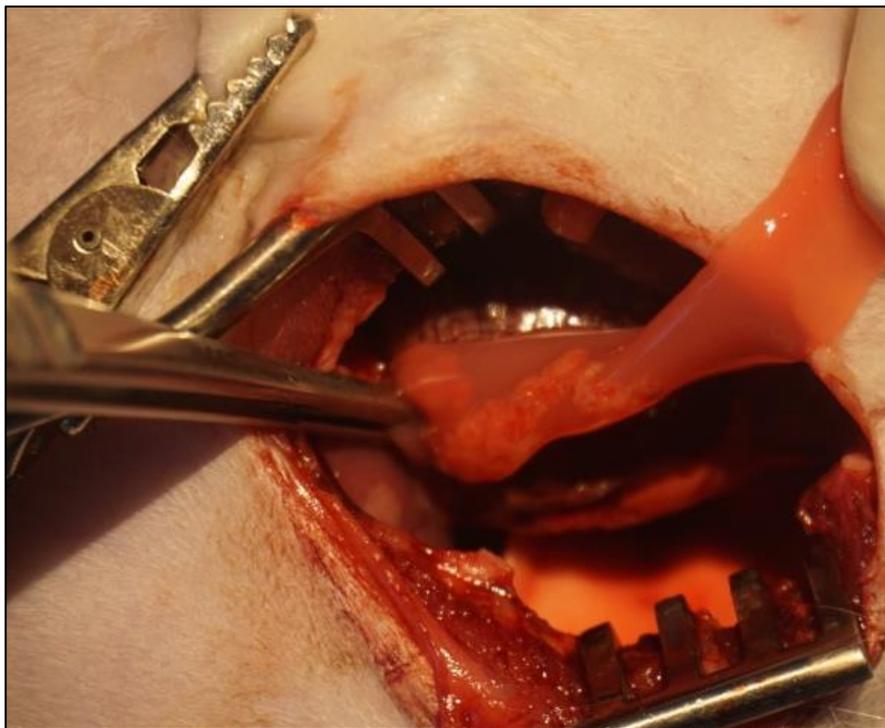


Рис. 16. Размещение липидно-фибриновой матрицы, обогащенной тромбоцитами, в полости перикарда над местом моделирования инфаркта миокарда.

3.2.4. Подготовка обогащённой тромбоцитами плазмы крови.

Перед выполнением второго этапа оперативного вмешательства в пластиковую пробирку с антикоагулянтом (3,8% раствор цитрата натрия) в соотношении 1:9 производили забор крови (Рис. 17).

В среднем, содержание тромбоцитов в цельной крови кроликов составило $410 \pm 78 \times 10^9$ /л. Затем выполняли однократное центрифугирование при 1500 об./мин. в течение 10 мин. И собирали супернатант.

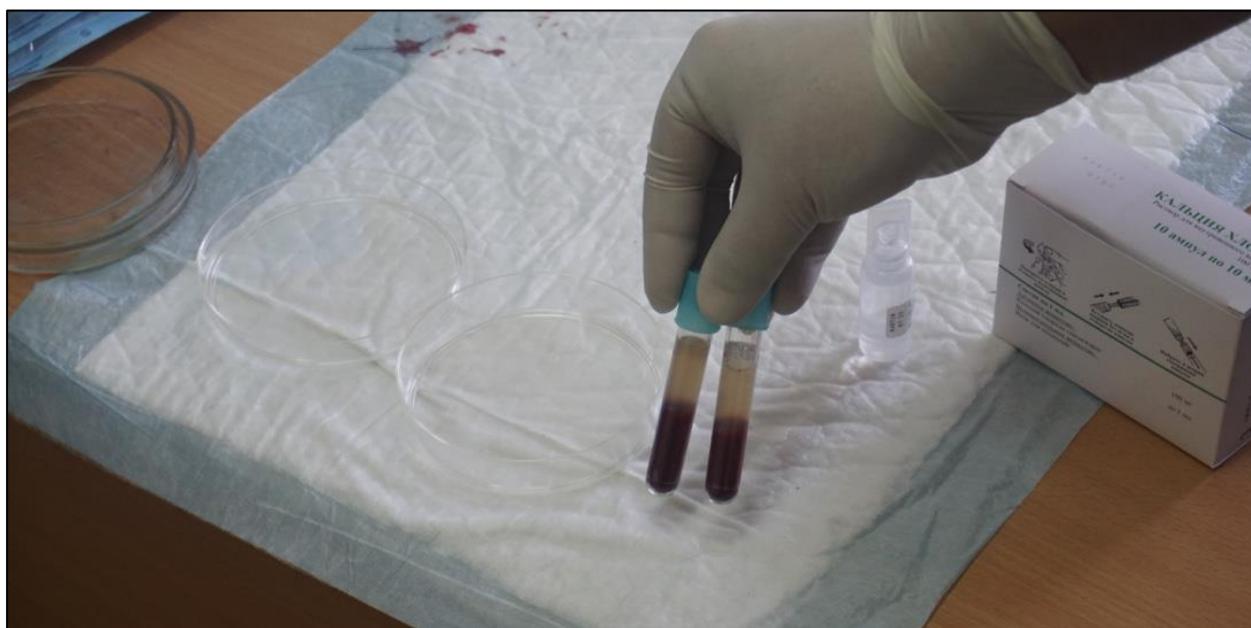


Рис. 17. Кровь лабораторного животного после центрифугирования.

В результате, общее количество тромбоцитов в полученной плазме увеличивалось в 3,8 раз по сравнению с первичными значениями цельной крови - до уровня, в среднем $1553 \pm 35 \times 10^9$ /л, что соответствует категории обогащённой тромбоцитами плазмы.

3.2.5. Методика формирования аутологичной тканевой липидно-фибриновой матрицы, обогащённой тромбоцитами.

Приготовление липидно-фибриновой матрицы состояло из нескольких этапов:

1. Получение периферической венозной крови кролика и добавление к ней раствора цитрата натрия в качестве антикоагулянта;
2. Получение обогащённой тромбоцитами плазмы методом однократного центрифугирования;
3. Активация дегрануляции тромбоцитов плазмы и добавление тканевых аутографтов (аутожира из полости перикарда и окружающих тканей) в плазму по разработанной оригинальной методике;
4. Дегидратация липидного геля.

Для получения обогащённой тромбоцитами плазмы использовали раствор цитрата натрия (пробирки 10 мл Sarstedt MoNovette (Sarstedt) с закрытой вакуумной системой с 3,8% цитрата натрия).

Венепункцию выполняли непосредственно в операционной при помощи катетера Vasofix (B Braun). Диаметр катетера варьировал от 22 G (0,9 мм) до 18 G (1,3 мм), в зависимости от индивидуальных особенностей строения периферической венозной сети. Для соединения вакуумных пробирок с катетером использовали переходник Multi-adapter (Sarstedt).

Для приготовления обогащённой тромбоцитами плазмы использовали стандартную лабораторную центрифугу Heraeus Labofuge 300 (HERAEUS KULZER) с раскачивающимся ротором и максимальным радиусом ротора 14 см, которая находилась непосредственно в операционной. Режим центрифугирования – 15 мин. со скоростью 1500 об./мин. (Рис. 18).



Рис. 18. Лабораторная центрифуга.

Для разделения полученных фракций центрифугата использовали иглы Sterican (BBRAUN) – длиной 120 мм и диаметром 0,8 мм). Плазму из пробирок набирали в шприц (в среднем, из 2 пробирок набирали 5 - 7 мл плазмы). Все технологии получения обогащённой тромбоцитами плазмы связаны с удалением эритроцитов из центрифугата: таким образом, полностью исключается цитотоксическое действие продуктов распада эритроцитов (Рис. 19). Эритроцитарный слой в дальнейшем не использовали.



Рис. 19. Забор плазмы в шприц.

Плазма из пробирок набиралась в шприц (в среднем из 2 пробирок набирали 5-7 мл плазмы). По ходу операции иссекались участки жировой ткани из полости перикарда, окружающих тканей, также частично эпикардальный жир (Рис. 20).

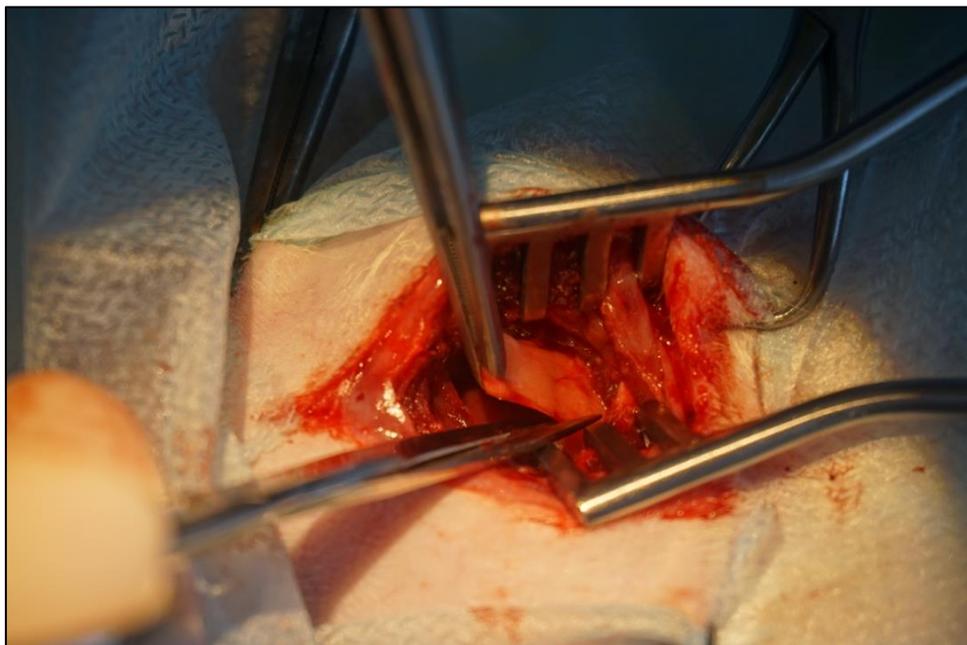


Рис. 20. Изъятие жира из полости перикарда.

Извлечённые фрагменты жировой ткани тщательно гомогенизировали. Для получения липидных микрографтов использовали сосудистые ножницы, позволяющие получать размер графтов от 0,1 до 1 мм. После формирования тканевых микрографтов смешивали их с обогащённой тромбоцитами плазмой в ёмкости с ровной поверхностью (Рис. 21).

Для активации обогащённой тромбоцитами плазмы использовали 10% раствор кальция хлорида в количестве 0,2 мл на 1 мл плазмы.

Следует отметить, что количество полученного аутологичного тканевого липидного матрикса напрямую зависит от количества основных его компонентов: чем больше будет добавлено липидных фрагментов, тем

большую по площади аутологичную тканевую липидно-фибриновую матрицу можно получить.



Рис. 21. Активация плазмы с тромбоцитами 10% CaCl_2 .

Для инициации процесса полимеризации в ёмкость добавляли катализатор - 10% CaCl_2 (из расчёта 0,2 мл раствора на 1 мл плазмы), что приводило к активации каскада свёртывания с образованием фибрина из фибриногена, а также к активации и последующей дегрануляции тромбоцитов.



Рис. 22. Сформированная аутологичная тканевая липидно-фибриновая матрица.

Тромбоциты оказывались захваченными фибриновой сетью. Они высвобождали своё содержимое, стабилизируя свёрток благодаря фибрину, коллагену и клейким гликопротеинам (Рис. 22). Во время дегрануляции тромбоциты высвобождали большое количество веществ, обеспечивающих первичный гемостаз. К таким веществам относятся: серотонин, катехоламины, фибриноген, фибронектин, фактор V, фактор VIII (фон Виллебранда), тромбоксан A_2 , кальций.

Такое же или даже более важное значение имеют высвобождаемые тромбоцитами факторы роста, которые улучшают процессы заживления ран.

Моделирование липидного матрикса выполняли непосредственно в операционной, при этом, в зависимости от целей, фрагменты жировой ткани группировали по центру или по периферии - для придания желаемой формы будущему имплантату.

Дегидратацию проводили в стандартных стерильных чашках Петри путем уплотнения (дегидратации) стерильной марлевой салфеткой, в результате получали прочную эластичную однородную конструкцию, по площади в несколько раз превышающую изначальные липидные фрагменты (Рис. 23).

Измельчённые липидные фрагменты надёжно спаяны между собой нитями фибрин-полимера, что обуславливает особую прочность и эластичность. Можно придать аутотрансплантату желаемую форму и дополнительно уплотнить - для фиксации заданных изменений.



Рис. 23. Подготовка аутологичной тканевой липидно-фибриновой матрицы для имплантации в перикард.

3.3. Полученные результаты и их обсуждение.

В динамике наблюдения у всех животных после первого этапа экспериментальной операции прогрессивно нарастала мышечная масса сердца с максимальным развитием гипертрофии миокарда к 21 суткам после стенозирования восходящей аорты. По результатам ЭхоКГ в этот срок у всех прооперированных кроликов произошло утолщение стенки ЛЖ по сравнению с исходными показателями на 27% ($p < 0,05$) и увеличение его размеров, что

сопровождалось снижением ФВ на 16%, уменьшением КДР и КСР, увеличением скорости кровотока в устье аорты.

В первые минуты после создания стеноза аорты, как в сердце, так и в системе кожной микроциркуляции уровень перфузии и вазомоторная активность микрососудов, а также показатели, характеризующие активные и пассивные механизмы регуляции микрогемодинамики, статистически значимо не различались с исходными значениями. Не было выявлено значимых изменений состояния кожной микроциркуляции и механизмов ее регуляции и через 24 часа после операции.

На 3 сутки после первичного вмешательства наметилась тенденция к увеличению перфузии и вазомоторной активности микрососудов кожных покровов. При этом среди активных механизмов регуляции обнаружено снижение нейрогенного тонуса по сравнению с исходными значениями на 9% ($p < 0,05$), при этом пассивные механизмы оставались на прежнем уровне.

На 7 сутки после операции степень выраженности изученных показателей оказалась максимальной за весь период исследования. Обнаружено увеличение кровенаполнения микроциркуляторного русла кожных покровов и вазомоторной активности микрососудов.

Полученные результаты показали, что выявленное на 7 сутки формирования аварийной гипертрофии миокарда увеличение вазомоторной активности микроциркуляторного русла напрямую связано с активизацией макрогемодинамики.

На 10 сутки после возникновения аварийной гипертрофии миокарда показатели, характеризующие перфузию в кожных покровах, стали снижаться и уже статистически значимо не различались с исходными.

На 21 сутки после стенозирования аорты уровень перфузии и пассивных механизмов регуляции в коже не различались с исходными значениями, однако нейрогенный тонус оставался сниженным на 23% ($p < 0,05$).

Что касается состояния периферического кровообращения в миокарде, то на 21 сутки после формирования аварийной гипертрофии все показатели, характеризующие как перфузию, вазомоторную активность, так и активные и пассивные механизмы регуляции значимо не отличались от исходных.

3.4. Морфологические данные.

Во время второго хирургического этапа макроскопически у 10% лабораторных животных в перикарде определяли незначительный спаечный процесс. В ходе индукции ИМ регистрировали изменения ЭКГ, патогномоничные для ИМ в верхушечной области ЛЖ.

Перед выводом из эксперимента экспериментальных животных выполнено гистологическое исследование материала, полученного от кроликов контрольной группы (Рис. 24).

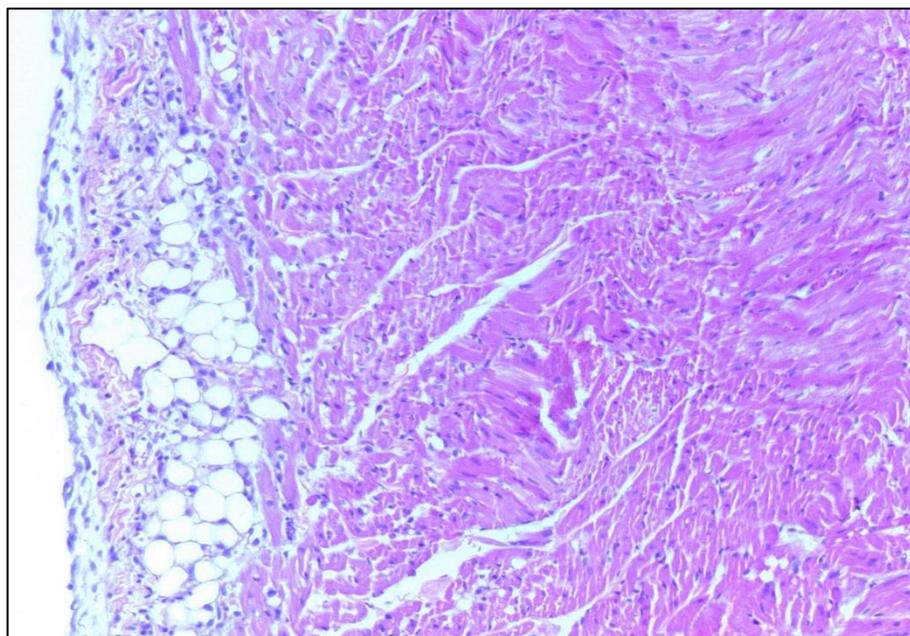


Рис. 24. Гистологический препарат: сердце кролика контрольной группы. Окраска: гематоксилин-эозин. х 400.

Вскрытие животных проводили после двух операций. Визуально наблюдали незначительное исчезновение блеска тканей и минимальное их набухание. Кровоизлияний и более грубых изменений не отмечали. Найдены обширные зоны спаечного процесса между медиастинальной плеврой, перикардом с одной стороны и костальной и стеральной плеврой с другой, а также между эпикардом и перикардом. Определяли спайки светло-серого цвета, относительно рыхлые и достаточно легко поддающиеся разделению, и более плотные спайки бледно-розового цвета (Рис.25).



Рис. 25. Аутопсия кролика. Морфологический препарат: вскрытая грудная клетка. Спаечный процесс в полости перикарда.

В перикардиальной полости отмечено небольшое количество прозрачной серозной жидкости. Эпикард был непрозрачным, без характерного блеска, заметно и неравномерно утолщён.

Участками мезотелий полностью отсутствовал, на поверхности были видны наложения фибрина и соединительнотканые перемычки. Мозаично к десквамации выявлены участки гиперплазии эпикардиального мезотелия как признак эпителиально-мезенхимальной трансформации (Рис. 26).

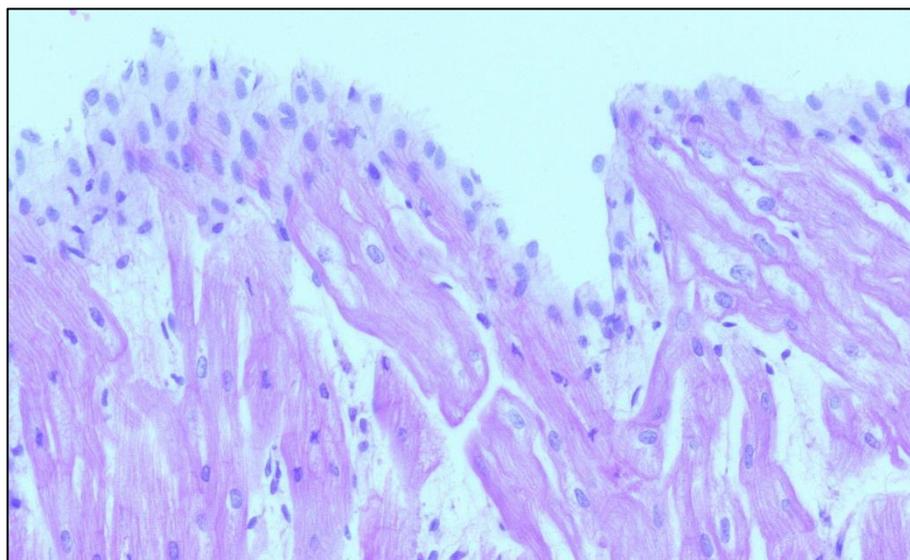


Рис. 26. Гистологический препарат: сердце кролика. Окраска: гематоксилин-эозин. х 400. Гиперплазия мезотелия во 2 и 3 (опытных) группах.

Эпикард был представлен расширенной пластинкой соединительной ткани с редкими сосудами микроциркуляторного русла и обильной диффузной лейкоцитарной инфильтрацией с явным преобладанием сегментоядерных нейтрофилов в инфильтрате. Плотность лейкоцитарного инфильтрата достигала 8000–12000 клеток на 1 мм^2 . Помимо клеток лейкоцитарного ряда определялись фибробласты, преимущественно незрелые, а также волокнистый компонент продуктивного воспаления. На отдельных участках имелись значительные скопления жировых клеток толщиной до 250 мкм. В прилежащих отделах миокарда также имелись признаки умеренной лейкоцитарной инфильтрации. Толщина эпикарда местами достигала 650 мкм. В отдельных случаях активность продуктивного воспаления соответствовала гнойному перикардиту (Рис. 27).

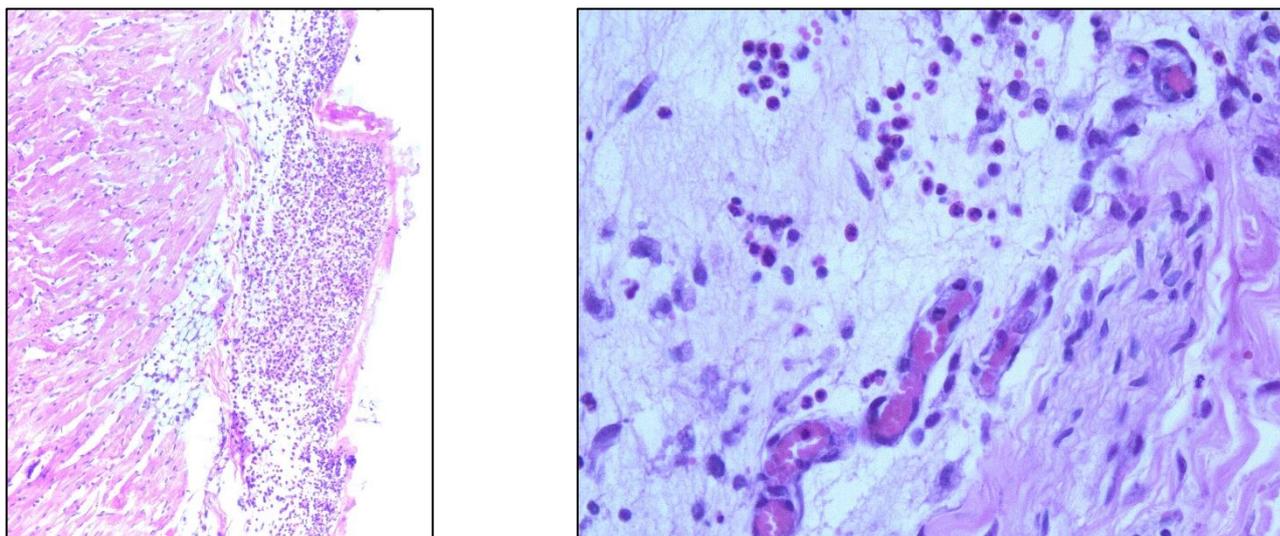


Рис. 27. Гистологический препарат: эпикард кролика. Окраска: гематоксилин-эозин. х 400. Выраженные лейкоцитарная и фибропластическая инфильтрация, полнокровие сосудов, наслоения фибрина на эпикарде как признаки гнойного продуктивного воспаления.

Степень фибробластической перивазальной инфильтрации и объем волокнистых компонентов косвенно свидетельствовали об активном неоангиогенезе в области ИМ (Рис. 28).

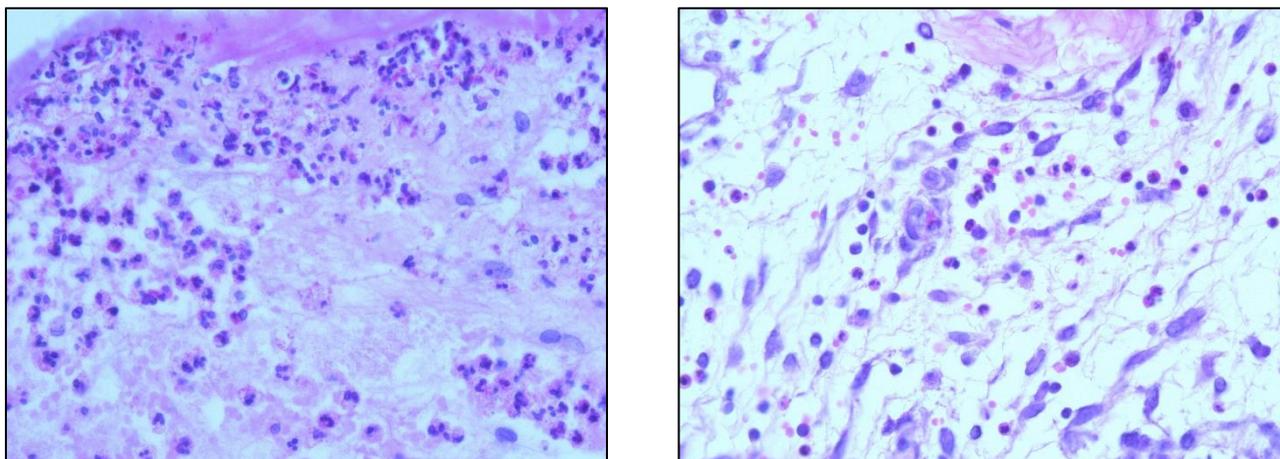


Рис. 28. Гистологический препарат: эпикард и миокард кролика. Окраска: гематоксилин-эозин. х 400. Перивазальная фибропластическая инфильтрация и продукция волокнистых компонентов в эпикарде и миокарде.

При вскрытии сердца: миокард состоял из поперечнополосатых мышечных клеток, формирующих мышечные волокна (Рис. 29).



Рис. 29. Аутопсия кролика. Морфологический препарат: сердце.

Определяется выраженная гипертрофия ЛЖ.

Отдельные кардиомиоциты были умеренно увеличены в размерах, а их ядра укрупнены и содержали относительно мало нитей хроматина. Толщина кардиомиоцитов варьировала от 8 до 14 мкм, толщина их ядер - от 5 до 9 мкм. Поперечная исчерченность миоцитов на отдельных участках была несколько стёрта и как бы распадалась на отдельные мелкие зёрна, равномерно распределённые по цитоплазме клеток. Между кардиомиоцитами определялись незначительные прослойки рыхлой соединительной ткани с многочисленными сосудами капиллярного типа и единичными сегментоядерными нейтрофилами, лимфоцитами, зрелыми и молодыми фиброцитами. Полнокровие капилляров было умеренным.

Эндокард был представлен одним слоем эндотелиальных клеток типичного строения, мышечно-эластическим слоем и стабильно узкой полоской волокнистой соединительной ткани, несколько различающейся по плотности.

При гистологическом исследовании материала в первую очередь изучалась зона ИМ. Во всех группах в центре препарата выявлен очаг некроза кардиомиоцитов, представленный однородной гомогенной структурой. В пограничной зоне – лейкоцитарная инфильтрация и отёк стромы. По периферии препарата – область сформированной соединительной ткани, очаг грануляционной ткани поздней стадии, тонкостенные сосуды, значительное число фибробластов с примесью круглоклеточных элементов.

В опытной группе при гистологическом исследовании выявлялись более выраженные явления воспалительной реакции. Следует отметить, что процессы васкуляризации во 2 группе в отличие от других сопровождались созреванием грануляционной ткани с формированием большого количества полнокровных сосудов и рубца с умеренным количеством фибробластов, аморфного соединительнотканного матрикса с волокнами коллагена. Терминальное сосудистое русло в околоинфарктной зоне достигало максимальной плотности. Причём в опытных группах количество новообразованных сосудов достигало наибольшего значения в сравнении с контрольной серией.

Показатели васкуляризации во всех опытных группах значительно превышали аналогичные в контрольной, при этом в динамике скорость и объём реваскуляризации распределялись от наибольшего в следующем порядке: группа с комплексным воздействием на перикард и эпикард, группа с изолированной скарификацией перикарда и эпикарда, контрольная группа. Максимальные показатели при этом были достигнуты во 2-й опытной группе.

Таким образом, в ходе экспериментального исследования показана возможность стимуляции неоангиогенеза для лечения ИБС (ИМ) у экспериментальных животных. Показатели васкуляризации значительно возрастают при применении методик механической обработки перикарда и эпикарда, а также при использовании липидно-фибриновой матрицы.

3.5. Клиническое исследование реакции перикарда и эпикарда на различные воздействия.

Наблюдения за пациентами, перенёсшими гнойно-септические осложнения (перикардит, медиастинит и др.) в раннем и отдалённом послеоперационном периодах, показали, что большая часть шунтов облитерирована, а с клинической точки зрения пациент отмечает уменьшение интенсивности и частоты приступов стенокардии, регрессию СН и, в общем, улучшение КЖ. В то же время, интраоперационные наблюдения пациентов при лечении перикардитов, операций после развития синдрома Дресслера, когда кардиолиз сопровождался выраженной кровоточивостью листков, как эпикарда, так и перикарда, определялись артериальные сосуды, по которым кровь интенсивно поступала в полость перикарда при их рассечении, натолкнули на мысль, что при соответствующих условиях перикард может являться источником кровоснабжения миокарда. Это заставляет пересмотреть роль неоангиогенеза, вызванного воздействием на перикард и эпикард у пациентов во время операций на открытом сердце. И предположить, что чем больше хирургическая агрессия, тем интенсивнее стимулируются эти процессы в отдалённом периоде. Эти теоретические размышления были высказаны довольно давно, однако, как писал Имре Лакатос: «Решающие эксперименты признаются таковыми лишь десятилетия спустя».

При этом необходимо отметить, что перикардит, развивающийся в послеоперационном периоде после операций на открытом сердце, может иметь в своём основании как разрастание соединительной ткани с последующим формированием «панцирного сердца», так и рыхлой соединительной ткани, содержащей сосуды.

Одной из задач исследования являлось изучение реакции перикарда и эпикарда на различные воздействия внешних факторов с целью минимального

его повреждения (десквамации), активирует неоангиогенез, не приводя при этом к фиброзу. Для этого провели клиническое исследование.

Исследование проходило в клинике грудной и сердечно-сосудистой хирургии им. Св. Георгия, отделении сердечно-сосудистой хирургии НМХЦ им Н.И. Пирогова с января по июнь 2009 г. Случайным образом были выбраны 15 пациентов, поступивших для выполнения хирургической реваскуляризации миокарда. У каждого пациента было получено информированное согласие на проведение исследования.

Выполнялась прямая хирургическая реваскуляризация миокарда. В начале операции после наложения держалок на перикард проводилась его обработка различными внешними раздражителями. В конце операции (через 1,5-2 часа) данную часть перикарда резецировали и изучали гистологические образцы на предмет реакции перикарда.

Использовались следующие методы воздействия на перикард:

- обработка перикарда механическим абразивом;
- обработка перикарда раствором соды, спирта, йода;
- термическое воздействие на перикард (80-100 °С).

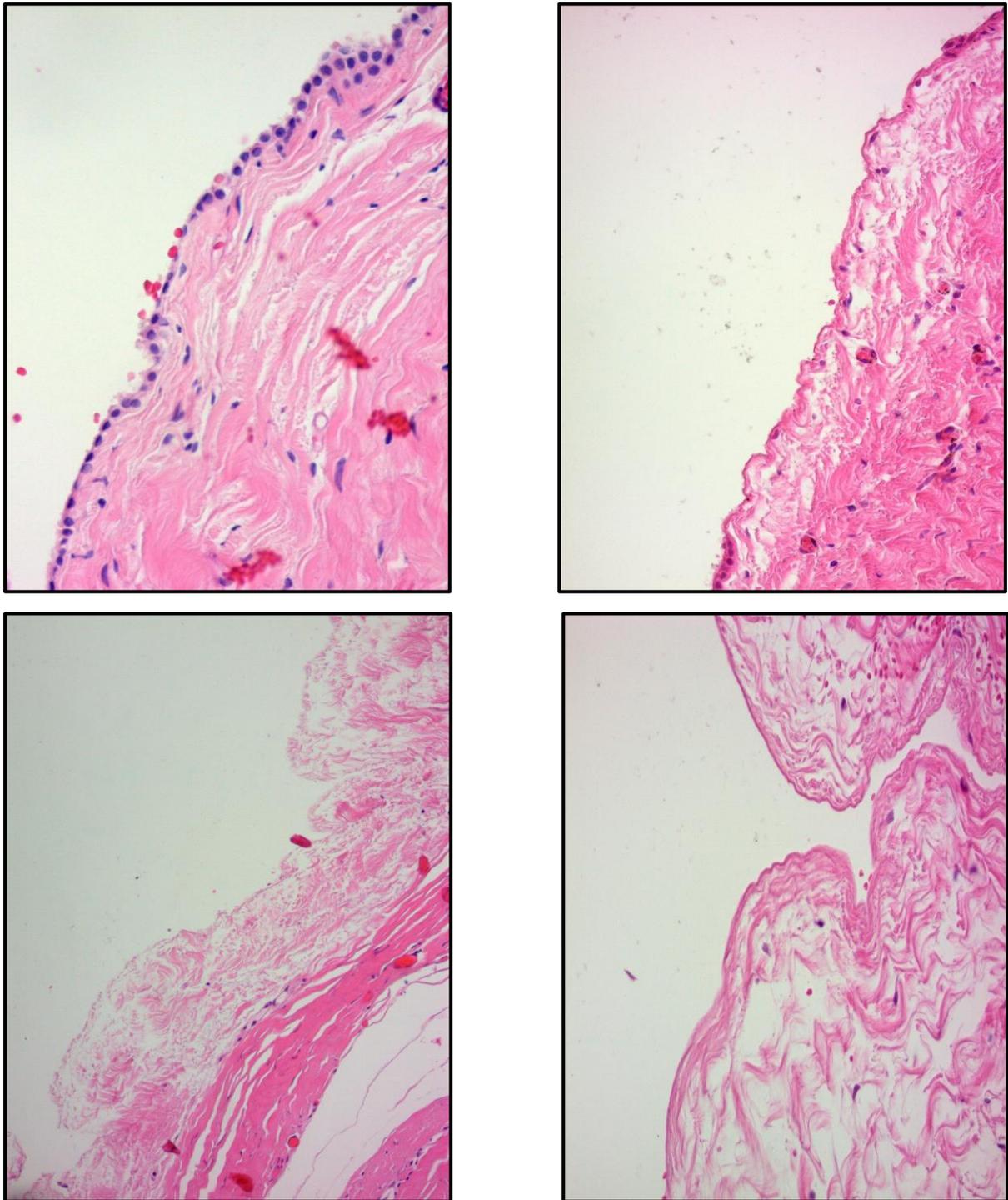


Рис. 30. Гистологическое исследование перикарда (слева сверху – нативный перикард, справа сверху – обработка перикарда механическим абразивом, слева снизу – обработка перикарда раствором спирт-йод, справа снизу – термическое воздействие на перикард). Окраска: гематоксилин-эозин. х 400.

Рассматривая данные гистологического исследования (Рис. 30), были сделаны следующие выводы:

- на гистологических срезах нативного перикарда определяются мезотелиальные клетки по всей его поверхности, сохранённая базальная мембрана;

- на гистологических срезах перикарда, обработанного механическим абразивным материалом, присутствуют мезотелиальные клетки, однако около 50-60% клеток слущены, базальная мембрана сохранена;

- на гистологических срезах перикарда, обработанного химическими (раствор соды, спирта и йода) и физическими (термическое воздействие) факторами – отсутствуют мезотелиальные клетки, поражена базальная мембрана, определяется выраженное повреждение подлежащих тканей.

Основным условием для неоангиогенеза, сопровождающего типичные фазы воспалительного процесса в полости перикарда, является обратимое повреждение пери- и эпикарда с островковым удалением клеток мезотелия без повреждения базальной мембраны. Подобную характеристику повреждения выявили при обработке механическим абразивом. При иных способах обработки создаются преимущественно условия для образования соединительной ткани. Этот эксперимент показал преимущество механического воздействия на перикард и эпикард с целью десквамации клеток мезотелия.

3.5.1. Методы обработки эпикарда и перикарда в клинической практике.

Рассматривая различные механические средства воздействия, нами, наряду со стандартной скарификацией перикарда с помощью скальпеля, была предложена специальная абразивная перчатка (Рис. 31).



Рис. 31. Абразивная перчатка для обработки перикарда и эпикарда

Она надевается поверх стерильной латексной перчатки и позволяет не только осуществлять обработку эпикарда и перикарда во время КШ, но и осуществлять тракции сердца ассистентом с целью создания необходимой экспозиции венечных артерий.

Продолжая разработки в направлении миниинвазивной хирургии, был предложен ряд усовершенствованных инструментов для скарификации перикарда и эпикарда из мини-доступа (Рис. 32).



Рис. 32. Инструментарий для абразивной обработки перикарда и эпикарда из мини-доступа.

Разработанный инструментарий прошёл испытания во время открытых операций. Была показана возможность через субкисфоидальный мини-доступ (в начале исследований 5-6 см, в дальнейшем удалось его уменьшить до 3 см) проводить обработку абразивным материалом всех поверхностей сердца (Рис. 33).

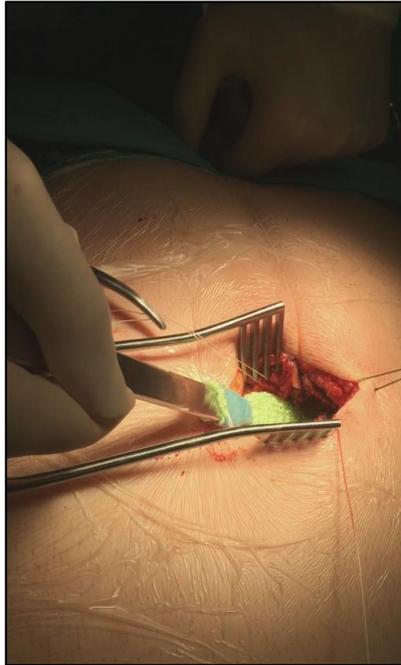


Рис. 33. Этап абразивной обработки перикарда и эпикарда из мини-доступа.

Конечным этапом разработки минимально инвазивного доступа явилось внедрение эндоскопической методики (Рис.34).

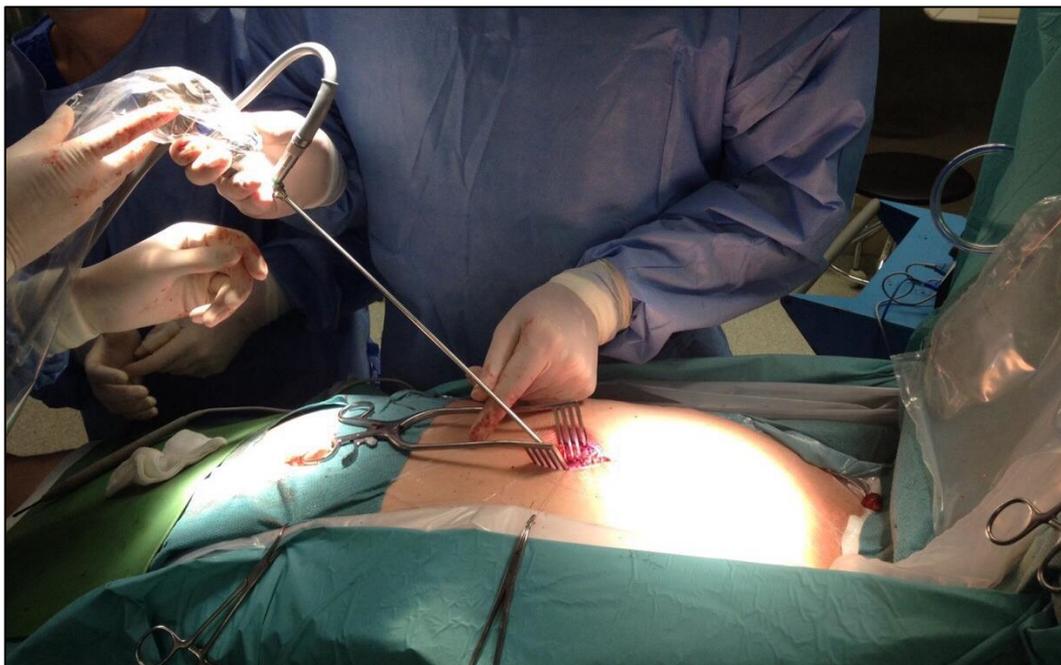


Рис. 34. Эндоскопическая методика абразивной обработки перикарда и эпикарда.

Таким образом, доказано преимущество механического воздействия на перикард и эпикард с целью десквамации клеток мезотелия без повреждения базальной мембраны. Данный способ обработки способствует асептическому воспалению, основополагающей частью которого является неоангиогенез, в послеоперационном периоде операции КШ. Разработанный инструментарий для скарификации перикарда и эпикарда из мини-доступа, успешно прошёл клинические испытания и может быть использован при необходимости выполнения операции миниинвазивным способом.

ГЛАВА IV. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO.

Следующий экспериментальный этап исследования выполняли в клинике. Он был посвящён изучению факторов, стимулирующих ангиогенез у больных ИБС [67]. Для стимуляции прорастания сосудов из перикарда в эпикард и миокард с формированием нового дополнительного источника кровоснабжения сердца, исследование проведено в следующих направлениях:

- выбор и исследование гуморальных факторов роста, способных стимулировать образование новых сосудов при ишемии;
- исследование стволовых клеток, способных как к дифференцировке в эндотелиальные клетки, так и к выделению ростовых факторов, обладающих проангиогенным эффектом;
- получение комплексной субстанции, которую можно использовать при хирургической реваскуляризации миокарда для стимуляции ангиогенеза.

4.1. Источники факторов роста сосудов (VGEF) и пути их получения.

Исследование проходило в клинике грудной и сердечно-сосудистой хирургии им. Св. Георгия, отделении сердечно-сосудистой хирургии НМХЦ им Н.И. Пирогова с марта по июнь 2015 г. В качестве определяемого источника стимуляции неоангиогенеза был выбран фактор роста эндотелия сосудов (VGEF).

Случайным образом были выбраны 22 пациента, поступивших для хирургической реваскуляризации миокарда. Всем больным при поступлении в клинику на основании анамнеза и клинической картины установлен диагноз ИБС, который был подтверждён данными инструментального обследования. У каждого пациента было получено информированное согласие на проведение исследования.

Основную часть составляли пациенты мужского пола, мужчин было 20 (91%), женщин – 2 (9 %).

Во время прямой реваскуляризации миокарда проводилось изъятие и подготовка тканевого материала.

Процедура выполнялась в 3 этапа:

- 1 этап – интраоперационный – включал изъятие и подготовку тканевого материала;
- 2 этап заключался в подготовке проб для проведения дальнейшего анализа белковых компонентов материала;
- 3 этап – лабораторный анализ содержания факторов роста в полученном материале.

Рассмотрим детально этапы проведения процедуры.

1 этап.

У пациента во время КШ проводилось изъятие тканевого аутоматериала:

1. Жировой ткани в области инволютивно изменённого тимуса;
2. Эпикардальной жировой ткани;
3. Участка ЛВГА;
4. Участка перикарда;
5. Фрагмента большой подкожной вены;
6. Фрагмента резецированного ушка правого предсердия.

Все манипуляции осуществлялись в стерильных условиях в операционной.

Изъятие жировой ткани проводилось острым путем с целью предупреждения термического повреждения тканей (Рис. 35).

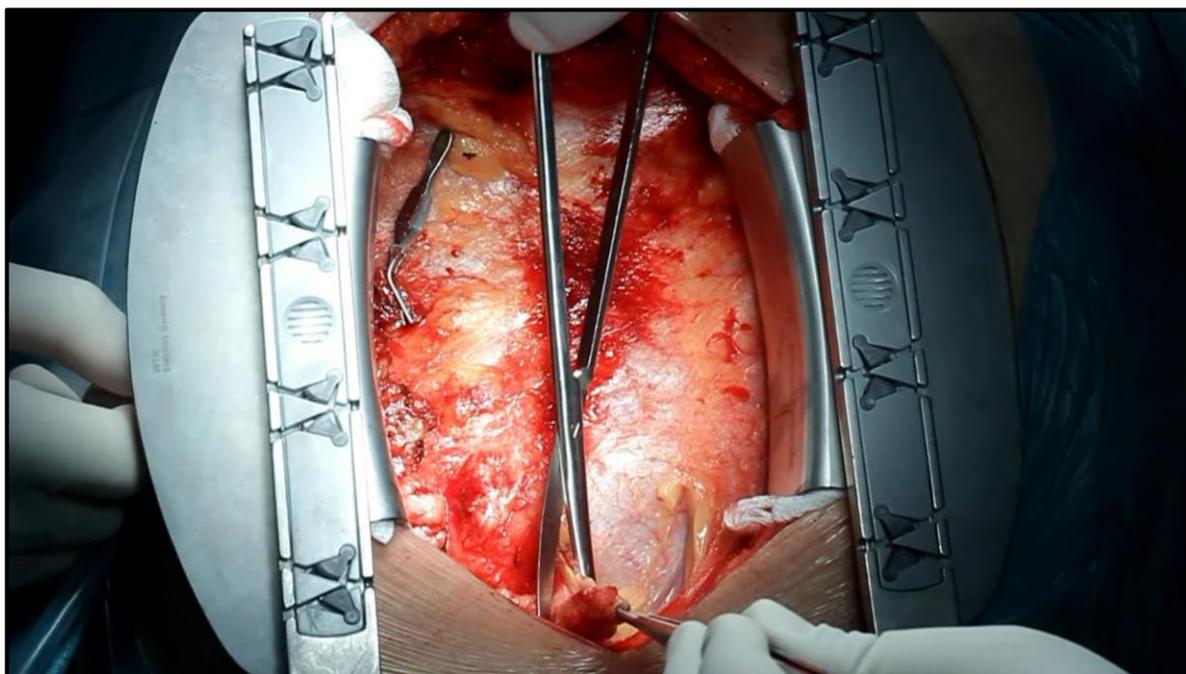


Рис. 35. Изъятие жира в области инволютивно изменённого тимуса

Далее следовал этап подготовки тканевого материала, заключавшийся в его гомогенизации и подготовке к хранению, а также последующем анализе содержимого гомогената. Гомогенизация заготовленного тканевого материала проводилась с использованием острых инструментов (Рис. 36).



Рис. 36. Подготовка (слева) и хранение (справа) материала.

Полученный тканевой гомогенат в стерильных условиях завальцовывали в герметичную упаковку, маркировали и помещали для дальнейшего хранения в специальном боксе с заданными условиями хранения ($t^{\circ}\text{C}$ 2-4 $^{\circ}\text{C}$). При подготовке биоматериала осуществлялся бактериологический и цитологический контроль стерильности полученных тканей.

2 этап

В лабораторных условиях материал готовили для исследований. Выделение белка из материала проводилось с помощью реактивов набора ReadyPrep™ Protein Extraction Kit производство Bio-Rad (Рис. 37).



Рис. 37. Набор для экстракции белков (ReadyPrep™ Protein Extraction Kit).

3 этап

Учитывая, что VEGF - это стресс индуцированный белок, его регуляция сравнивается с другими кислород - и глюкозорегулируемыми белками, поэтому физиологический и ростовой ангиогенез можно рассматривать как адаптационный ответ на дефицит кислорода. Исходя из этого, было принято решение оценить влияния гипоксии на материал пациентов, в связи с этим он (на данном этапе исследовался только материал аутожира, в области

инволютивно изменённого тимуса у 12 пациентов) хранился при $t^{\circ}\text{C}$ 2-4 $^{\circ}\text{C}$ и подготовка материала для лабораторного исследования проводилась на 1, 2, 3 сутки от забора.

Для исследования содержания факторов роста в материале был выбран иммунофлуоресцентный метод (Рис.38)



Рис. 38. Набор реактивов для иммунофлуоресцентного исследования VEGFобщ (Bio-Rad).

Принцип метода иммунофлуоресцентного анализа

Набор реактивов предназначен для количественного определения человеческого васкулоэндотелиального фактора (VEGF общ). Технология Lumineх xMAP допускает одновременный анализ нескольких параметров. Принцип метода подобен иммуноферментному анализу (сэндвич-метод), но антитела не адсорбированы в лунках планшета, а ковалентно соединены с окрашенными сферами. После инкубации образцов со сферами происходит связывание VEG, на поверхности сфер. После инкубации несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Добавляемые биотинилированные моноклональные анти-VEGF антителами. После инкубации и промывки из лунок удаляются не связавшиеся меченные биотином антитела. Визуализация происходит при добавлении раствора стрептовидин-фекоретрин. Определение концентрации происходит чтением флуоресценции двумя видами лазера поочередно. Определяется окраска сферы. Данное качество позволяет

анализировать в одной лунке до 17 параметров и количество связанного белка. Концентрация VEGF в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 8 приготовленным разведениям стандарта.

4.2. Полученные результаты и их обсуждение.

Необходимо отметить, что иммунофлуоресцентным методом определялось суммарное содержание VEGF в исследуемом материале, включая все его фракции.

При анализе содержания VEGF в различных тканевых материалах были получены следующие данные (Рис. 39).

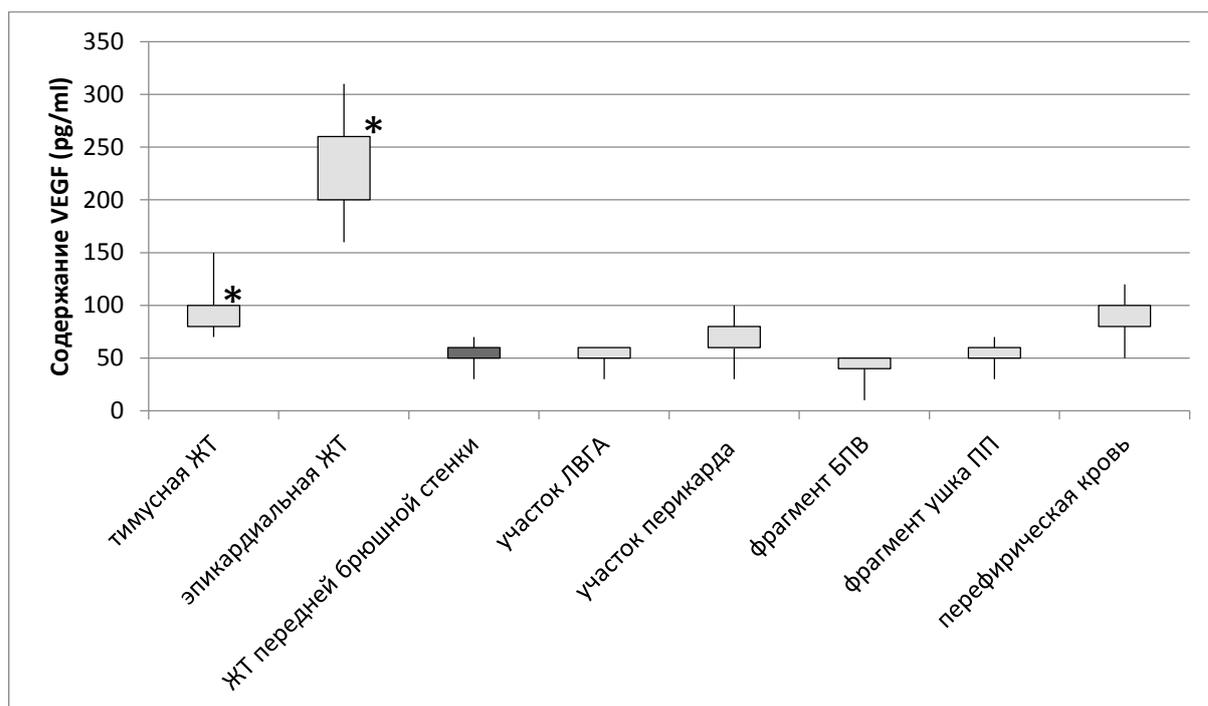


Рис. 39. Содержание VEGF в различных тканевых материалах (опытная группа) * $p < 0.05$.

При сравнении полученных результатов с контрольной группой, в которой отсутствовала ИБС, а, следовательно, и дефицит кровоснабжения сердечной мышцы (и другие заболевания, причиной которых является ишемия),

выявлено, что показатели содержания VEGF в контрольной группе, как в периферической крови, так и в исследуемых тканях, находится на довольно низком уровне ($p < 0.05$) (Рис. 40).

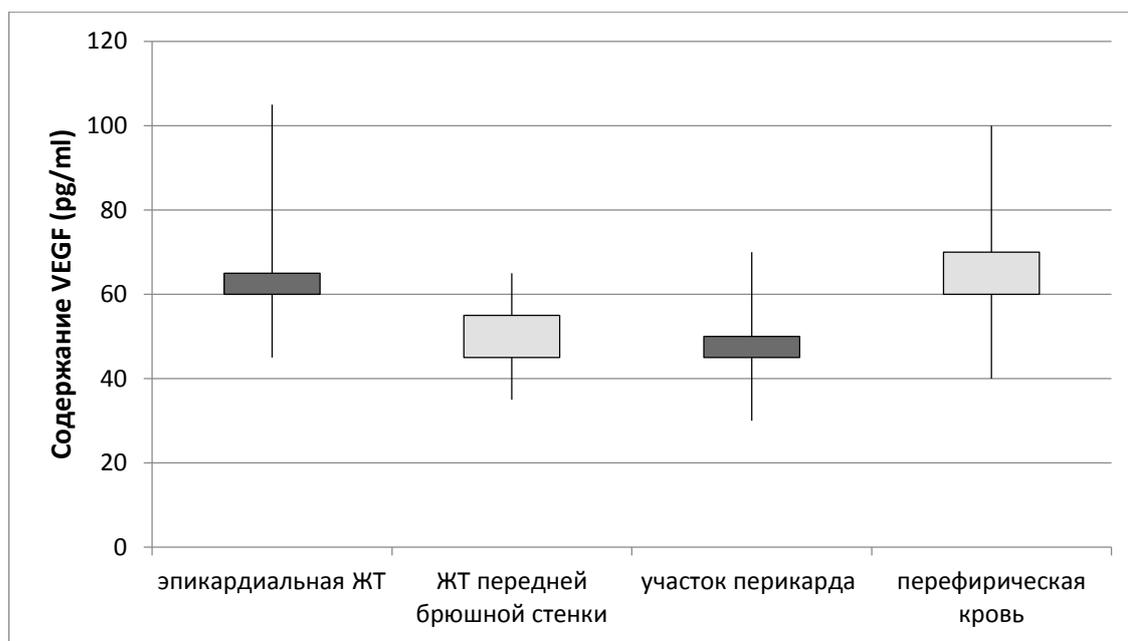


Рис. 40. Содержание VEGF в различных тканевых материалах (контрольная группа).

Полученные результаты коррелируют с данными литературы. Наибольшую концентрацию VEGF выявили при исследовании ткани эпикардального жира ($p < 0.05$). В жировой ткани области инволютивно изменённого тимуса содержание VEGF было больше, чем в периферической крови ($p < 0.05$), однако меньше, чем в ткани эпикардального жира ($p > 0.05$). Во всех остальных тканях содержание факторов роста эндотелия было существенно меньше ($p < 0.05$).

При анализе содержания VEGF в материале аутожира в области инволютивно изменённого тимуса на 1, 2, 3 сутки от забора были получены следующие данные (Рис. 41).

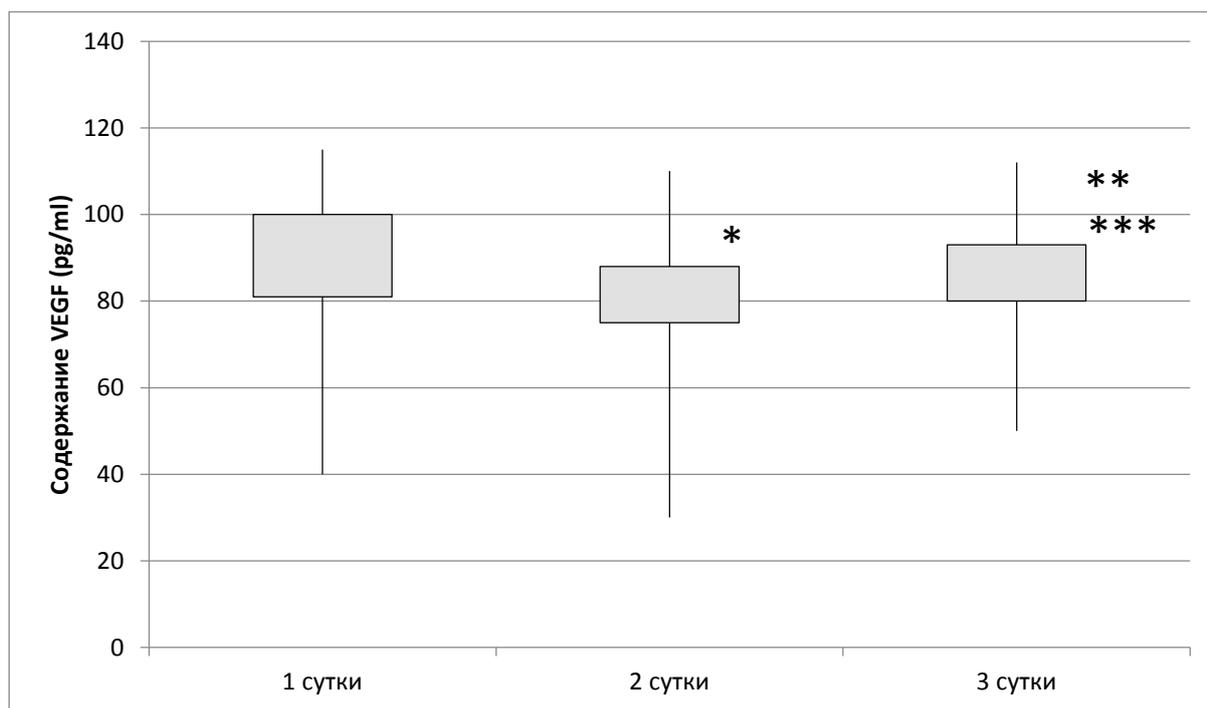


Рис. 41. Содержание VEGF в материале аутожира в области инволютивно изменённого тимуса (опытная группа) * $p=0.17$ (1 и 2 сутки) ** $p=0.74$ (2 и 3 сутки) * $p=0.09$ (2 и 3 сутки).**

Средние концентрации составили $90,17 \pm 6,61$ pg/ml при обработке материала на 1-е сутки и $83,61 \pm 5,25$ pg/ml и $87,04 \pm 3,25$ pg/ml на 2-е и 3-и сутки, соответственно. При индивидуальном анализе тенденций к изменению концентрации факторов роста в течение 3 суток никаких стабильных тенденций не выявлено ($p > 0.05$). Все изменения колеблются в пределах погрешности теста, что позволяет сделать предположение об относительной постоянности концентрации фактора роста в материале. Данный факт позволяет сделать предположение, о возможности использования материала как депо, из которого будет постепенно высвобождаться фактор роста.

Проанализированы результаты определения концентрации VEGF в периферической крови, в отделяемом по дренажам после КШ у пациентов опытной группы. Выявлено, что концентрация VEGF в жидкости, выделяемой по дренажам, превосходит концентрацию данных факторов в периферической

крови ($p < 0.05$). При этом интраоперационные данные (до выполнения реваскуляризации) и послеоперационные также значительно отличались в сторону увеличения концентрации VEGF после проведённой операции ($p < 0.05$) (Рис. 42).

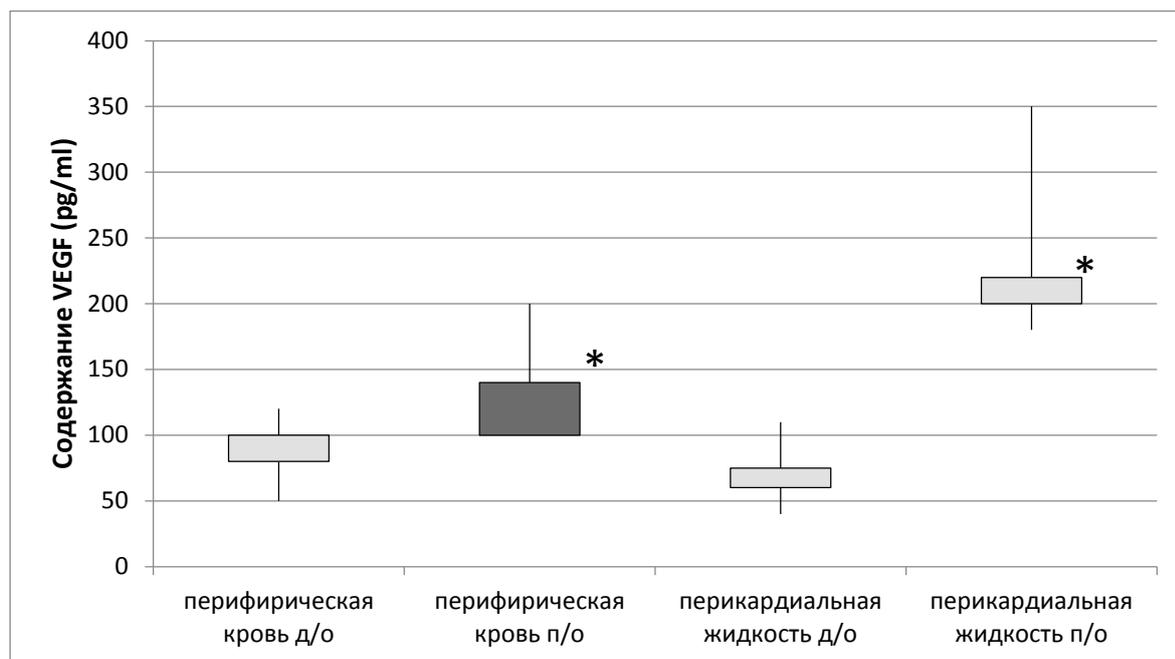


Рис. 42. Содержание VEGF в различных тканевых материалах (контрольная группа) * $p < 0.05$.

Ввиду того, что в жидкости, выделяемой по дренажам после КШ, наряду с белковыми фракциями, содержатся форменные элементы крови и их фрагменты, была предпринята попытка их отделения центрифугированием и увеличения общего количества фактора роста в заданном объёме – 75-100 мл (Рис. 43 А-Б).



Рис. 43. Отделяемое по дренажам -А, центрифуга - Б.

В результате проводимых манипуляций был получен концентрат. Измерено общее количество VEGF в полученном концентрате иммунофлуоресцентным методом. Установлено, что концентрация VEGF до центрифугирования в образцах составляла $289 \pm 20,44$ pg/ml, после центрифугирования $216 \pm 6,44$ pg/ml ($p > 0.05$), а общее количество раствора уменьшилось с $406 \pm 31,2$ мл до $116 \pm 8,8$ мл ($p < 0.05$).

Таким образом, предложенный метод позволяет уменьшить количество получаемой жидкости с сопоставимой концентрацией фактора роста эндотелия, что в дальнейшем может быть использовано при разработке методов терапевтического ангиогенеза.

Таким образом, выявлено, что у пациентов с ИБС в тканях организма содержится VEGF, причём наибольшая его концентрация определялась в жировой ткани эпикардального жира. Второе по значимости депо находится в ткани инволютивно изменённого тимуса.

При анализе стабильности данного фактора в течение 3 суток выявлено, что содержание данного белка не меняется в этот период, что может говорить о возможности использования жировой ткани для доставки и поддержания

постоянной концентрации фактора роста в зоне ишемии. Определено, что в данной ткани все фракции VEGF содержатся в относительно равном количестве, что говорит о более комплексном их влиянии на процессы ангиогенеза.

Полученные результаты позволяют предложить применение ткани эпикардального жира и ЖТ инволютивно изменённого тимуса, как источника факторов стимуляции неоангиогенеза у пациентов с ИБС во время проведения реваскуляризации миокарда. Особого внимания заслуживает возможность использования жидкости, отделяемой по дренажам после КШ.

4.3. Исследование жировой ткани различной локализации для качественного и количественного определения МСК.

МСК являются одним из самых удобных для использования типом стволовых клеток взрослого организма, так как они, с одной стороны, могут быть легко выделены из разнообразных тканей: костного мозга, жировой ткани и периферической крови, а с другой стороны, их достаточно легко размножить в клеточной культуре и, при необходимости, дифференцировать в различные виды клеток. Данный тип клеток не только способен дифференцироваться в кардиомиоциты, но и обладает выраженным паракринным эффектом – они выделяют многочисленные цитокины и ростовые факторы, стимулирующие выживание, рост и дифференцировку других клеток в зоне ИМ, включая резидентные сердечные стволовые клетки.

МСК характеризуются многочисленными фенотипическими характеристиками. Минимальный общий критерий для определения МСК человека был определён Комитетом по мезенхимальным и стволовым клеткам Международного Сообщества Клеточной Терапии (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee, International Society for Cellular Therapy) для удобства сопоставления данных, полученных различными исследователями, для

ускорения появления новых научных открытий, а также для поддержки развития новых методов клеточной терапии. Комитет предложил, что МСК должны быть характеризованы:

1) адгезией к пластику при соблюдении стандартных условий культивирования;

2) способностью к дифференцировке в остеобласты, адипоциты, хондроциты в условиях *in vitro*;

3) после культивирования МСК позитивно окрашены по следующим поверхностным антигенам: CD73, CD90 и CD105 и негативно по CD45, CD34, CD14 и CD11b, CD79a или CD19 и HLA-DR. Набор MSC Phenotyping Kit позволяет проводить быстрое, лёгкое и надёжное фенотипирование культивированных МСК, основываясь на стандартах, определённых ISCT.

Учитывая такие перспективы использования МСК в лечении пациентов с ИБС, было проведено исследование по поиску источника данных клеток в организме человека, который отвечал бы следующим характеристикам:

1. Доступность ткани для выделения во время операции на открытом сердце;
2. Возможность измельчения ткани;
3. Длительность хранения ткани с отсутствием негативного воздействия внешней среды на клеточные элементы.

Исследование проходило в клинике грудной и сердечно-сосудистой хирургии им. Св. Георгия, отделении сердечно-сосудистой хирургии НМХЦ им Н.И. Пирогова с июня по сентябрь 2015 г.

Случайным образом были выбраны 20 пациентов, поступивших для хирургической реваскуляризации миокарда. Всем больным при поступлении в

клинику на основании анамнеза и клинической картины был установлен диагноз ИБС, который был подтверждён данными инструментального обследования. У каждого пациента было получено информированное согласие на проведение исследования.

Основную часть составляли пациенты мужского пола, мужчин было 18 (90%), женщин – 2 (10 %).

Во время прямой реваскуляризации миокарда проводился забор и подготовка тканевого материала.

Процедура выполнялась в 3 этапа:

1 этап – интраоперационный – включал изъятие и подготовку тканевого материала;

2 этап заключался в подготовке клеточной суспензии;

3 этап – культивирование клеток и определение количества клеток в единице объёма выделенного тканевого материала.

Рассмотрим детально этапы проведения процедуры.

1 этап.

У пациента во время выполнения КШ производилось изъятие тканевого аутоматериала:

1. Жировой ткани в области инволютивно изменённого тимуса;
2. Жировой ткани эпикарда;
3. Жировой ткани передней брюшной стенки.

Все манипуляции осуществлялись в стерильных операционных условиях.

Изъятие жировой ткани проводилось острым путем с целью предупреждения термического повреждения тканей.

Дальнейшие манипуляции основаны на патенте «Способ получения культур мезенхимальных стромальных клеток человека, выделенных из липоаспирата».

2 этап.

Процесс приготовления клеточной суспензии:

1. Механическое измельчение кусочков жировой ткани или использование липоасpirата (Рис. 44).



Рис. 44. Механическое измельчение кусочков жировой ткани

2. Промывка раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) при комнатной температуре (Рис. 45).



Рис. 45. Промывка измельченной жировой ткани раствором фосфатно-солевого буфера.

3. Проводилась энзиматическая дезагрегация фрагментов тканей с помощью раствора Accutase™ Cell Detachment Solution:

- добавлялся раствор до полного погружения образца в него;
- инкубировался при 37°C в течение 5-10 минут (до 30 минут) до полной дезагрегации ткани.

4. Проводилась нейтрализация раствора для дезагрегации путем добавления стандартной клеточной среды с FBS (Stain Buffer (FBS)).

5. Выполнялся контроль выделения единичных клеток с помощью микроскопии аликвоты приготовленного образца (Рис. 46).

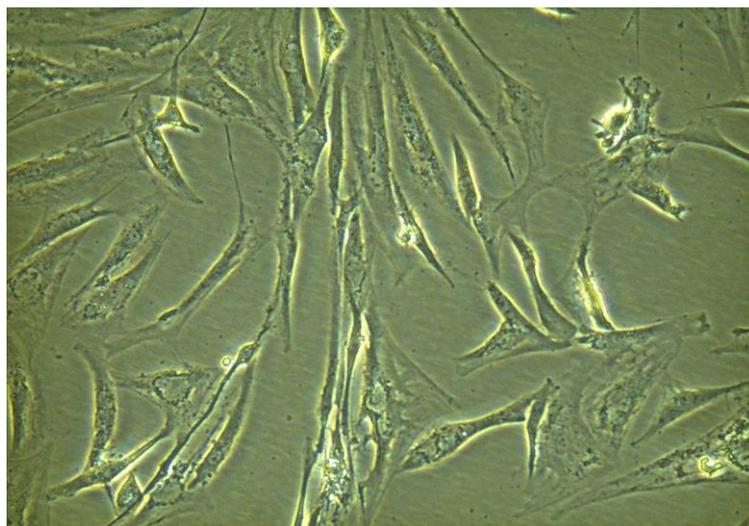


Рис. 46. Контроль выделения единичных МСК-ЖТ с помощью микроскопии аликвоты приготовленного образца (культура выделенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, x800).

6. Проводилось центрифугирование при 1200 g в течение 10 минут при комнатной температуре, удаление супернатанта.

7. Выполнялось ресуспендирование клеточного осадка в растворе Lysing Solution для лизиса эритроцитов. И в последующем инкубация в течение 10 минут.

8. Отмывался осадок от лизирующего раствора: центрифугирование в том же режиме, удаление супернатанта, ресуспендирование клеточного осадка в растворе Stain Buffer (FBS) (Рис. 47).



Рис. 47. Полученный после центрифугирования раствор (отмечается разделение слоев лизирующего раствора, жировой суспензии и клеточного материала).

9. В заключении проводилась фильтрация через нейлоновый фильтр с диаметром отверстий пор 100 мкм (Рис. 48).

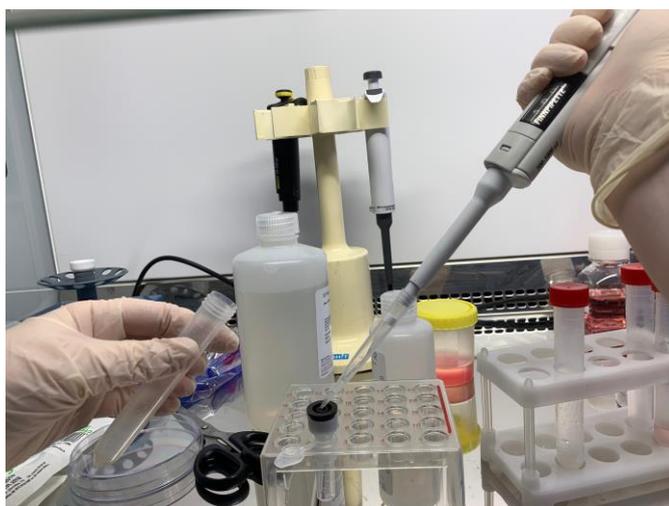


Рис. 48. Фильтрация полученного клеточного материала через нейлоновый фильтр.

3 этап.

Одним из критериев СМК считается их адгезия к пластику при соблюдении стандартных условий культивирования. Поэтому перед проведением иммунофлуоресцентного окрашивания проводилось культивирование клеток:

1. Инкубирование выделенных клеток (Рис. 49) во флаконах в культуральной среде ДМЕМ, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1% гентамицина и амфотерицина в CO₂-инкубаторе (37⁰С, 5%CO₂).

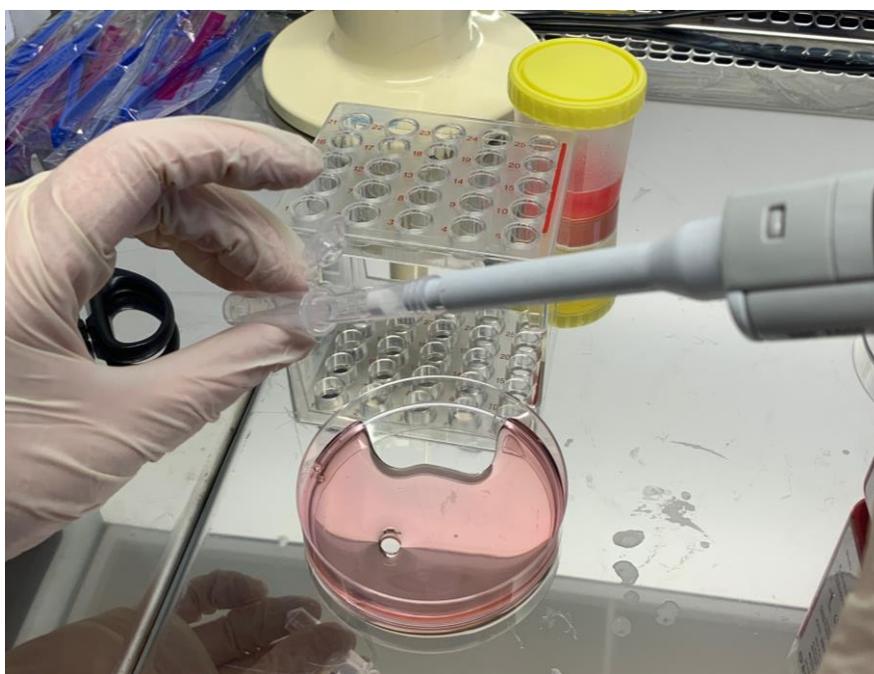


Рис. 49. Инкубирование выделенных клеток в культуральной среде.

2. Отмывка раствором PBS для удаления неприлипших клеток.
3. Культивирование прилипших клеток в той же среде в тех же условиях до достижения субконфлюентного состояния (для предотвращения спонтанной дифференцировки клеток). Снятие клеток с помощью раствора Accutase™ Cell Detachment Solution, 561527.
4. Выполнение нескольких пассажей.
5. Отмывка клеток от культуральной среды раствором Stain Buffer (FBS) и ресуспендирование до концентрации $1 \cdot 10^7$ клеток/ мл.

6. Иммунофлуоресцентное окрашивание специфическими МАТ.

При анализе содержания МСК в жировой ткани у пациентов с ИБС, были получены следующие данные (Рис. 50).

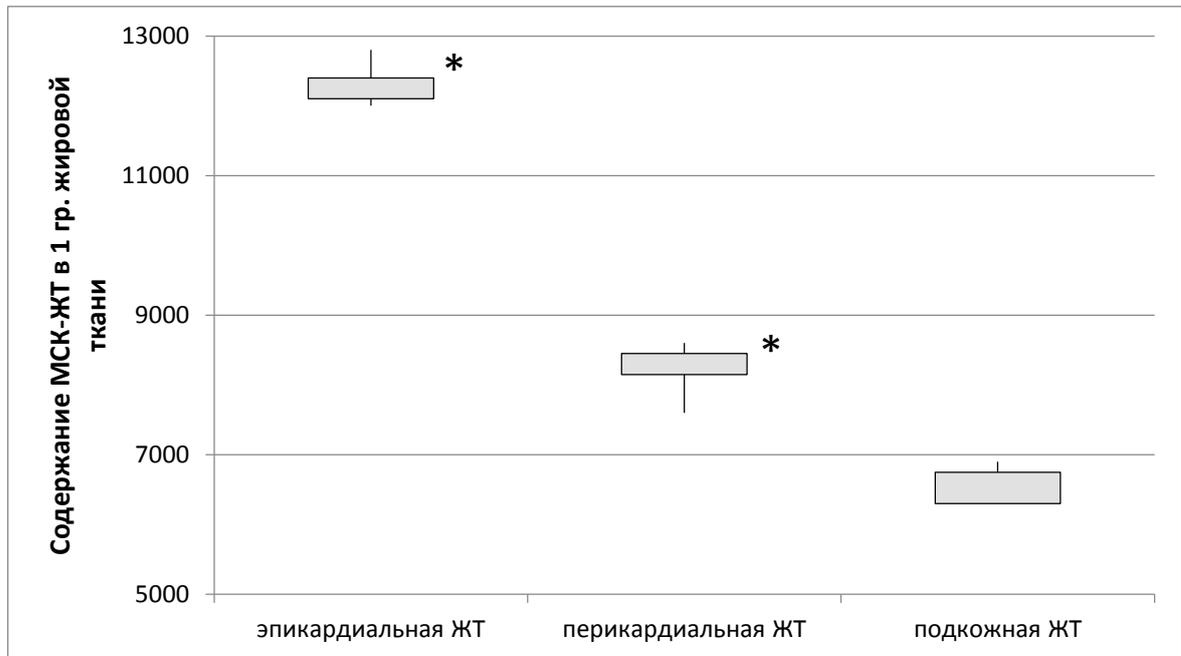


Рис. 50. Содержание МСК в различных тканевых материалах. * $p < 0.05$.

При анализе содержания МСК в жировой ткани у пациентов с ИБС выявлено, что наибольшее количество клеток определяется в эпикардальной жировой ткани (в последующем это наблюдение повлияло на методику скарификации эпикарда с помощью скальпеля), вторым по количеству депо явилась перикардальная жировая ткань. Содержание МСК в подкожной жировой ткани находилось на уровне 6000 клеток в 1 г жировой ткани.

4.4. Разработка липидно-фибриновой матрицы как источника МСК и стимуляторов неоангиогенеза.

Таким образом, в ходе проведённых исследований удалось создать в перикарде необходимые условия для неоангиогенеза: имеется гипоксия ввиду

наличия диффузного атеросклеротического поражения коронарного русла и отсутствие полной реваскуляризации миокарда, механическая обработка эпикарда и перикарда создают условия для асептического воспаления, концентрации факторов роста, повреждения микрососудов и начала фазы пролиферации, одним из этапов которой является сосудообразование. Для комплексного поддержания и усиления процессов неоангиогенеза и репарации кардиомиоцитов было решено разработать и внедрить в клиническую практику субстанцию, отвечающую следующим требованиям:

1. Содержать достаточное количество факторов роста сосудов (в частности VGEF);
2. Содержать необходимое количество МСК-ЖТ;
3. Длительно выделять многочисленные цитокины и ростовые факторы, стимулирующие выживание, рост и дифференцировку других клеток в зоне ИМ;
4. Быть пластичной и с возможной функцией фиксации – для размещения в полости перикарда;
5. Быть аутологичной.

При разработке субстанции были использованы как данные литературы, так и собственные разработки, и исследования. В качестве необходимого жидкого компонента, который при обработке превращался бы в гелеподобную основу, была выбрана аутологичная плазма, обогащённая тромбоцитами.

Ранее в НМХЦ им. Н.И. Пирогова фибриновая матрица была разработана и применена Епифановым С.А., однако областью применения являлась пластическая хирургия носа, и в процессе ее приготовления основой явился гомогенизированный хрящ.

В качестве источника МСК-ЖТ выбран перикардальный жир. При этом фрагменты жировых клеток и тканевых комплексов защищены от аутолиза и

фагоцитоза аутологичными фибриновыми плёнками, содержащими тромбоциты, которые дополнительно выделяют большое количество факторов роста, запускающих каскад процесса реваскуляризации.

Протокол приготовления фибринового матрикса

Протокол приготовления фибринового матрикса состоит из нескольких этапов:

1. Получение периферической венозной крови (Рис. 51);



Рис. 51. Получение периферической венозной крови.

2. Добавление раствора цитрата натрия, как антикоагулянта (Рис. 52);



Рис. 52. Добавление раствора цитрата натрия, как антикоагулянта.

3. Получение обогащённой тромбоцитами плазмы методом однократного центрифугирования (Рис. 53);



Рис. 53 Получение обогащённой тромбоцитами плазмы методом однократного центрифугирования.

4. Добавление тканевых аутографтов (аутожира) в полученную обогащённую тромбоцитами плазму и активация дегрануляции тромбоцитов (Рис. 54);



Рис. 54. Добавление тканевых аутографтов (аутожира) в полученную обогащённую тромбоцитами плазму и активация дегрануляции тромбоцитов.

5. Лиофилизация тканевого лейкоцитарно-тромбоцитарно-фибринового геля (Рис. 55).



Рис. 55. Лиофилизация тканевого лейкоцитарно-тромбоцитарно-фибринового геля.

Обогащённая тромбоцитами плазма - простой, дешёвый и миниинвазивный способ получения естественной концентрации аутологичных факторов роста.

Согласно данным ряда авторов после формирования обогащённой тромбоцитами плазмы тромбоциты начинают выделять гуморальные факторы роста в максимальной концентрации в течение 1 часа после их активации. После встраивания кровяных пластинок в фибриновую сеть матрикса, они продолжают секретировать биологически активные агенты более 7 суток. При этом они активируют внутриклеточные сигнальные пути, индуцирующие механизмы репарации ткани, в основе которых – пролиферация и дифференциация клеток, синтез компонентов межклеточного матрикса. Ключевую роль в данных процессах играют такие факторы, как VEGF, PDGF, TGF, IGF, EGF [264,20].

Получение концентрата тромбоцитов регламентировано «Инструкцией по фракционированию консервированной крови на клеточные компоненты и плазму» (утв. Минздравом СССР 11.06.1987 № 06-14/24; Постановлением Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии»; «Руководством по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови» (Совет Европы, 2011, 16-е издание).

Микроскопическое исследование полученного матрикса после активации процесса дегрануляции тромбоцитов с использованием 10% раствора кальция хлорида.

При микроскопии матрикса выявляется большое количество фибриновых нитей и единичные форменные элементы крови (Рис. 56).

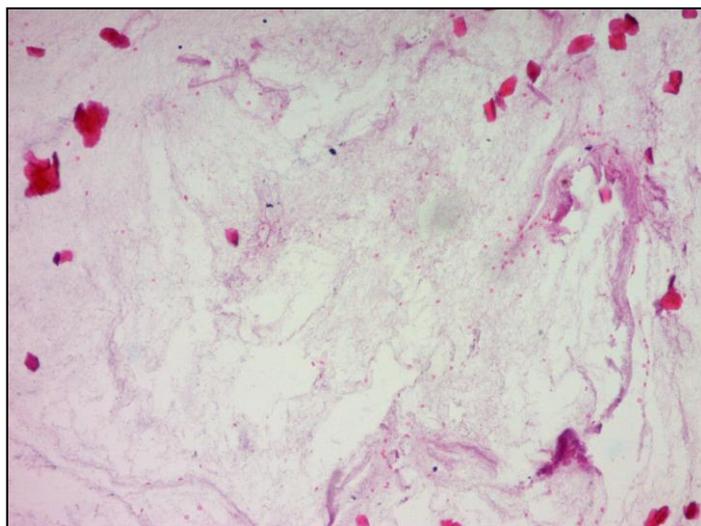


Рис. 56. Тромбоцитарно-фибриновый гель (окраска гематоксилин-эозин, х 400).

После лиофилизации геля мы получали мембрану, которую подвергали морфологическому исследованию.

Микроскопическая картина характеризовалась наличием упорядоченных, плотно расположенных нитей фибрина с включёнными единичными форменными элементами крови. При увеличении $\times 400$ мембрана напоминает по строению кристаллическую решётку «по типу многочисленных валентных связей» (Рис. 57).

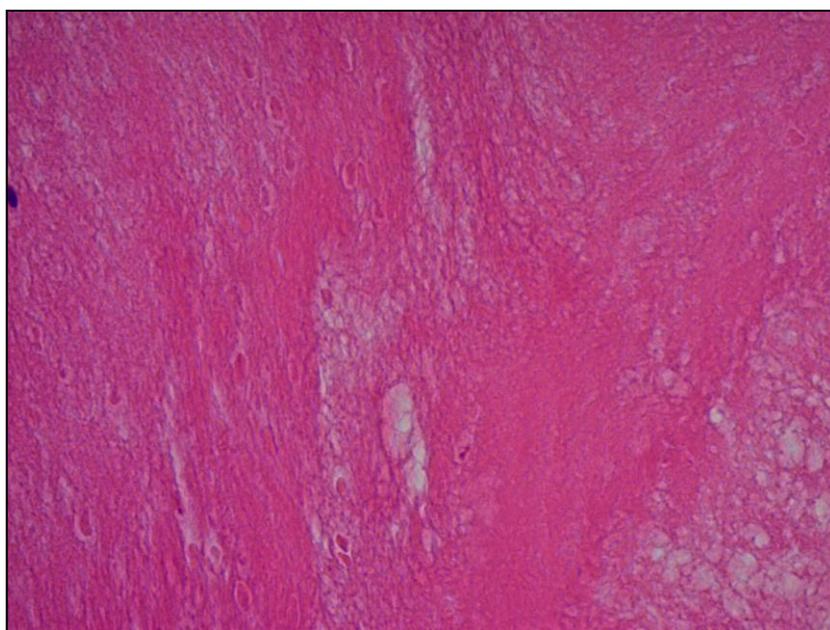


Рис. 57. Фибриновая матрица (окраска гематоксилин-эозин, $\times 400$).

Цитоморфологическое исследования надсадочной жидкости (жидкость, полученная в процессе лиофилизации), получаемой при приготовлении фибринового матрикса.

При цитоморфологическом исследовании характеризовалась только наличием единичных в поле зрения форменных элементов крови (Рис. 58).

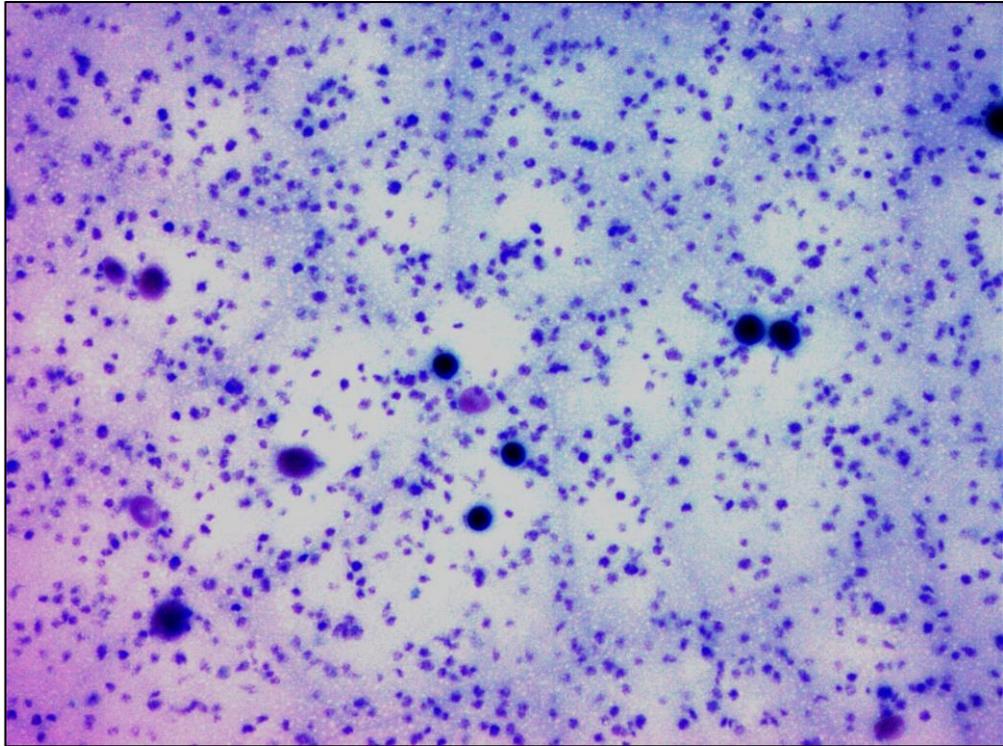


Рис. 58. Надосадочная жидкость (окраска по Романовскому, х 400).

Цитоморфология аутологичного гелевого тканевого фибринового матрикса, содержащего аутологичные микрографты эпикардальной жировой ткани и инволютивно изменённой жировой ткани тимуса, характеризовалась наличием фрагментов жировой ткани с «рыхло» прилежащими нитями фибрина получаемого геля, содержащего единичные форменные элементы крови (Рис. 59).

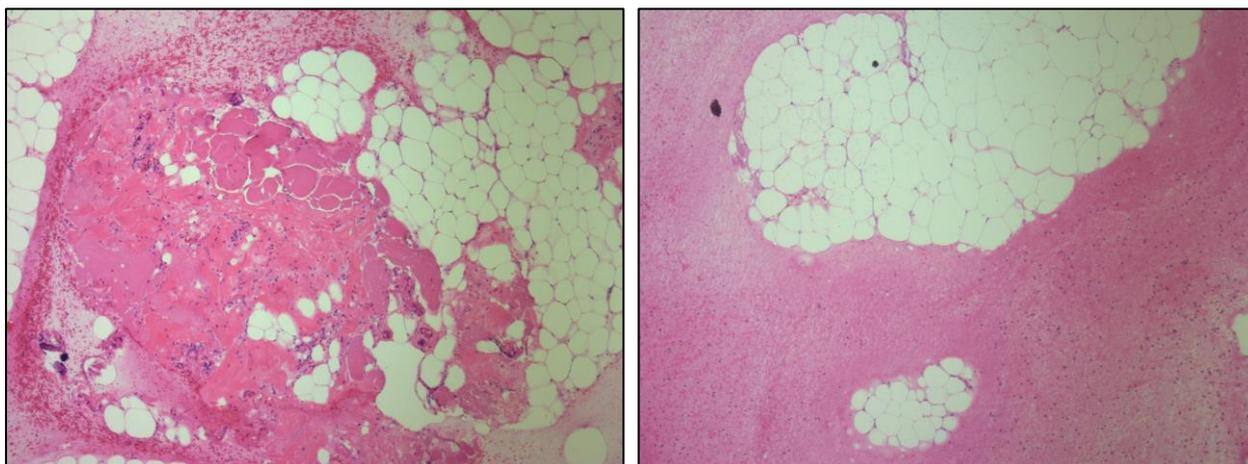


Рис. 59. Аутологичный тканевой жировой гелевый фибриновый матрикс (окраска гематоксилин-эозин, х 100).

Цитоморфология аутологичного тканевого фибринового матрикса, содержащего аутологичные микрографты жировой ткани, характеризуется наличием фрагментов жировой ткани с «рыхло» прилежащими нитями фибрина получаемого геля. При увеличении х 400 определяются микросвязи по типу удерживающих ворсинок между адипоцитами и полученной фибриновой решёткой, что может свидетельствовать о клеточном взаимодействии липографтов, СВКФ и полученной фибриновой решётки (Рис. 59).

Исследование разработанной липидно-фибриновой матрицы на содержание VEGF и МСК-ЖТ.

Следуя описанной выше методике, были сформированы липидно-фибриновые матрицы у 10 пациентов, вошедших в клиническое исследование. Проведён анализ содержания факторов роста и стволовых клеток в полученном материале. Выявлено, что концентрация VEGF в исследуемых образцах составляла $769 \pm 40,44$ pg/ml, что в 2-3 раза превышает концентрацию в плазме, а содержание МСК-ЖТ находилось на уровне 9500 ± 200 в грамме жировой ткани. Учитывая пролиферативный потенциал МСК-ЖТ и наличие необходимых условий, высказано предположение о возможном потенциале сформированной

матрицы.

Таким образом, разработана методика формирования аутологичного носителя МСК-ЖТ, основанная на взаимодействии фибрина и клеток имплантируемого материала, содержащего достаточное количество факторов роста эндотелия и способного стимулировать процессы неоангиогенеза в полости перикарда и репарации кардиомиоцитов.

ГЛАВА V. ИНДУКЦИЯ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА У БОЛЬНЫХ ИБС С ДИФФУЗНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ КОРОНАРНОГО РУСЛА: ОПИСАНИЕ МЕТОДИК.

В результате всех исследований разработано две методики стимуляции ангиогенеза у больных ИБС во время выполнения операции коронарного шунтирования.

5.1. Методика ЮрЛеон I.

Методика индукции непрямой реваскуляризации миокарда была предложена Шевченко Ю.Л. в 2008 г. и состоит из 2-х этапов:

1 этап – интраоперационный – включает механическую обработку эпикарда и перикарда с целью их десквамации;

2 этап заключается во введении стерильного дренажного экссудата, отделяющегося по дренажам в 1 сутки после операции, интраперикардially на 2 сутки после операции.

Методика выполнялась пациентам, которым планировалась неполная хирургическая реваскуляризация миокарда (с ИК или на работающем сердце). При поступлении и обследовании определяли зону миокарда, не подлежащую по различным причинам прямой реваскуляризации.

1-й этап

КШ по стандартной методике. Перед окончанием операции выполняли механическую обработку эпикарда и перикарда, особо выделяя зону, где было невозможно шунтировать поражённые венечные артерии. Методика индукции асептического перикардита осуществлялась путем воздействия на большую часть перикарда (боковые, задняя его поверхности) и эпикарда (передняя стенка ЛЖ, задняя и боковая стенки ЛЖ) с помощью специальных приспособлений и

приёмов:

- использование скальпеля - наносили поверхностные эскориации на эпикарде и перикардиальной поверхности (Рис. 60);

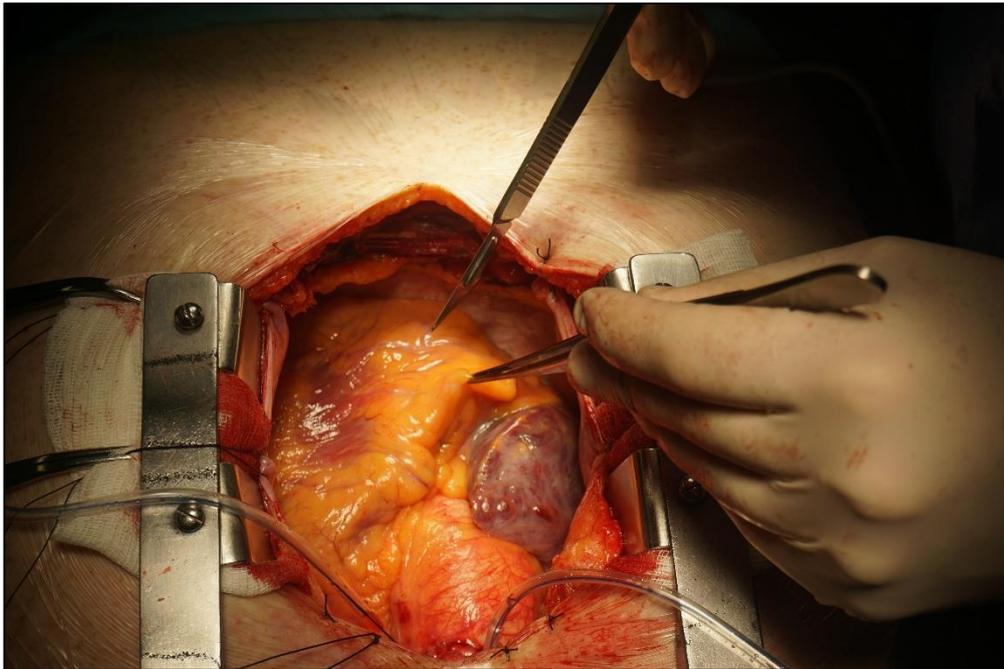


Рис. 60. Нанесение поверхностных эскориаций на эпикарде с помощью скальпеля.

- использование специального инструмента, состоящего из ручки-крепления и абразивного элемента;
- использование стерильной абразивной перчатки (Рис.61-62).

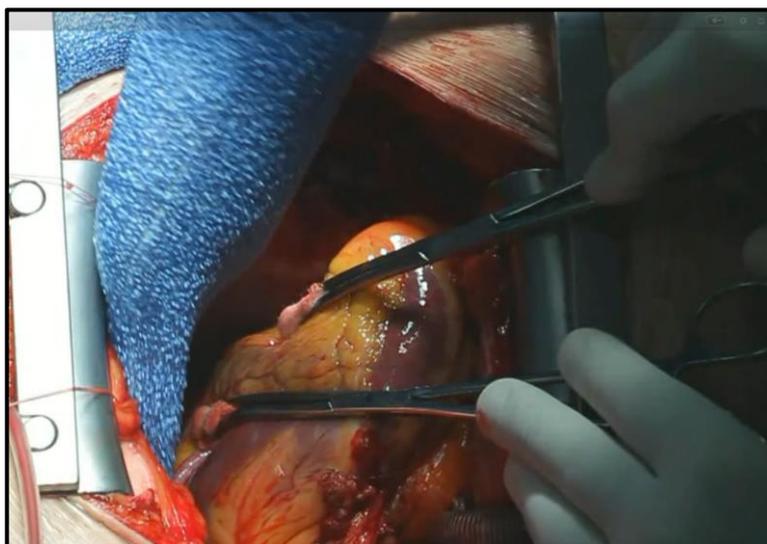


Рис. 61. Механическая обработка эпикарда и перикарда с помощью стерильной абразивной перчатки.

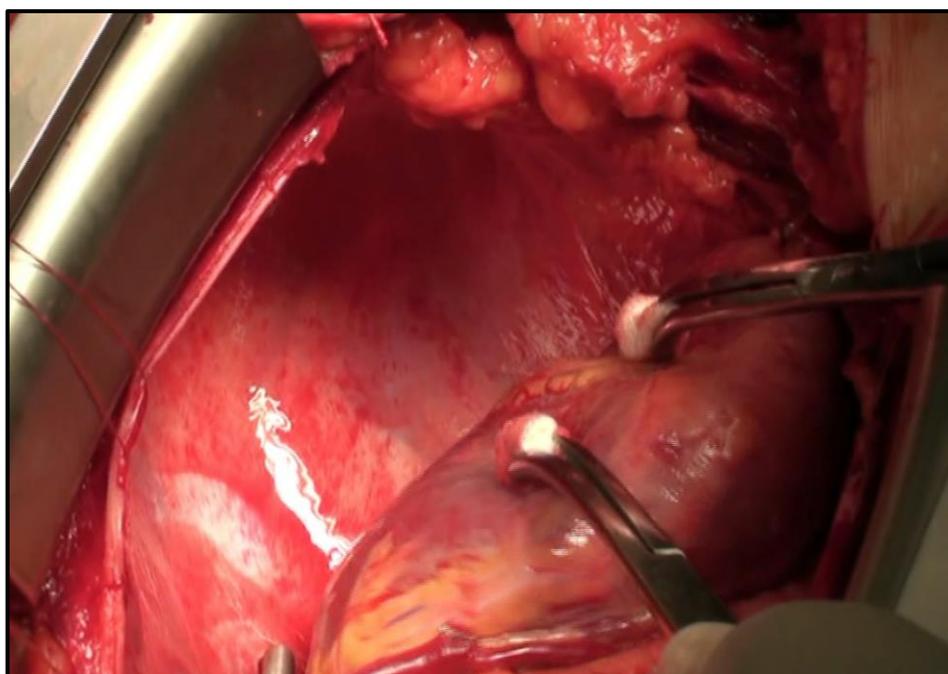


Рис. 62. Вид эпикарда и перикарда после механической обработки (отмечается выраженная сосудистая реакция).

По окончании основного этапа операции устанавливали по передней стенке тотчас ниже мечевидного отростка отдельный тонкий дренаж с

помещением перикардального его конца по диафрагмальной поверхности перикарда (Рис. 63).

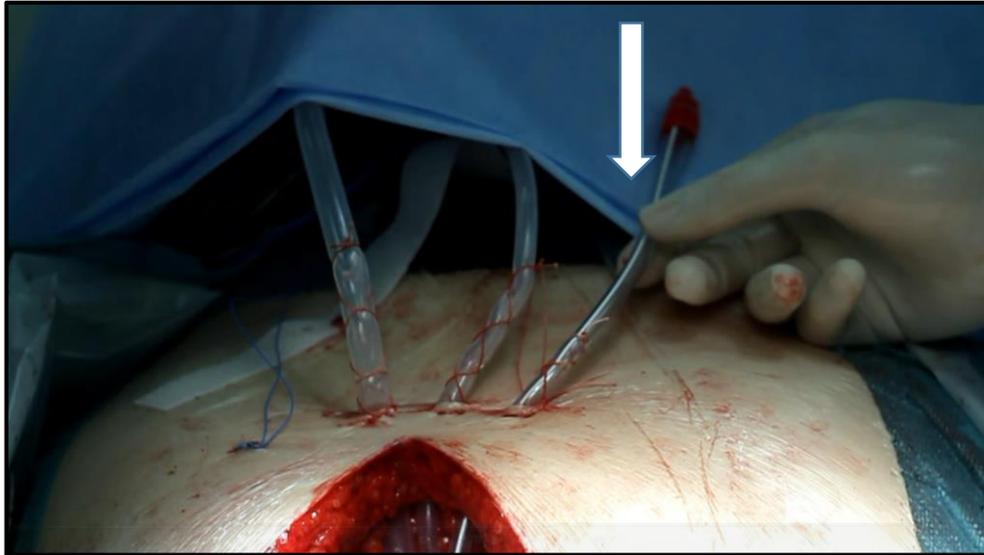


Рис. 63. Установка отдельного тонкого дренажа для введения аспирата (отмечено стрелкой).

2-й этап

Установленные дренажи подключали к стерильному резервуару и налаживали систему активной аспирации (Рис.64).

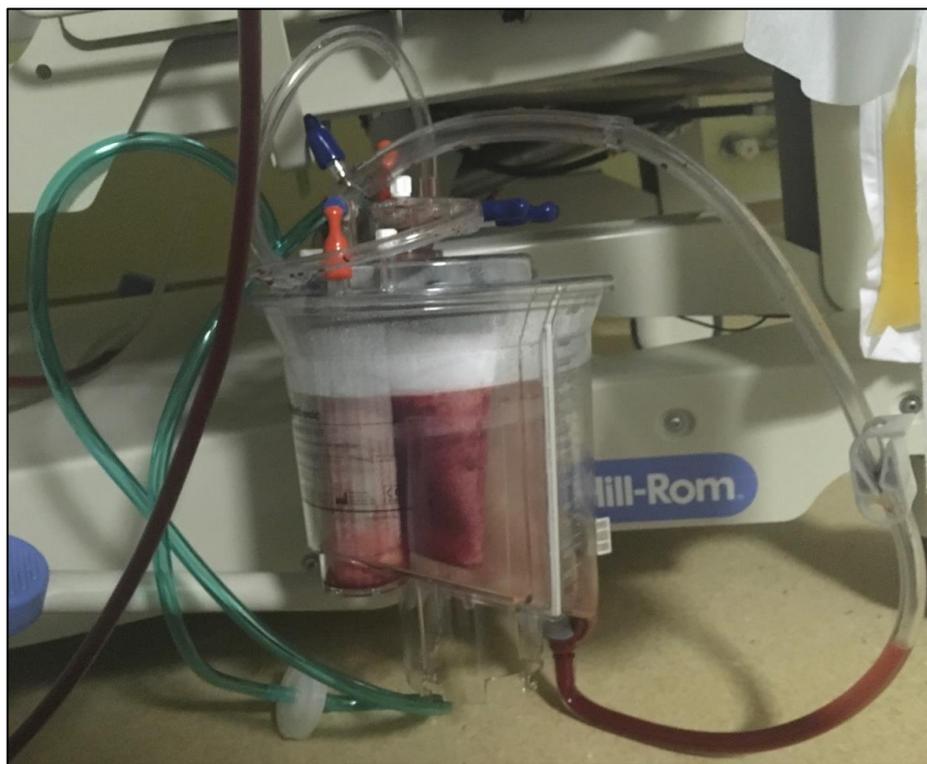


Рис. 64. Дренажи подключены к стерильному резервуару для сбора экссудата.

На вторые сутки аспират извлекали в стерильных условиях (Рис. 65).

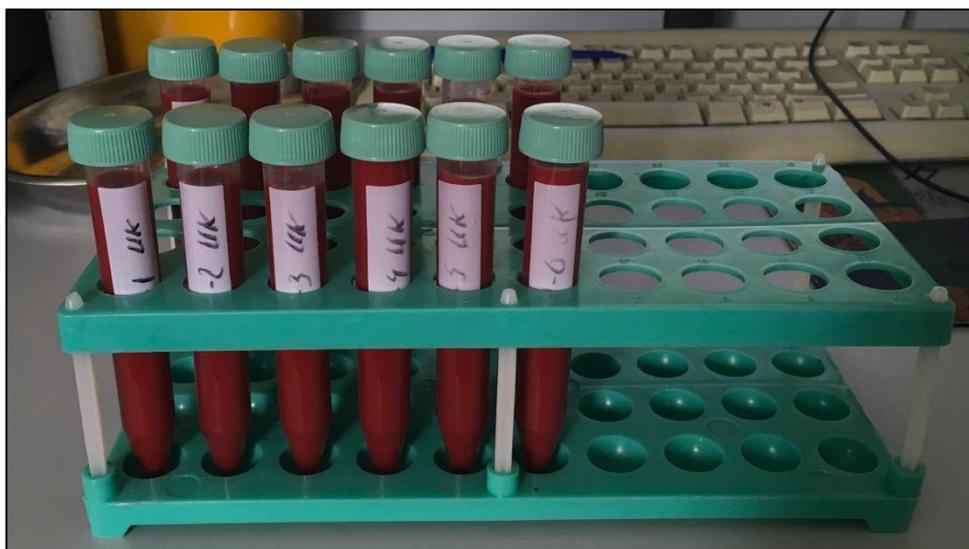


Рис. 65. Полученный аспират из дренажей.

Полученную жидкость центрифугировали для отделения разрушившихся форменных элементов крови и их фрагментов (Рис.66-67).



Рис. 66. Центрифуга для отделения форменных элементов и их фрагментов.

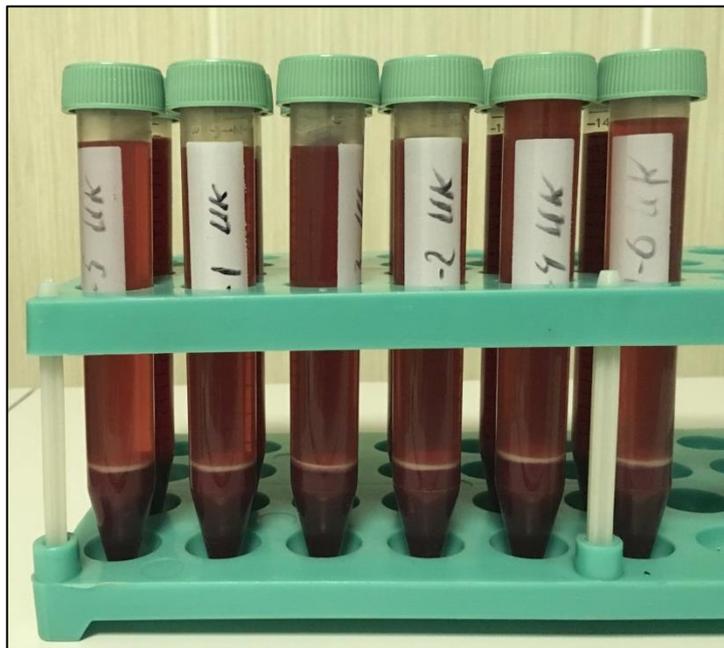


Рис. 67. Пробирки с аспириатом после центрифугирования.

Только после удаления всех установленных для контроля гемостаза дренажей вводили полученный раствор. Сначала проверяли соответствие

маркировки и состояния содержимого, извлекали его в стерильный шприц объёмом 50 мл (Рис.68).

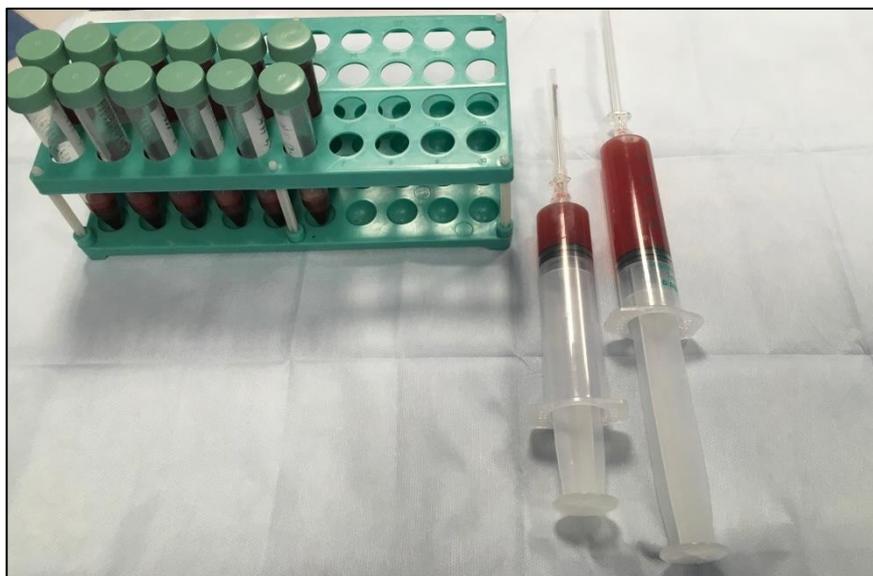


Рис. 68. Полученный центрифугированный аспират набран в шприцы для введения.

Содержимое шприца вводили через заранее подготовленный дренаж с последующим удалением его и герметизацией дренажного отверстия (Рис. 69).



Рис. 69. Введение аспирата в полость перикарда (2 сутки после операции).

5.2 Методика ЮрЛеон II.

Позднее была разработана методика ЮрЛеон II, основанная на результатах дальнейших исследований *in vivo* и *in vitro*, включающая (Шевченко Ю.Л.).

Дооперационный этап - подготовка обогащённой тромбоцитами плазмы крови.

Операционный этап – интраоперационный – извлечение жировой ткани из полости переднего средостенья и эпикардального жира. Подготовка липидной матрицы. Механическая обработка эпикарда и перикарда с целью их десквамации. Размещение полученной матрицы и ее фиксация в перикардальной полости.

Послеоперационный этап - введение дренажного аспирата интраперикардально на 2 сутки после операции.

Дооперационный этап.

Приготовление липидно-фибринового матрикса состояло из нескольких этапов. Первый - это получение венозной крови (Рис.70).



Рис. 70. Получение венозной крови в начале операции.

При работе с тромбоцитами всегда требуется добавление антикоагулянта; учитывая непродолжительное время хранения обогащённой тромбоцитами плазмы, использовали 3,8% раствор цитрата натрия (пробирки с закрытой вакуумной системой с содержанием 3,8% цитрата натрия, 10 мл, Sarstedt Monovette, Sarstedt).

Второй этап – получение обогащённой тромбоцитами плазмы методом однократного центрифугирования по разработанной ранее оригинальной методике (Рис.71).



Рис. 71. Центрифугирование полученной крови.

Концентрат тромбоцитов получают при помощи различных методик, регламентированных рядом нормативных документов: «Инструкция по фракционированию консервированной крови на клеточные компоненты и плазму» (утв. Минздравом СССР 11.06.1987 № 06-14/24); Постановление Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, её продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии»; «Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови» (Совет Европы, 2011, 16-е издание).

Разработанный в Национальном медико-хирургическом Центре им. Н.И. Пирогова способ получения обогащённой тромбоцитами плазмы предполагает однократное центрифугирование. Использовали стандартную лабораторную центрифугу Heraeus Labofuge 300 (Heraeus Kulzer) с раскачивающимся ротором и максимальным радиусом ротора 14 см.

Для получения обогащённой тромбоцитами плазмы проводили расчёт скорости центрифуги, учитывая относительное центробежное ускорение (фактор разделения), выраженное в g ($g=9,8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-2}$). Расчёт ускорения при центрифугировании производили при помощи стандартной формулы:

$$g(f) = 1,118 \cdot 10^{-3} \cdot r \cdot N^2$$

где $g(f)$ — фактор разделения; 1,118 — константа; r — радиус, ротора, м; N — количество оборотов ротора в минуту. (Приложение № 2 к «Инструкции по фракционированию консервированной крови на клеточные элементы и плазму», Москва, 1987). Таким образом, был выбран режим центрифугирования — 7 мин. со скоростью 1000 об/мин.

Для разделения полученных фракций центрифугата использовали иглы Sterican (B Braun) — длиной 120 мм и внутренним диаметром 0,8 мм.

Третий этап — активация дегрануляции тромбоцитов плазмы. С этой целью использовали кальция хлорид раствор для инъекций 10% в количестве 0,2 мл на 1 мл обогащённой тромбоцитами плазмы (Рис.72).



Рис. 72. Активация дегрануляции тромбоцитов плазмы (10% CaCl_2).

Третий этап включал добавление тканевых автографов (аутожира) в полученную обогащённую тромбоцитами плазму (Рис. 73).



Рис. 73. Добавление аутожира в обогащенную тромбоцитами плазму.

Четвёртый этап – уплотнение (дегидратация) липидно-тромбоцитарно-фибринового геля, путем обезвоживания биологического материала (Рис. 74).



Рис. 74. Уплотнение (дегидратация) липидно-тромбоцитарно-фибринового геля.

Проводили в стандартных стерильных чашках Петри или почкообразных лотках путем отжатия стерильной марлевой салфеткой.

Операционный этап

У всех пациентов, включённых в исследование, во время выполнения КШ в стерильных операционных условиях производили изъятие тканевого аутоматериала (жира) в двух областях:

1. Область инволютивно изменённого тимуса – данная жировая ткань использовалась как остов для формирования матрицы и источник МСК-ЖТ. Выделение жировой ткани проводили до этапа вскрытия перикарда острым путем с целью предупреждения термического её повреждения (Рис. 75).

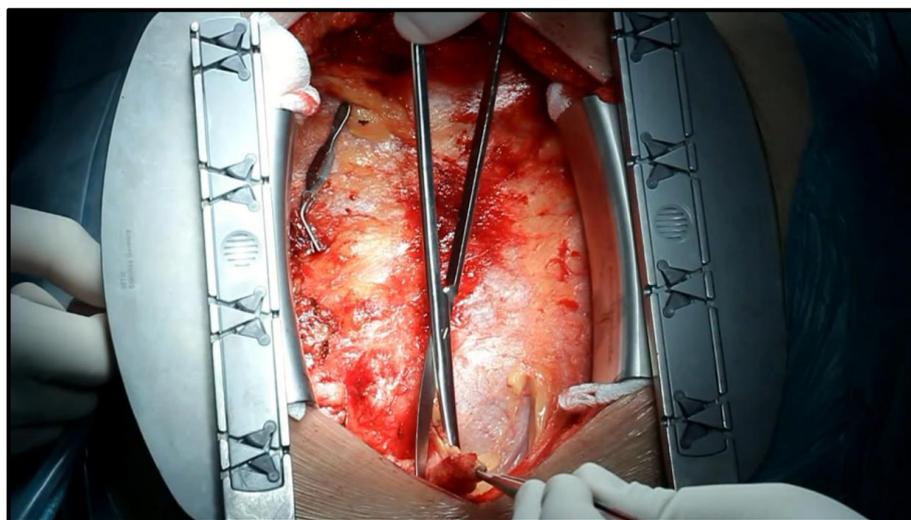


Рис. 75. Изъятие жира в области иволютивно изменённого тимуса.

2. Эпикардальная жировая ткань - служила как дополнительным источником МСК-ЖТ. Выделение жировой ткани проводили до этапа подключения аппарата ИК путем скарификации эпикарда скальпелем и/или ножницами, используя зоны, наиболее обогащённые данной тканью, однако содержащие наименьшее количество эпикардальных сосудов (Рис. 76).

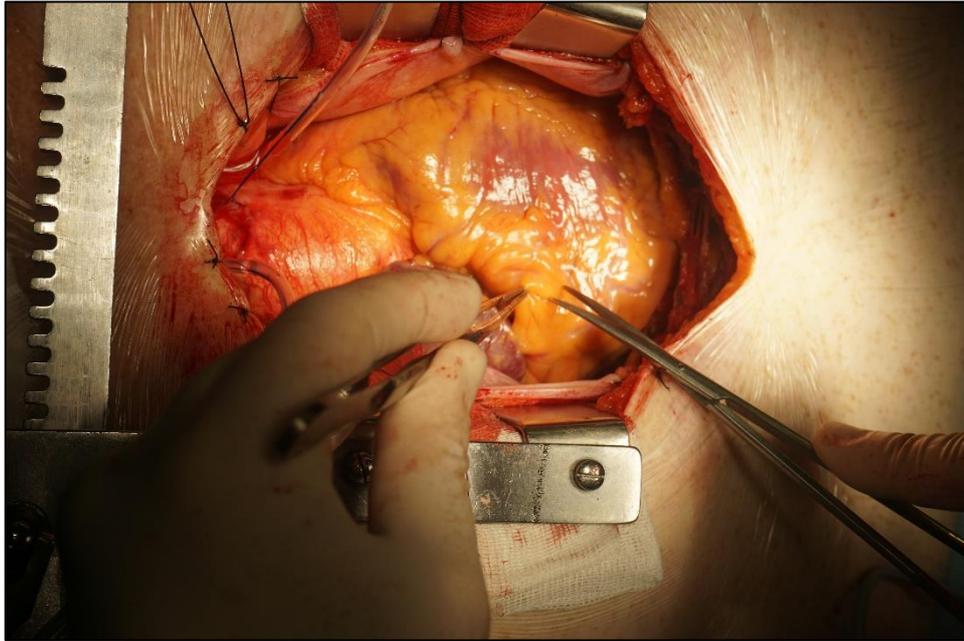


Рис. 76. Изъятие эпикардальной жировой ткани.

Далее следовал этап подготовки тканевого материала, заключавшийся в его гомогенизации (Рис.77).



Рис. 77. Подготовка тканевого материала.

Производилась подготовка липидно-фибриновой матрицы, путем добавления тканевого гомогената в полученную обогащённую тромбоцитами плазму (Рис. 78).

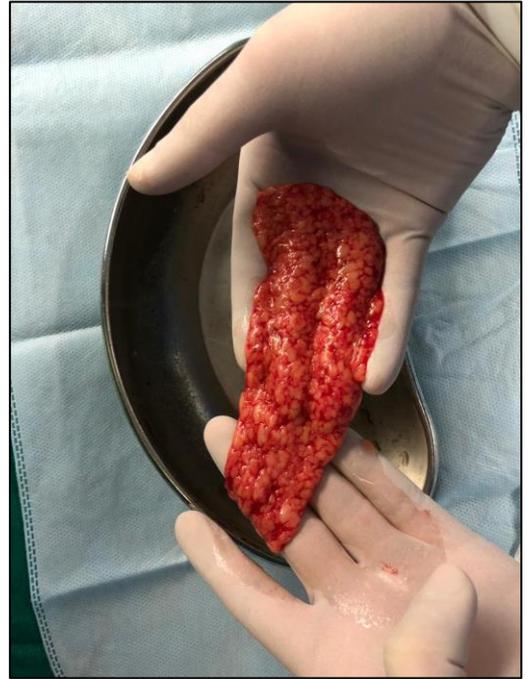
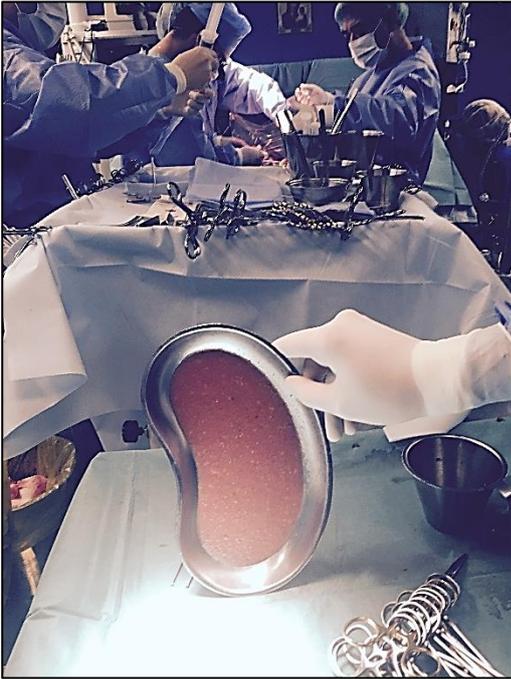


Рис. 78. Подготовленная липидно-фибриновая матрица.

Затем следовал этап механической обработки эпикарда и перикарда с целью их десквамации и размещение полученной матрицы и ее фиксация в перикардиальной полости (Рис.79).

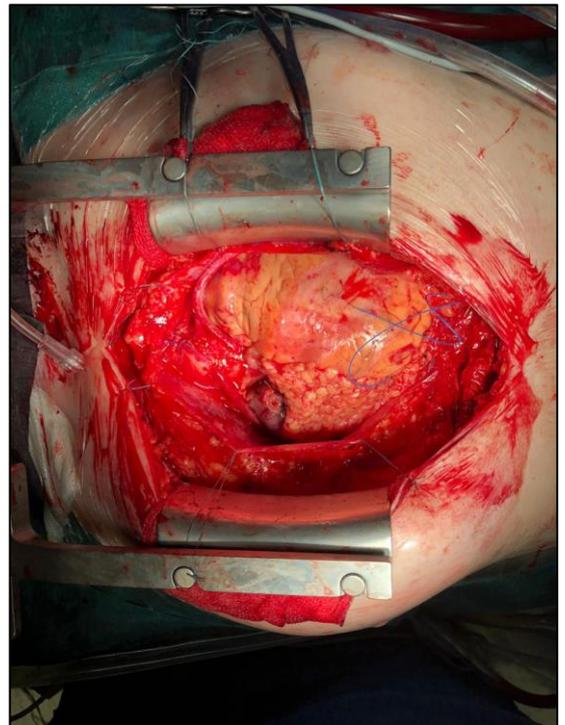
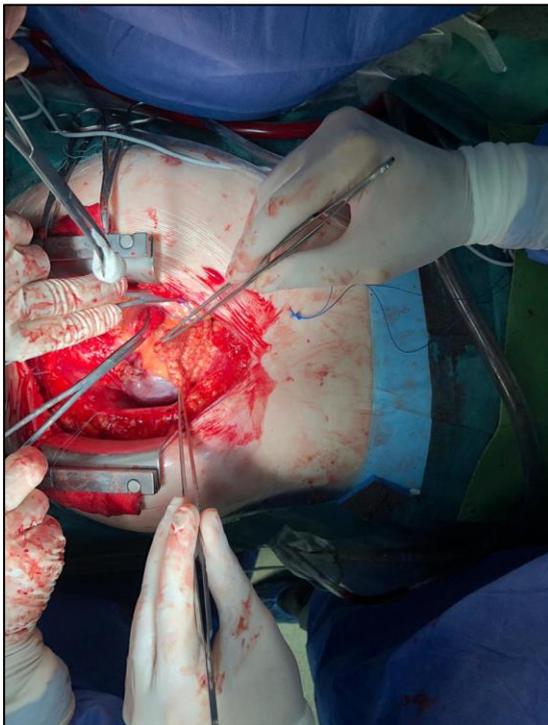


Рис. 79. Фиксация матрицы в полости перикарда.

Послеоперационный этап заключался во введение дренажного аспирата интраперикардially на 2 сутки после операции, аналогично действиям при методике ЮрЛеон, однако использовали меньший объем вводимой жидкости (до 30 мл).

ГЛАВА VI. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИК ЮРЛЕОН.

В исследование были включены 40 пациентов (20 пациентов на первичном этапе разработки методики ЮрЛеон I и 20 пациентов после модификации методики - ЮрЛеон II), поступивших для хирургической реваскуляризации миокарда. В дополнении к традиционному КШ в условиях ИК, этим пациентам выполнены методики ЮрЛеон. Контрольную группу составили 30 случайных пациентов, которым выполнили полную реваскуляризацию миокарда в условиях ИК (Рис. 80).

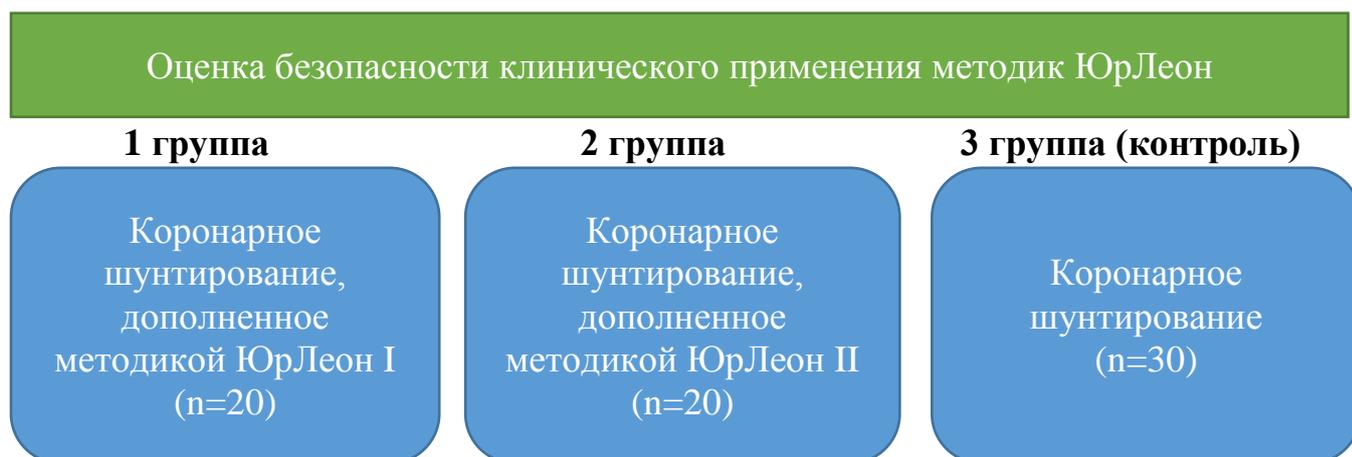


Рис. 80. План исследования

6.1. Анализ интраоперационных осложнений.

Во время выполнения КШ, дополненного методиками ЮрЛеон I и ЮрЛеон II, ни один больной не имел интраоперационных осложнений. Выполнение скарификации и десквамации эпикарда и перикарда не сопровождалось развитием кровотечений, гемодинамически значимых нарушений ритма сердца и проводимости. Других интраоперационных осложнений так же не было зарегистрировано.

6.2. Анализ воспалительных маркеров в периферической крови

Целью этих манипуляций являлось развитие асептического воспаления в послеоперационном периоде. Для определения степени выраженности воспаления мы исследовали уровень лейкоцитов крови и показатели лейкоцитарной формулы, отклонения активности ферментов (АСТ, АЛТ, КФК МВ КФК и ЛДГ), СОЭ и белки-маркёры острофазовой реакции. Были взяты интраоперационные посевы из раны и посевы дренажного аспирата в послеоперационном периоде, а также сами дренажи, удаляемые на 2-3 сутки после операции.

У больных ИБС после выполнения комплекса мероприятий по стимуляции асептического воспаления в полости перикарда в сочетании с КШ регистрировалось достоверное возрастание в крови уровня лейкоцитов в периферической крови (Табл. 11).

Табл. 11.

Воспалительные маркеры в раннем послеоперационном периоде ($M \pm m$).

Маркёры воспаления	До операции			1 сутки			3 сутки			7 сутки		
	Группы			Группы			Группы			Группы		
	1 n=20	2 n=20	Контр оль n=30	1 n=20	2 n=20	Контро ль n=30	1 n=20	2 n=20	Контро ль n=30	1 n=20	2 n=20	Контр оль n=30
Лейкоциты	6,9 ± 0,21	5,2 ± 0,31	5,8 ± 0,15	22,4 ± 2	25 ± 3,2	19,2 ± 0,33	11,9 ± 1,1	12 ± 2,3	9,8 ± 0,66	9,8 ± 0,5	10,3 ± 0,9	7,6 ± 0,8
СОЭ, мм/час.	10,7 ± 1,30	8,7 ± 1	7,5 ± 2	18 ± 2,3	17,7 ± 1,8	14,7 ± 2,6	12 ± 3,6	12,5 ± 2,3	9,7 ± 1,8	9,3 ± 2,6	9,8 ± 1,1	3,6 ± 2
АСТ, ед	27,1 ± 1,51	20,1 ± 1,1	25 ± 2,1	85,3 ± 11,8	91,3 ± 13,68	60,2 ± 11,4	45,2 ± 10,3	40,3 ± 8,4	30,3 ± 3,4	25,3 ± 3,4	24,3 ± 4,8	14,2 ± 3,6
АЛТ, ед	29,9 ± 1,86	30,1 ± 1,66	26,1 ± 1,2	38,3 ± 3,42	44,5 ± 5,52	35,3 ± 5,2	31,2 ± 1,3	32,3 ± 3,6	29,8 ± 6,2	36,1 ± 4,3	35,1 ± 3,2	43,1 ± 3,3

КФК, ед	165, 6 ± 23,0	155 ± 20	160 ± 21,5	950, 8±3 1,5	1105, 8±18 0,4	780,3± 130	430,6 ±121, 5	480,8 ±130, 3	350±10 0,5	180 ± 18,2	130± 16,3	80 ,0 ± 19
МВ КФК, ед	27,2 ± 2,08	28 ± 2	25,2 ± 1,08	40,3 ± 4	54,3 ± 6,0	39,3 ± 5	30,4 ± 1	32,8 ± 3	28,2 ± 1,2	26 ± 2,9	25 ± 3,6	26 ± 1,8
ЛДГ, ед/л	86,0 ± 33,9 1	88± 20	85 ± 15,6	132, 1 ± 62,8	173,1 ± 72,7	128,1 ± 62	105,3 ± 32,4	115,2 ± 15,3	91,1 ± 32	94 ± 15,1	90 ± 20,3	85 ± 13,1

На 1-е сутки после операции имело место существенное увеличение активности ферментов, лейкоцитов и СОЭ. Значительно увеличилась активность КФК, МВ КФК, АСТ и ЛДГ ($p < 0,05$). На 3 сутки после операции наблюдалась нормализация активности АСТ, АЛТ и МВ КФК. СОЭ, хотя и достоверно снизилось, все ещё оставались значительно высокими, как по сравнению с нормой, так и содержанием до операции ($p < 0,05$). На 7 сутки после операции наблюдалась нормализация всех исследуемых показателей во всех группах (Табл. 11).

Изменения СОЭ и появление лейкоцитоза отличается от изменения уровня клеточных ферментов, это позволяет утверждать, что реваскуляризация миокарда сопровождается развитием воспаления, которое вызвано оперативным вмешательством и интраоперационной ишемией миокарда и повреждением тканей. Выполнение же во время операции методик ЮрЛеон сопровождается усилением асептического воспаления в послеоперационном периоде. При этом методика ЮрЛеон II приводит к ещё большему воспалительному ответу, ввиду травматичного выделения эпикардального жира во время операции.

Параллельно выполняли исследование острофазовых белков альфа₁-антитрипсина (α₁АТ), С-реактивного белка (СРБ), альфа₂-макроглобулина (α₂МГ) (Табл.12). Содержание СРБ и альфа₁-антитрипсина (α₁АТ) в крови

резко увеличивалось в первые сутки после операции ($p < 0,05$). На третьи сутки после операции концентрация СРБ в крови оставалась на тех же значениях, уровень а1АТ продолжал возрастать. К 7-м суткам после операции мы отмечаем снижение содержания СРБ в крови ($p < 0,05$), в то время как, уровень а1АТ сохранялся на значениях предыдущего этапа исследования (Табл.12) Что касается а2МГ, то существенных изменений его концентрации зарегистрировано не было ($p > 0,05$).

Табл. 12.

Воспалительные маркеры в раннем послеоперационном периоде ($M \pm m$).

Период (по отношению к операции)	СРБ, мг/дл			а1АТ, мг/дл			а2МГ, мг/дл		
	Группа			Группа			Группа		
	1 n=20	2 n=20	Контр оль n=30	1 n=20	2 n=20	Контр оль n=30	1 n=20	2 n=20	Контр оль n=30
До	4,3 ± 1,23	4 ± 0,6	3 ± 2,3	110 ± 15	105 ± 13	117 ± 11	85 ± 3,2	78 ± 2,1	91 ± 4
1 сутки после	18,2 ± 0,29	20,3 ± 0,7	15,2 ± 0,3	158 ± 5,6	165,3 ± 2	162,3 ± 2	120 ± 4,6	140 ± 5,6	120 ± 4,6
3 сутки после	24,8 ± 0,5	26,8 ± 0,5	16,3 ± 0,4	230 ± 8,7	242,6 ± 5,8	195 ± 8	100 ± 5,6	95 ± 3,6	100 ± 5,6
5 сутки после	22,5 ± 0,8	25,4 ± 0,3	13,4 ± 0,1	320 ± 3,6	393 ± 3	178 ± 5	98 ± 4,8	103 ± 3,6	92 ± 1,6
7 сутки после	10,6 ± 0,3	10,3 ± 0,2	8,6 ± 0,2	285 ± 5,6	305 ± 5	180 ± 6,3	99 ± 5,5	101 ± 3,3	95 ± 3,1

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что воспалительный ответ после КШ и стимуляции асептического воспаления в полости перикарда выходит за рамки физиологической реакции на

хирургическую травму и сопровождается компенсаторной активацией антиперекисных и антипротеолитических механизмов биологической защиты.

6.3. Бактериологический анализ.

Все пациенты, которым выполнялась реваскуляризацию миокарда, получали антибиотикотерапию согласно протоколу, утверждённому в НМХЦ им. Н.И Пирогова:

1. В дооперационном периоде пациенты не получали антибиотикотерапии
2. Интраоперационно – до разреза вводился антибиотик (Ванкомицин).
3. В послеоперационном периоде в отделении реанимации пациент не получал антибактериальных препаратов.
4. После перевода из отделения реанимации на 1-2 сутки в профильном отделении пациенты не получали антибиотикотерапии.

Исследование стерильности раны в результате проводимых манипуляций в перикарде было разделено на несколько этапов:

1. Посев после вскрытия перикарда;
2. Посев после выделения эпикардального жира и жира инволютивно изменённого тимуса (отдельно посев из полости перикарда и посев полученного материала) – во второй группе пациентов;
3. Посев после окончания ИК;
4. Посев после скарификации перикарда и эпикарда, и установки дренажей;
5. Посев полученной липидной фибриновой матрицы;
6. Посев дренажного аспирата;
7. Посев самих дренажей, после удаления;
8. Посев вводимого на 2 сутки дренажного аспирата.

Посевы были выполнены только на аэробную флору.

Было выявлено, что в периоперационном периоде все взятые посевы были отрицательные на рост патогенной флоры.

6.4. Ультразвуковая динамическая оценка перикардита.

У всех пациентов в послеоперационном периоде наблюдались явления перикардита. Он носил асептическую природу (данные бактериологического исследования), однако, с целью исключения продуктивного его характера, в раннем послеоперационном периоде выполнялся контроль отделяемого по дренажам из полости перикарда и ретростернального пространства. После удаления последних, регулярно – 1 раз в сутки, в течение 3 суток, выполнялся ЭхоКГ контроль состояния полости перикарда (Рис. 81). Измерялась сепарация листков перикарда по передней, боковой и задней стенках ЛЖ и при нарастании признаков сдавления полостей сердца, выполняли дренирование полости перикарда.

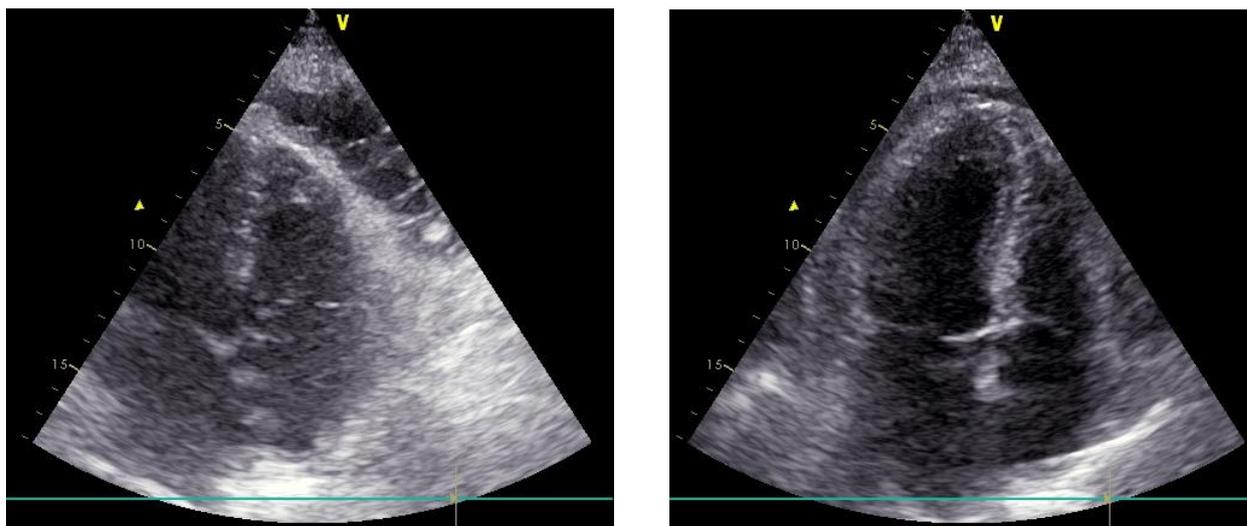


Рис. 81. Перикардит (в полости перикарда около 50 мл содержимого, видны нити фибрина).

Всего во всех группах выполнялось дренирование перикарда в 2 случаях. В 1 опытной группе пациентов 1 наблюдение. Во 2 опытной группе подобных пациентов не было, в контрольной группе - 1 пациент. Таким образом, не выявлено значимого различия между необходимостью дренирования полости перикарда в послеоперационном периоде у наблюдаемых групп пациентов.

При ЭхоКГ контроле были получены данные, представленные в таблице (Табл. 13).

Табл. 13.

Сепарация листков перикарда в различные сроки после операции (M±m).

Период после операции	Сепарация листков перикарда (мм)								
	по передней стенке (мм)			по задней стенке (мм)			по боковой стенке (мм)		
	Группа			Группа			Группа		
	1 n=20	2 n=20	Контроль n=30	1 n=20	2 n=20	Контр оль n=30	1 n=20	2 n=20	Контро ль n=30
1 сутки	-	-	-	5±1	7±2	3±1	3±0,5	4±0,5	2±0,5
2 сутки	2±0,5	3±0,5	2±0,5	5±0,7	6±0,5	3±1	3±0,5	3±0,5	1±0,5
3 сутки	3±0,5	3±0,5	2±0,5	4±0,5	5±1	2±0,5	3±0,5	3±0,5	2±0,5
7-10 сутки	3±0,5	3±0,5	2±0,5	5±0,5	5±1	2±0,5	3±0,5	3±0,5	2±0,5

Кроме этого, были проведены контрольные обследования этих пациентов в отдалённом периоде (более 6 месяцев). Выполнена контрольная ЭхоКГ, а также МРТ органов грудной клетки (последнее исследование выполнялось только пациентам 2 опытной группы, ввиду наличия дополнительной аутологичной ткани в полости перикарда). Было выявлено, что за этот период сепарация листков перикарда у пациентов опытных групп составила в среднем 3-4 мм, без значимого отличия между группами.

6.5. Наблюдение за пациентами в отдалённом периоде.

Через 6 и 12 месяцев после операции пациенты прошли дополнительное обследование, включавшее в себя общий осмотр, уточнение ФК стенокардии, а также контрольное ЭхоКГ исследование.

За 12 месяцев не было зарегистрировано летальных исходов в данных группах пациентов. 40% пациентов прошли реабилитацию с дополнительным контролем показателей крови и ЭхоКГ в стационаре по месту жительства после

выписки. Признаков продуктивного перикардита, сдавления полостей сердца у пациентов выявлено не было. Показатели воспаления (лейкоциты, СРБ, АлАТ, АсАТ) пришли в норму у всех пациентов через 1 неделю после выписки.

ФК стенокардии регрессировал у пациентов всех групп (Табл. 14), при этом значимых различий между пациентами представленных групп выявлено не было ($p > 0.05$).

Табл. 14.

ФК стенокардии в отдалённом периоде.

ФК стенокардии		I группа (n=20)	II группа (n=20)	III группа (n=30)
I ФК	до операции	-	-	-
	после операции	10 (50%)	11 (55%)	12 (40%)
II ФК	до операции	-	-	-
	после операции	10 (50%)	9 (45%)	18 (60%)
III ФК	до операции	12 (60%)	13 (65%)	18 (60%)
	после операции	-	-	-
IV ФК	до операции	8 (40%)	7 (35%)	12 (40%)
	после операции	-	-	-

Таким образом, по данным проведённого исследования КШ, дополненное методиками ЮрЛеон I и ЮрЛеон II, является безопасной клинической процедурой. Во время её выполнения, а также в раннем и отдалённом (12 месяцев) послеоперационном периодах осложнений и критических изменений в лабораторных показателях, данных ЭхоКГ зарегистрировано не было. Прогрессирование СН не наблюдалось ни у одного из пациентов. ФК стенокардии (CCS) статистически значимо улучшился у всех пациентов.

После выявления безопасности проводимой методики выполнен следующий этап исследования для выявления эффективности предлагаемой методики.

ГЛАВА VII. КЛИНИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ МЕТОДИК ЮРЛЕОН.

В исследование включено 1864 пациента. Проспективно сформировали три группы пациентов. Все они были рандомизированы при поступлении, используя генератор случайных чисел.

I группа (1 опытная, n=865) - классическую хирургическую реваскуляризацию миокарда дополняли методикой ЮрЛеон I;

II группа (контрольная, n=865) - выполняли хирургическую реваскуляризацию миокарда.

III группа (2 опытная, n=134) - традиционную хирургическую реваскуляризацию миокарда дополняли методикой ЮрЛеон II (Рис. 82).

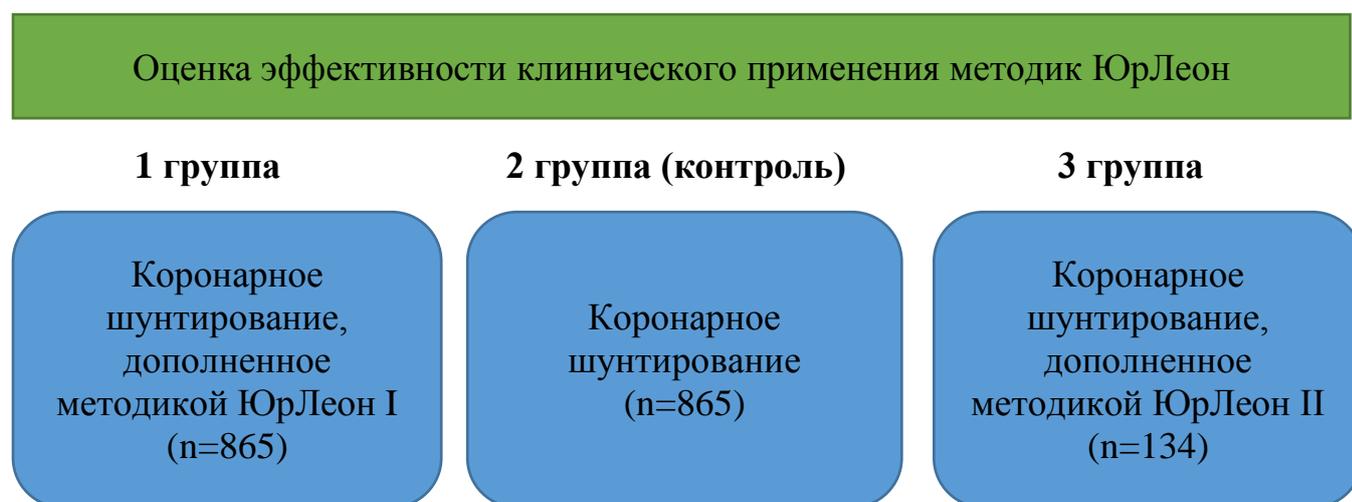


Рис. 82. План исследования

Медикаментозная терапия была одинаковой во всех группах. Она существенно не отличалась в течение периода наблюдения.

Для оценки эффективности проводимого лечения пациенты были комплексно обследованы: оценка ФК стенокардии, тест 6-минутной ходьбы, оценивали качество жизни пациентов, проводили ЭхоКГ, сцинтиграфию миокарда с ^{99m}Tc-технетрилом (покой, нагрузка) до операции и спустя 6 и 12

месяцев, 3 года 5 лет и 7 лет после реваскуляризации миокарда. Ряду пациентов (n=158) выполнена контрольная коронарошунтография в том числе для обнаружения новых дополнительных источников кровоснабжения миокарда. КЖ пациентов до, после и в отдалённом периоде после операции оценивали с помощью опросника SF-36 [79].

7.1. Анализ осложнений в ходе и в ранние сроки после операции.

Во время выполнения КШ, дополненного методиками ЮрЛеон, не зарегистрировано ни одного случая интраоперационных осложнений, связанных с самой методикой.

В раннем послеоперационном периоде на госпитальном этапе лечения (длительностью до 10 суток) все выявленные осложнения были разделены на две группы: некардиальные и кардиальные.

При анализе некардиальных осложнений (дыхательные, неврологические, мочевыделительные), в целом, отмечено отсутствие значимых различий между группами по большинству показателей ($p > 0,05$).

Однако, рассматривая геморрагические осложнения, которые наряду с кардиальными являются основной причиной неблагоприятных исходов в раннем послеоперационном периоде при хирургическом лечении ИБС, было выявлено, что в III группе они встречались со значимо меньшей частотой ($p < 0,05$).

При сравнении кровопотери и потребности в переливании крови и её компонентов в послеоперационном периоде, были получены следующие данные (Табл. 15).

Табл. 15.

Кровопотеря после операции и потребность в гемотрансфузии.

Показатель	I группа (n=865)	II группа (n=865)	III группа (n=134)	P 1-2	P 1-3
кровопотеря по дренажам (мл)	480±75,8	450,5±50	230,3±85,4	>0,05	<0,05
потребность в переливании препаратов крови (%)	112 (13%)	104 (12%)	4 (3%)	>0,05	<0,05
рестернотомия вследствие кровотечения	26 (3%)	29 (3,35%)	0 (0%)	>0,05	<0,05

Выявлено, что применение методики ЮрЛеон не повлияло на объем кровопотери по дренажам по сравнению с контрольной группой ($p > 0.05$). При этом, соответственно, не увеличилась и потребность в переливании препаратов крови и частота проводимых рестернотомий по поводу развившихся кровотечений. В группе, где была применена методика ЮрЛеон II, отчетливо прослеживается уменьшение послеоперационной кровопотери по дренажам и, соответственно, снижение потребности в переливании крови в послеоперационном периоде. В этой группе не было выполнено ни одной рестернотомии с целью остановки кровотечения (показанием для рестернотомии и ревизии зоны операции считали дренажную кровопотерю более 700 мл в первые три часа после операции на фоне проводимой интенсивной гемостатической терапии).

Это связано с методикой ЮрЛеон II – концентрат факторов свертывания крови и тромбоцитов, который находится в липидно-фибриновой матрице приводит к ускорению процессов тромбообразования в зоне операции в ближайшем послеоперационном периоде, способствуя снижению кровоточивости повреждённых тканей и, соответственно, уменьшению отделяемого по дренажам. Результат - отсутствие рестернотомий в III группе.

Таким образом, при подготовке кардиохирургической операции, с прогнозируемой большой кровопотерей (большой объем операции с массивным повреждением тканей средостенье, наличие предпосылок для кровотечения), необходимо рекомендовать применение липидно-фибриновой матрицы для таргетного местного лечения нарушений гемостаза, наряду с применением уже известных гемостатических средств.

Анализируя «малые» осложнения после операции, прослеживается аналогичная тенденция (Табл. 16).

Табл. 16.

«Малые осложнения» после операции.

Осложнения	I группа (n=865)	II группа (n=865)	III группа (n=134)	P 1-2	P 1-3
гемо- гидро- пневмоторакс	17 (2%)	20 (2,34%)	2 (1,5%)	>0,05	<0,05
гемоперикард	11 (1,3%)	5 (0,58%)	0 (0%)	>0,05	<0,05
поверхностная раневая инфекция	40 (4,6%)	42 (4,9%)	6 (4,5%)	>0,05	>0,05
прочие раневые осложнения	26 (3%)	26 (3%)	8 (6%)	>0,05	>0,05

Отмечается отсутствие разницы в частоте осложнений между контрольной и опытной группами, за исключением значительного снижения геморрагических осложнений в III группе.

При анализе респираторных, неврологических осложнений, нарушения функции других органов и систем достоверных различий между группами не установлено ($p > 0.05$).

7.2. Анализ выживаемости в отдалённом периоде.

Общая летальность в I и II группах пациентов прослежена на протяжении 84 месяцев. III группа пациентов была сформирована на втором этапе исследования, и вследствие этого продолжительность наблюдения составила 30

месяцев. Общая летальность в I группе за этот период составила 10,53% (91 больной), во II группе 14,57% (126 больных), в III группе 2,2% (3 больных). Выживаемость в исследуемых группах представлена ниже графически (все причины летальности (Рис.83) и только кардиальные причины (Рис. 83).

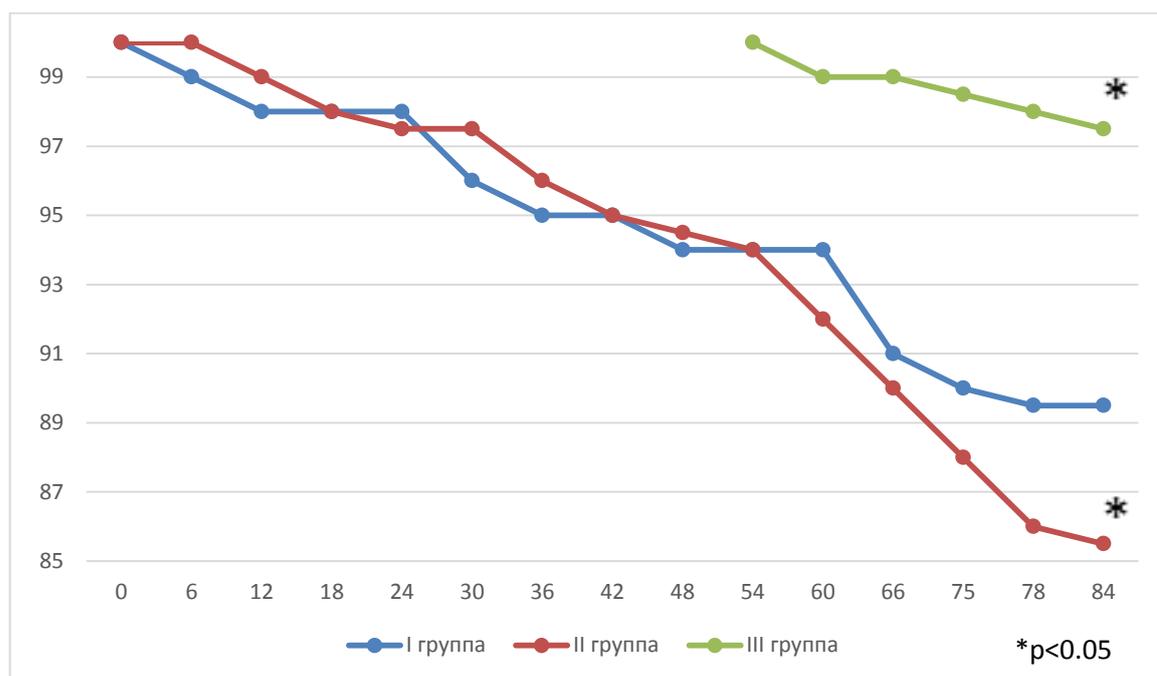


Рис. 83. Кривая выживаемости (все причины летальности).

Среди всех причин летальности выявлено преобладание кардиальных причин (развитие ИМ, прогрессирование СН). В I группе она составила за период наблюдения 9,14% (79 больных), во II группе – 12,83% (111 больных), в III группе - 2,2% (3 больных). Выживаемость при рассмотрении кардиальных причин летальности в исследуемых группах представлена ниже графически (Рис.84).

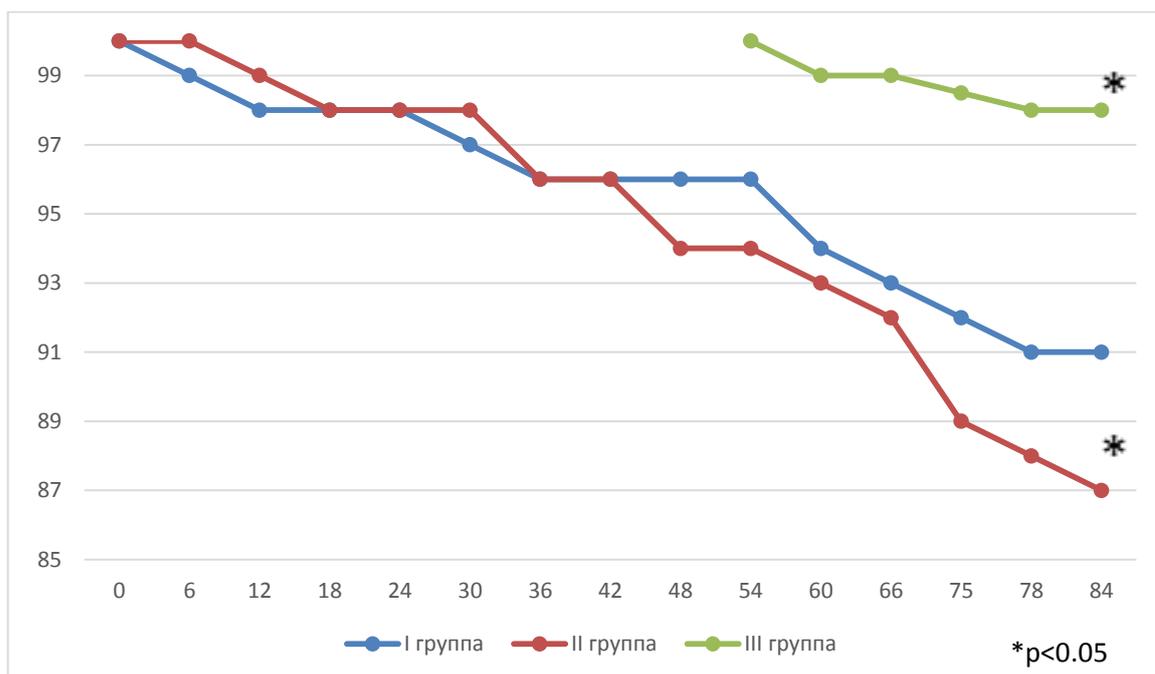


Рис. 84. Кривая выживаемости (кардиальные причины летальности).

Таким образом, выявлено значимое увеличение продолжительности жизни в группе пациентов, у которых хирургическая реваскуляризация миокарда была дополнена методикой ЮрЛеон I. Ввиду наблюдения за III группой только до 30 месяцев не представляется возможным статистически оценить разницу между группами в отдалённый период, однако в период до 2 лет в III группе отмечена меньшая летальность, чем в I группе

7.3. Исследование функциональных резервов миокарда.

Для оценки функциональных резервов миокарда пациенты были комплексно обследованы: оценена динамика ФК стенокардии, проведен тест 6-минутной ходьбы, выполнена ЭхоКГ, сцинтиграфия миокарда с ^{99m}Tc -технетрилом (покой, нагрузка) в различные сроки после операции.

7.3.1. Результаты клинического опроса и обследования.

Все пациенты в клинику поступали исходно с высоким ФК стенокардии III-IV степени $3,5 \pm 0,5$. Через 6 месяцев ФК в I группе снизился до $1,5 \pm 0,5$, через

12 месяцев ФК стенокардии составил $0,6\pm 0,5$ и через 3 года - $0,6\pm 0,5$. Через 5 и 7 лет ФК класс стенокардии значимо не изменился. Во II группе средние значения ФК стенокардии до операции $3,6\pm 0,48$, через 6 месяцев после операции ФК стенокардии снизился до $1,6\pm 0,5$. В период от полугода до года определяется не столь выраженная динамика ФК во второй группе - с $1,7\pm 0,5$ до $1,2\pm 0,7$, это связано с наличием пациентов, перенесших ИМ в этот период во II группе. Показатели через 5 и 7 лет были сопоставимы и составили $1,1\pm 0,4$ и $1,1\pm 0,4$, соответственно. В III группе ФК до операции $3,5\pm 0,5$, в послеоперационном периоде наблюдается снижение ФК до $0,3\pm 0,6$ в течение 2 лет (Табл. 17).

Табл. 17.

Изменение ФК стенокардии ($M\pm m$).

Группа	Исходно	3 месяца	6 месяцев	1 год	3 года	5 лет	7 лет
I группа	$3,5\pm 0,5$	$1,5\pm 0,4$	$1,5\pm 0,5$	$0,6\pm 0,5$	$0,6\pm 0,5$	$0,48\pm 0,52$	$0,16\pm 0,4$
II группа	$3,6\pm 0,48$	$1,6\pm 0,5$	$1,7\pm 0,5$	$1,2\pm 0,7$	$0,9\pm 0,6$	$1,1\pm 0,4$	$1,1\pm 0,4$
III группа	$3,5\pm 0,5$	$1,3\pm 0,5$	$1\pm 0,5$	$0,53\pm 0,5$	$0,3\pm 0,6$	-	-

Анализ динамики ФК стенокардии наглядно показывает статистически достоверное его снижение в отдалённые сроки после операции в группе, где выполнялось КШ в сочетании с методикой ЮрЛеон I ($p<0,05$) и при наблюдении в течение 2-летнего периода в III группе ($p<0,05$). В группе, где выполнялось стандартное КШ, показатель снижался в течение первых трёх месяцев, затем наблюдалась отрицательная динамика, что объясняется перенесением ИМ рядом пациентов в этот период.

7.3.2. Результаты теста 6-минутной ходьбы.

Тест шестиминутной ходьбы проводили в больничном коридоре с фиксированными точками, обозначающими пройденное расстояние. Изначально пациенты были проинструктированы: объяснена методика исследования и порядок действия. Затем пациент ходил в течение 6 мин. по коридору, стараясь преодолеть как можно большую дистанцию. Если при этом появлялись следующие симптомы: боль в области сердца, головокружение или боль в скелетных мышцах, тест прекращали и повторяли через 30 мин., после чего определяли среднюю длину двух пройденных дистанций.

Результаты теста 6-минутной ходьбы у обследованных пациентов представлены в таблице 18.

Табл. 18.

Тест 6-минутной ходьбы, м ($M \pm m$).

Группа	До	месяцы		годы			
		3	6	1	3	5	7
I группа	320±12	347±14	395±8	390±15	392±18	400±17	398±14
II группа	300±8	320±16	340±13	345±15	350±8	352±16	349±15
III группа	305±10	330±19	380±15	380±10	-	-	-

Толерантность к физической нагрузке при проведении теста 6- минутной ходьбы статистически значимо возрастает в отдалённые сроки в группе, где выполнялось КШ в сочетании с методиками ЮрЛеон I и ЮрЛеон II ($p < 0,05$).

7.3.3. Результаты эхокардиографии.

ЭхоКГ выполняли всем пациентам через сутки после операции и во время стационарного периода лечения (до 2 недель). В последующем контрольными точками для выполнения исследования являлись 6 месяцев, 12 месяцев, 3 года, 5 и 7 лет после операции. Проводилась детальная оценка показателей сократимости сердца. При анализе локальной сократимости ЛЖ использована схема его сегментарного строения.

К моменту госпитализации для выполнения операции пациенты всех групп перенесли один или несколько ИМ, что существенно повлияло на исходную кинетику стенок и общую сократимость ЛЖ. Средние показатели ФВ ЛЖ в I группе составили $53,4 \pm 6,4\%$, во II группе - $54,5 \pm 5,9\%$, в III группе - $54,9 \pm 5,6\%$.

Табл. 19.

Параметры ФВ ЛЖ до и после операции ($M \pm m$).

	Показатель/Срок	I группа	II группа	III группа
ФВ ЛЖ	До операции	$53,4 \pm 6,4$	$54,5 \pm 5,9$	$54,9 \pm 5,6$
	Через 3 месяца	$55,7 \pm 4,8$	$55,9 \pm 4,5$	$55,9 \pm 4,4$
	Через 6 месяцев	$56,2 \pm 4,7$	$54,3 \pm 3,5$	$56,9 \pm 3,9$
	Через 1 год	$57,4 \pm 4,1$	$55,2 \pm 2,9$	$57,1 \pm 3,7$
	Через 3 года	$58,1 \pm 3,9$	$55,2 \pm 2,9$	-
	Через 5 лет	$57,9 \pm 3,8$	$54,1 \pm 3,4$	-
	Через 7 лет	$58,1 \pm 3,9$	$54,3 \pm 3,5$	-

Установлено, что ФВ ЛЖ увеличилась у пациентов всех групп в сроки до 1 года. В дальнейшем в I и III группах наблюдался дальнейший рост данного показателя ($p < 0.05$). Во II группе показатель ФВ ЛЖ начал снижаться с 6 месяцев до 1 года после операций, в основном за счёт снижения ФВ ЛЖ у пациентов ($p < 0.05$), перенесших ИМ в этот период (Табл. 19).

Во всех клинических наблюдениях было зафиксировано нарушение локальной сократительной способности ЛЖ, при отсутствии значимых различий между группами ($p > 0,05$). Регистрировались проявления как гипо-, так и акинезии различных сегментов ЛЖ. Структура нарушений локальной систолической функции ЛЖ представлена на рис. 85-87.

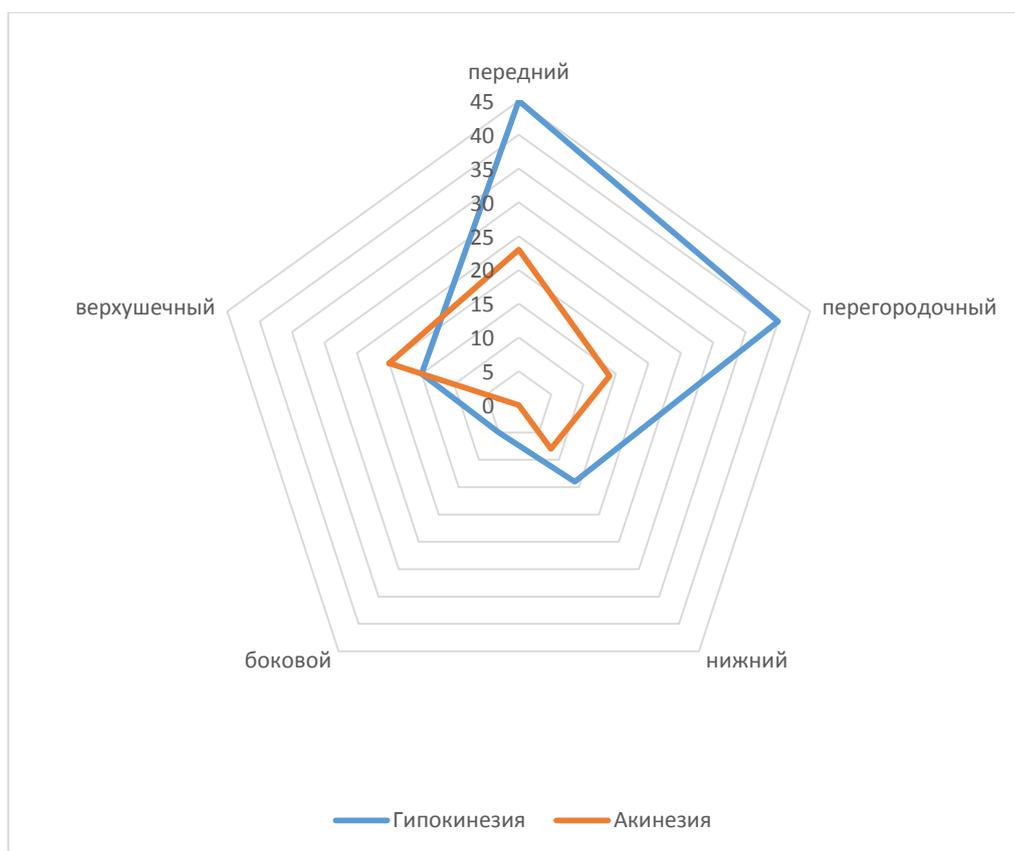


Рис. 85. Нарушения локальной систолической функции ЛЖ (верхушечные сегменты).

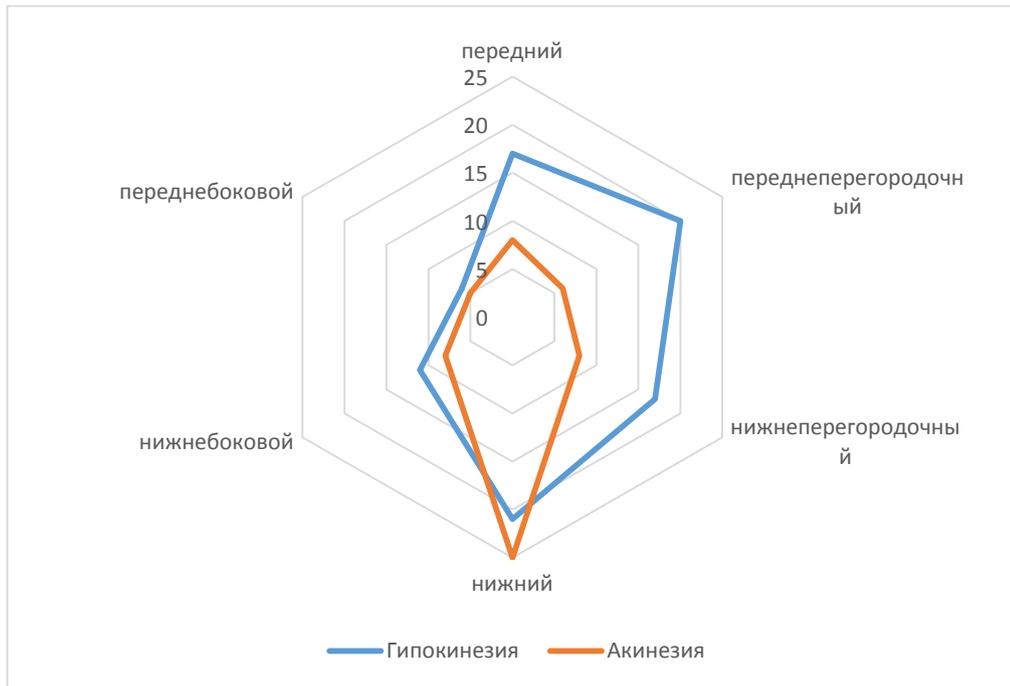


Рис. 86. Нарушения локальной систолической функции ЛЖ (средние сегменты).

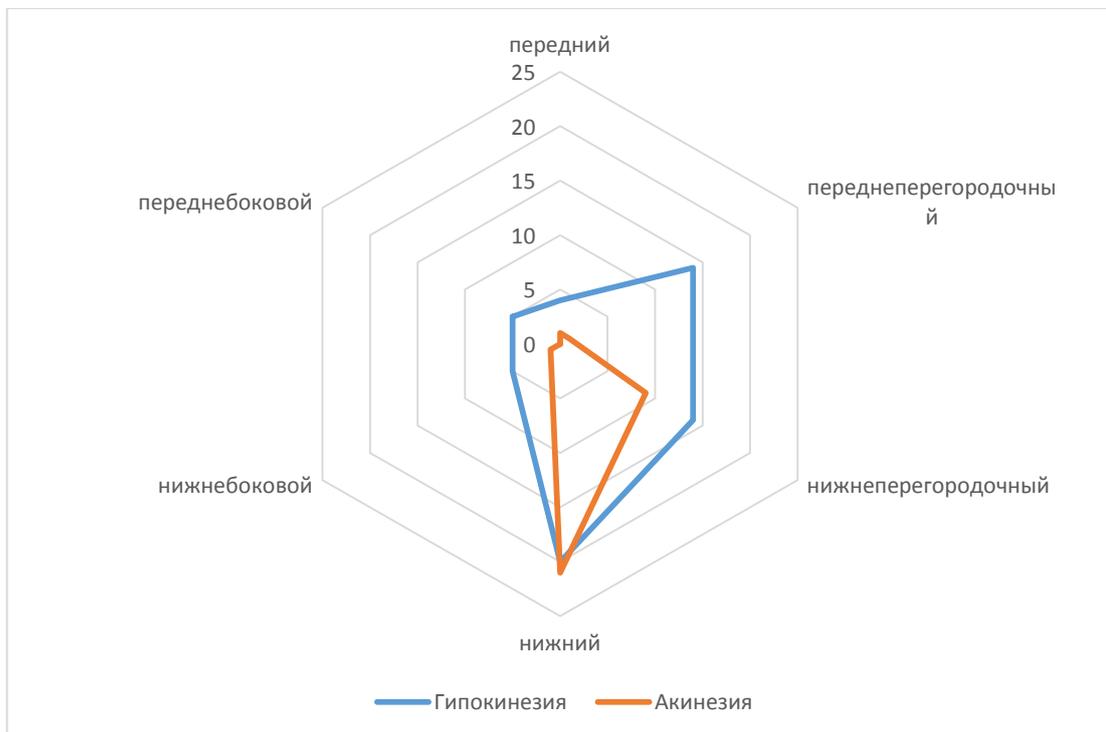


Рис. 87. Нарушения локальной систолической функции ЛЖ (базальные сегменты).

Выявлено, что наибольшие изменения во всех группах наблюдались в следующих сегментах:

- верхушечные сегменты – передний и передне-перегородочный;
- средние сегменты – передний, передне-перегородочный, ниже-перегородочный и нижний;
- базальные сегменты – передне-перегородочный, нижний и ниже-перегородочный.

Через 6 месяцев, 12 месяцев, 3 года, 5 и 7 лет после операции проведены контрольные обследования. Суммировано количество выявляемых зон гипо- и акинезии в группах пациентов, и проведено сравнение групп (Табл. 20).

Табл. 20.

Динамика показателей сегментарной сократимости ЛЖ ($M \pm m$).

Вид нарушения	Группа	До операции	Месяцы		Годы			
			3	6	1	3	5	7
Акинезия	I группа	1,8±0,4	1,7±0,5	1,4±0,5	1,0±0,7	1,2±0,6	1,1±0,6	1,1±0,5
	II группа	2,2±0,4	2,2±0,4	2,0±0,7	2,2±0,7	2,1±0,6	2,0±0,3	2,0±0,6
	III группа	2,1±0,4	2,0±0,4	1,8±0,6	1,6±0,4	-	-	-
Гипокинезия	I группа	1,6±0,4	1,3±0,5	0,8±0,4	0,6±0,4	0,5±0,4	0,4±0,2	0,4±0,4
	II группа	1,25±0,5	1,2±0,6	1,1±0,5	0,9±0,5	1,0±0,4	0,9±0,5	0,9±0,4
	III группа	1,4±0,4	1,3±0,4	1,0±0,5	0,7±0,3	-	-	-

Выявлено, что КШ в комплексе с методикой ЮрЛеон (I и III группы) способствует восстановлению дисфункциональных, но жизнеспособных сегментов. При анализе показателей локальной сократимости миокарда до оперативного вмешательства в I группе, среднее количество зон гипокинезии было $1,6 \pm 0,4$, а сегментов акинезии $1,8 \pm 0,4$. После операции через две недели количество сегментов гипокинезии незначительно снизилось до $1,3 \pm 0,5$ ($p > 0,05$), сегментов акинезии - $1,7 \pm 0,5$ ($p > 0,05$). Уже через 6 месяцев после операции мы увидели явное продолжающееся снижение количества сегментов гипокинезии $-0,8 \pm 0,4$ ($p < 0,05$), а сегментов акинезии становилось недостоверно меньше $-1,4 \pm 0,2$ ($p > 0,05$). Через 12 месяцев после операции количество сегментов гипокинезии уменьшилось до $0,6 \pm 0,2$ ($p < 0,05$), а акинезии до $1,0 \pm 0,5$ ($p < 0,05$). Через 12 месяцев, 3 года, 5 и 7 лет мы отметили достоверное уменьшение зон гипокинезии миокарда по сравнению с до- и послеоперационными значениями ($p < 0,05$).

При анализе показателей локальной сократимости миокарда в контрольной группе, где выполнялось изолированное КШ, до оперативного вмешательства количество сегментов гипокинезии составило $1,25 \pm 0,5$, сегментов акинезии - $2,2 \pm 0,4$. После операции через две недели количество сегментов гипокинезии снизилось до $1,2 \pm 0,6$ ($p > 0,05$), а сегменты акинезии оставались на прежнем уровне - $2,2 \pm 0,4$ ($p > 0,05$). Через 6 месяцев после операции не отмечено никакой динамики в сторону улучшения или ухудшения сократительной способности миокарда. Через год отмечено увеличение сегментов акинезии до $2,2 \pm 0,7$ ($p < 0,05$) за счёт уменьшения зон гипокинезии. В отдалённом периоде (год и более) не было отмечено никаких изменений сегментарной сократимости миокарда.

В III группе показатели дооперационного нарушения сократимости миокарда ЛЖ были на уровне $2,1 \pm 0,4$ зоны акинезии и $1,4 \pm 0,4$ зоны

гипокинезии. Через 3 месяца после операции не было отмечено значимого изменения данных показателей ($p > 0.05$). Положительная динамика отмечалась, начиная с 6 месяцев, со снижением показателей нарушения сократимости ЛЖ до $1,6 \pm 0,4$ сегментов акинезии и $0,7 \pm 0,3$ сегментов гипокинезии ($p < 0,05$).

Таким образом, наблюдается увеличение глобальной сократительной способности миокарда ЛЖ и уменьшение зон нарушения локальной сократимости миокарда ЛЖ у всех пациентов, однако более выраженная динамика отмечена у пациентов, которым операцию реваскуляризации миокарда дополняли методиками ЮрЛеон.

7.3.4. Результаты исследования перфузии миокарда.

После хирургического лечения в различные сроки после операции 347 пациентам проведено скintiграфическое исследование миокарда. Сроки проведения исследования после операции варьировали от 24 до 58 мес.

По результатам проведённой скintiграфии миокарда с ^{99m}Tc -технетрилом (покой и нагрузка) была проведена оценка динамики коронарной перфузии у обследуемых пациентов до и в различные сроки после операции. Скintiграфия выполнена пациентам до операции, после операции и через 12 месяцев, 3 года, 5 и 7 лет.

При анализе перфузии использовали полуколичественный анализ, при котором оценивали:

- показатели нарушения перфузии при нагрузке (SSS);
- показатели нарушения перфузии в покое (SRS);
- степень выраженности ишемии (SDS).

В целом, улучшение перфузии миокарда в трехлетний летний период выявлено во всех группах пациентов. Наиболее выраженная положительная динамика была зарегистрирована при нагрузке. При этом у пациентов I группы показатель SSS, свидетельствующий о степени нарушения перфузии при

нагрузке, снизился в среднем с 17,4 до 8 баллов ($p < 0,05$), а показатель SDS, отражающий выраженность стресс-индуцированной ишемии, с 10,1 до 2 баллов ($p < 0,05$). Во II группе пациентов динамика указанных показателей была не столь существенной: SSS и SDS снизились с 20 до 18 и с 10 до 8 баллов, соответственно ($p > 0,05$). В III группе отмечено снижение показателя SSS с 18,8 до 9 баллов, а SDS - с 11 до 5 баллов.

Показатель SRS, отражающий степень нарушения перфузии в покое, в I группе снизился недостоверно в течение первых 3-х лет, а у пациентов II группы даже несколько вырос с 12,8 до 16,5 баллов ($p < 0,05$). Такая динамика (хоть и незначительная) данного показателя у пациентов I группы объясняется размером зоной истинно рубцового поражения и восстановлением незначительного количества гибернированного миокарда в постинфарктной зоне. В III группе в течение первых трёх лет SRS недостоверно снизился с 13,5 до 12,6 баллов ($p > 0,05$).

В дальнейшем производили сравнение лишь пациентов I и II группы. Через 5 лет наблюдения в I группе показатели нарушения перфузии миокарда снизились: SSS - с 17,4 до 6 баллов, SDS - с 10,1 до 1 балла, а SRS - с 15,8 до 12,8 баллов ($p < 0,05$). В II группе также отмечена положительная динамика: снижение SSS с 20 до 14 баллов, SDS - с 10 до 7 баллов, а SRS - с 12,8 до 10,8 баллов, однако данное снижение было незначимым ($p > 0,05$).

Через 7 лет наблюдения показатели первой группы значимо не изменились: SSS - 5 баллов, SDS - 1 балл, а SRS - 12 баллов. Во II группе также не отмечено динамики: SSS - 13 баллов, SDS - 8 баллов, а SRS - 10 баллов.

Анализ данных синхро-ОФЭКТ по размерам зон поражения миокарда в период наблюдения до 3 лет показал, что у пациентов I группы общий дефект перфузии при нагрузке уменьшился в среднем в 2 раза (51,2%), у пациентов II группы - лишь на 27,5%, а у пациентов III группы - на 49,5%. Эти изменения также свидетельствовали об уменьшении зоны стресс-индуцированной ишемии

во всех группах пациентов с более значимым эффектом у пациентов в группе, где выполнялось КШ в сочетании с методиками ЮрЛеон. Кроме того, в I и III группах регистрировалось уменьшение дефекта перфузии в покое на 18,2% и 16%, соответственно, что было связано с восстановлением гибернированного миокарда после реваскуляризации.

Увеличение перфузии миокарда касалось мест, подвергшихся в первую очередь хирургической реваскуляризации либо прилежащих к ним, что привело к улучшению перфузии миокарда и снижению преходящих дефектов перфузии как через 6, 12 месяцев, так и через 3 года, 5 и 7 лет после операции. Однако кроме того было установлено, что зоны рубцового поражения, слабого накопления радиофармпрепарата, в которых не было выполнено шунтирование хирургическим методом во II группе – не претерпевали изменения в ближайшем и отдалённом послеоперационном периоде. В I же группе прослеживалось улучшение показателей перфузии, особенно в отдалённом послеоперационном периоде (более 3 лет). Сопоставляя результаты до- и послеоперационных сцинтиграмм, было установлено, что наиболее высокие показатели улучшения перфузии миокарда после КШ в сочетании с методиками ЮрЛеон получены в зонах, где до операции были выявлены достоверно обратимые дефекты перфузии.

Необходимо отметить, что выполнение реваскуляризации миокарда, как прямыми, так и непрямыми методами, является оправданным только при наличии достаточного количества гибернированного миокарда в искомой зоне. Выполнение сцинтиграфии миокарда с нагрузкой позволяет выявить наличие гибернированного миокарда не только в сокращающихся зонах миокарда ЛЖ, но и в зоне рубца. При наличии большой зоны рубцового поражения, в которой имеется недостаточное количество гибернированного миокарда, мы отказывались от выполнения реваскуляризации, прогнозируя отсутствие

значимого клинического эффекта от проведённой операции. Демонстрацией может служить следующий клинический пример.

Пациент С., 49 лет, поступил в НМХЦ им. Н.И Пирогова с жалобами на одышку при минимальной физической нагрузке. Из анамнеза известно, что клиника стенокардии возникла в 2019 году. В январе 2019 года перенёс инфаркт миокарда. Был госпитализирован по месту жительства. В экстренном порядке выполнена коронароангиография. Выявлено многососудистое поражение коронарного русла: ПМЖА - стеноз 90% (выполнена имплантация стента); ОВ - окклюзия; ПКА - окклюзия (Рис.88).

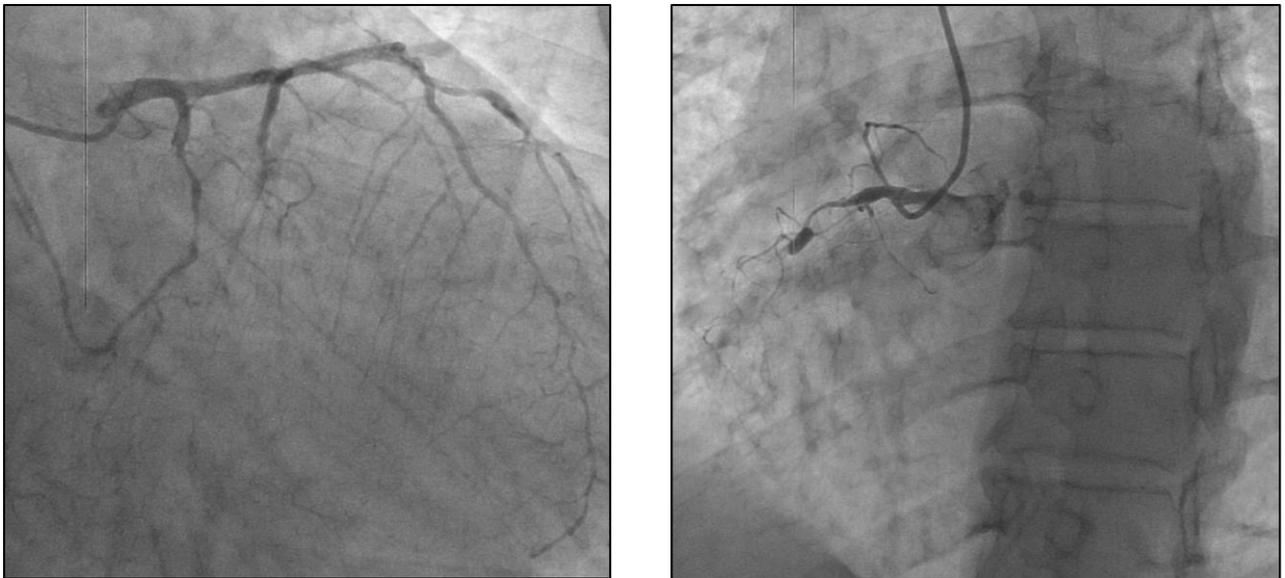


Рис. 88. Пациент С., 49 лет. Коронарография. Слева – ангиография ЛКА. Справа – ангиография ПКА.

При ЭхоКГ: КДО ЛЖ 220 мл, МЖП 1,3 см, Зст. 1,3см, систолическая функция ЛЖ выражено снижена, ФВ 30% (Simpson); акинезия верхушки ЛЖ, апикальной и средней частей МЖП; задней и боковой стенок ЛЖ (на всех уровнях), гипокинезия переднебоковой стенки ЛЖ; патологических изменений клапанного аппарата нет.

На основании жалоб, анамнеза, данных обследования был поставлен клинический диагноз:

Основное заболевание: ИБС: безболевая форма стенокардии. Постинфарктный кардиосклероз (ИМ от 01.2003.) Стенозирующий атеросклероз КА (стент ПМЖА без признаков рестеноза; ОВ - окклюзия; ПКА окклюзия).

Фоновое заболевание: Гипертоническая болезнь 3 стадии, риск 4. Артериальная гипертензия 3 степени.

Осложнение основного заболевания: ХСН III степени (NYHA).

Учитывая наличие выраженной ишемической перестройки ЛЖ, с целью выявления гибернированного миокарда в области рубцового поражения ЛЖ, решено выполнить сцинтиграфию миокарда.

По результату радионуклидной томографии миокарда с ^{99m}Tc -Технетрилом выявлено наличие рубцового поражения 40% миокарда ЛЖ. В бассейне стентированной ПМЖВ нарушений перфузии миокарда выявлено не было. Гибернированный миокард в недостаточном количестве (менее 7%) выявлялся в области переднебоковой стенки ЛЖ (Рис. 89).

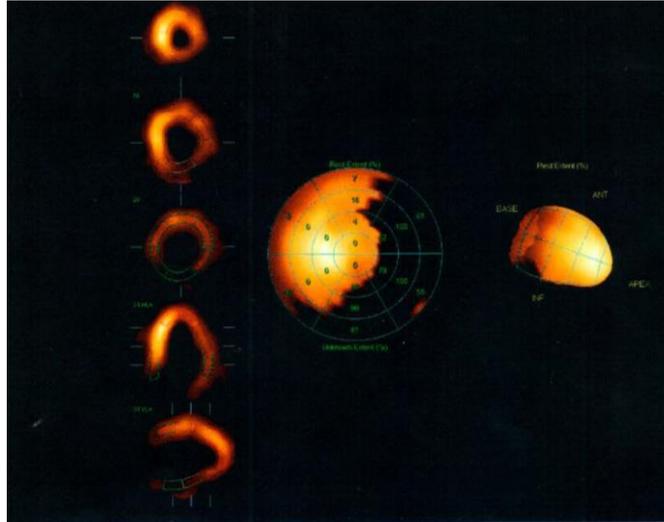


Рис. 89. Пациент С., 49 лет. Синхро-ОФЭКТ с ^{99m}Tc -технетрилом.

Учитывая значительное рубцовое повреждение ЛЖ, отсутствие значимого количества гибернированного миокарда, решено от выполнения реваскуляризации миокарда отказаться. Пациенту рекомендована трансплантация сердца.

7.3.5. Результаты коронарошунтографии.

Коронарошунтография (КШГ) выполнена у 158 больных в послеоперационном периоде. Необходимо отметить, что выявление окольных источников кровоснабжения миокарда – технически сложная задача. Для этого необходимо выполнение селективного контрастирования многих мелких артерий, при этом желательно использовать методику по Рентропу (контрастирование шунтирующей артерии, при этом баллоном закрывается основная артерия, кровоснабжающая миокард). Проведение такого рода манипуляций у пациентов, перенёсших открытую реваскуляризацию миокарда,

а в ряде случаев имеющих диффузное поражение коронарного русла, не позволяющее при необходимости выполнить эндоваскулярную коррекцию, сопряжено с чрезвычайным риском [70].

КШГ проводилась по строгим медицинским показаниям в ближайшем послеоперационном периоде и при необходимости контроля в отдалённые сроки во всех группах пациентов (табл. 21).

Табл. 21.

Количество коронарошунтографий в группах.

Группа	Кол-во КШГ	Сроки выполнения					
		3 месяца	6 месяцев	1 год	3 года	5 лет	7 лет
I группа	76	15	26	13	10	7	5
II группа	69	20	19	11	7	6	6
III группа	13	5	5	3	-	-	-

КШГ позволила установить, что дополнительные экстракардиальные источники кровоснабжения миокарда формируются у пациентов не ранее чем через 3 месяца после операции. Частота выявления не прямых источников реваскуляризации миокарда была выше во II и III группах, однако учитывая отсутствие объективных критериев выявления данных сосудов, статистический анализ не проводился.

Иллюстрацией экстракардиальной реваскуляризации миокарда может послужить рисунок 90. Хорошо видно, как *a. pericardiacophrenica* в средней трети распадается на развитую систему коллатералей, идущую к верхушке ЛЖ.



Рис. 90. Коронарошунтография после выполнения КШ, дополненного методикой «ЮрЛеон I». Стрелками указаны а. pericardiacophrenica и сосудистая сеть.

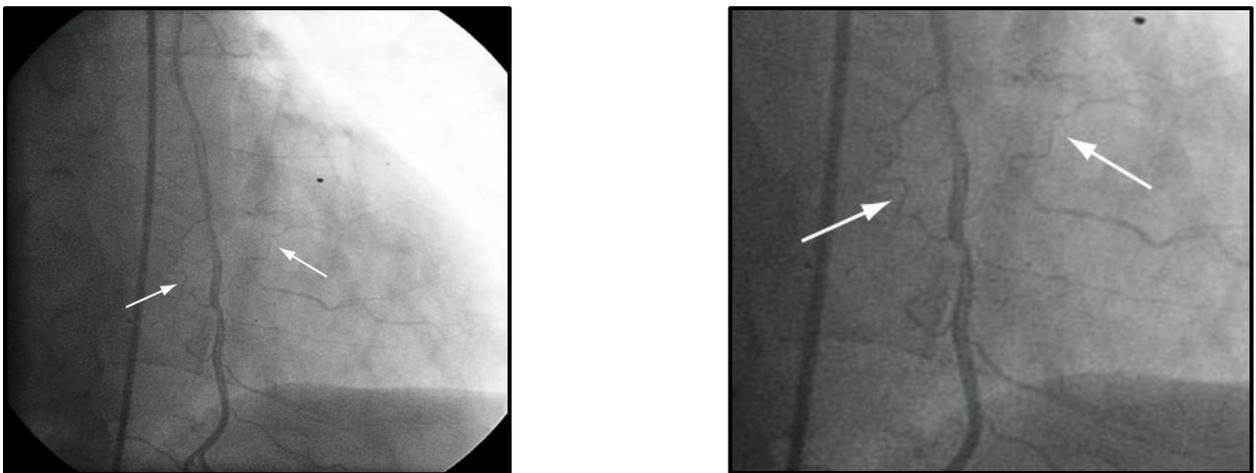


Рис. 91. Ангиография после КШ. Стрелками указана ветвь левой ВГА, прорастающая в эпикард.

На рисунке 91 видна ветвь левой ВГА, прорастающая в эпикард. Несмотря на малую объёмную скорость кровотока этого «природного» пути реваскуляризации, данный механизм играет существенную роль в кровоснабжении и ремоделировании сердечной мышцы.

Таким образом, сочетание КШ с методиками ЮрЛеон у пациентов, у которых выполнение полной реваскуляризации не представляется возможным,

приводит к улучшению их самочувствия, повышает КЖ в отдалённые сроки после операции. Эффективность методики определяется возрастанием сократительной способности миокарда, обусловленной увеличением региональной перфузии миокарда. Представленные материалы свидетельствуют в пользу эффективности и безопасности методик ЮрЛеон.

7.4. Оценка качества жизни до операции, в ближайший и отдалённый периоды.

Для оценки изменения КЖ больных, после КШ, дополненного методикой ЮрЛеон I (I-я группа), и стандартного КШ (II группа), а также после КШ, дополненного методикой ЮрЛеон II, в динамике (контрольные наблюдения: исходно, через 12 месяцев, через 30 месяцев, через 48 месяцев и через 84 месяца) применялся критерий Манна-Уитни. Оценка КЖ проводилась с использованием опросника SF-36.

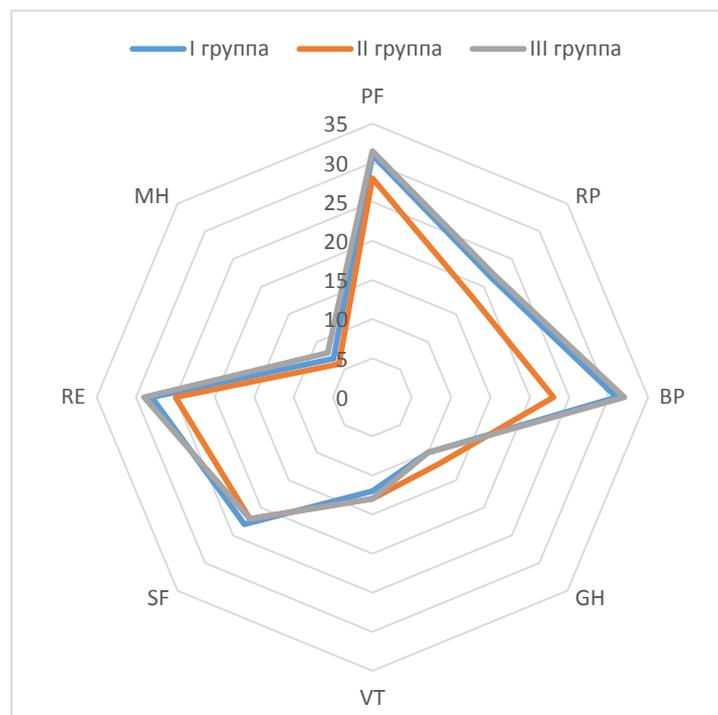


Рис. 92. Оценка качества жизни (прирост показателей через 12 месяцев).

Через 12 месяцев (Рис. 92) во всех группах статистически значимо улучшился показатель КЖ: RP (ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием), средний прирост значения показателя в I группе через 12 месяцев после операции составил 21,5, во II группе - 18, в III группе - 22 ($p < 0,05$), а также PF (физическое функционирование): I группа - 30,2, во II группа - 28, III группа - 31,5 ($p < 0,05$). В I и III группах прирост этого показателя более существенный за счёт уменьшения болевой составляющей: показатель BP (интенсивность боли) в I группе прибавка 30,5, во II 23, а в III 32 балла. Показатели GH (общее состояние здоровья), MH (психическое здоровье), VT (жизненная активность), SF (социальное функционирование), RE (ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием) в абсолютном выражении увеличились в исследуемых группах через 12 месяцев наблюдений.

Через 30 месяцев наблюдений по сравнению с исходным состоянием улучшаются показатели КЖ по всем группам, однако более существенная динамика отмечена в I и III группе (Рис. 93). Показатели PF, BP, RE возросли на 40, 55 и 33 бала в I группе ($p < 0,05$), соответственно, а в III группе - на 38, 65 и 32 балл ($p < 0,05$), соответственно. Напротив, во II группе отмечается незначимый рост этих показателей - 28, 26 и 25 баллов ($p > 0,05$), соответственно. Остальные показатели не претерпели значительных изменений по отношению к их росту в течение первого года.

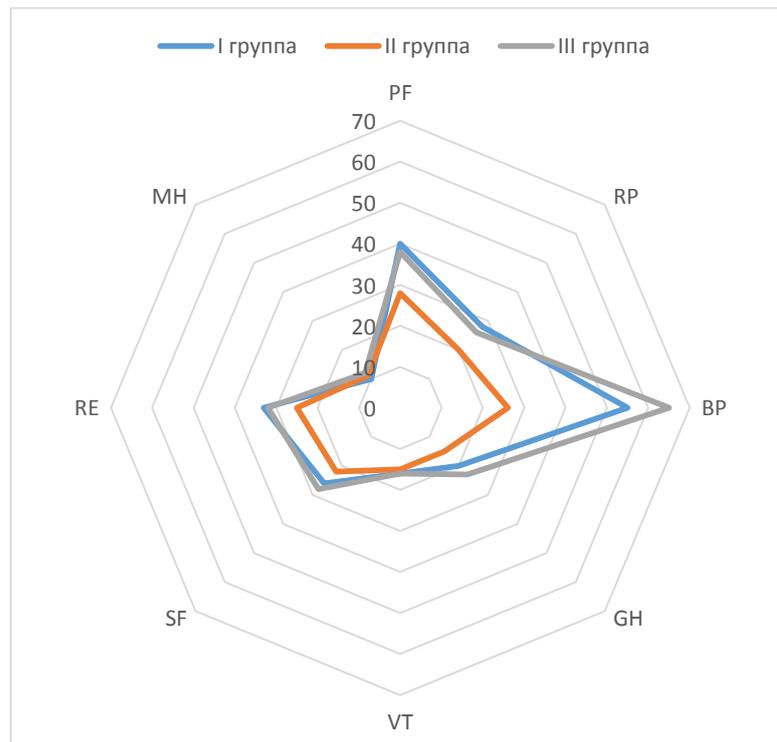


Рис. 93. Оценка качества жизни (прирост показателей через 30 месяцев).

В отдалённом периоде (48 месяцев и более) была проанализирована динамика только в I и II группе (Рис. 94).

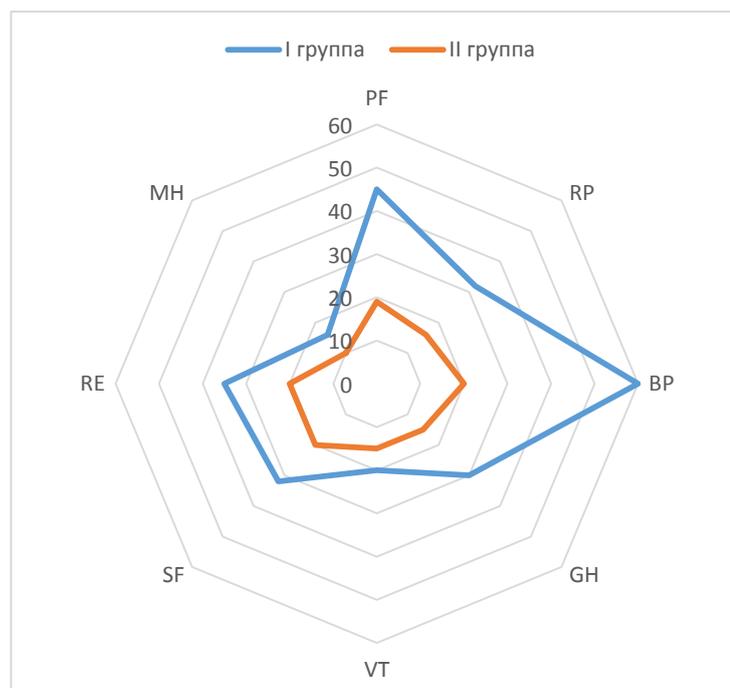


Рис. 94. Оценка качества жизни (прирост показателей через 48 месяцев).

Отмечена положительная динамика у пациентов, которым хирургическая реваскуляризация миокарда была дополнена методикой ЮрЛеон I. Наиболее выраженная динамика прослеживается по шкалам RF, BP, GH, SF и RE ($p < 0,05$). В это же время во II группе отмечена отрицательная динамика по ряду шкал: PF, RP, BP, SF и RE ($p < 0,05$).

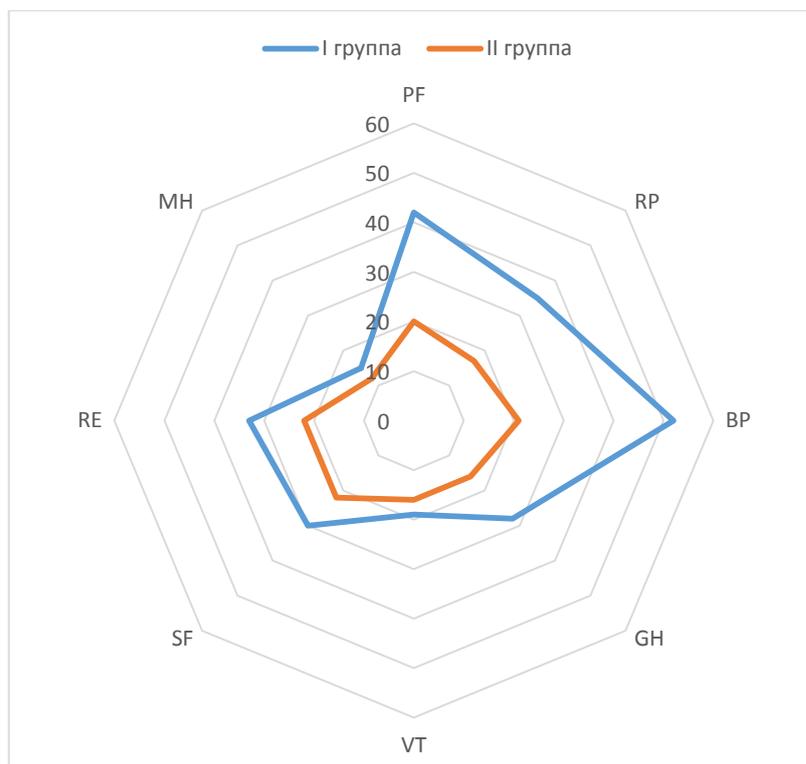


Рис. 95. Оценка качества жизни (прирост показателей через 84 месяцев).

На момент завершения исследования наблюдаемая ранее тенденция в рассматриваемых группах сохранилась (Рис.95).

7.5. Клинико-инструментальный анализ состояния пациентов в отдалённом периоде.

В ходе исследования отдельно были сформированы 2 группы пациентов:

1. Пациенты, которым выполнено изолированное КШ (n=35);

2. Пациенты, перенёвшие КШ, дополненное методикой ЮрЛеон I (n=31).

Пациенты были сопоставимы по основным клинико-лабораторным показателям и объёму проводимой операции (шунтирование передней межжелудочковой артерии левой внутренней грудной артерией, а также аутовенозное шунтирование бассейна ОА и ПКА). Поводом для анализа этих групп послужили повторные обращения за медицинской помощью. Все больные были комплексно обследованы в условиях стационара. Сроки поступления от 2 до 3 лет после операции.

Поводом для обращения за помощью в стационар у пациентов 1 группы чаще были жалобы на боли за грудиной с иррадиацией в шею, левую лопатку и левую руку, одышка. Во 2 группе подобных жалоб было значительно меньше ($p < 0.05$). 4 пациента 1 группы были доставлены в стационар с острым коронарным синдромом (табл. 22).

Табл. 22.

Жалобы больных при поступлении в стационар.

Показатель	I группа (n=35)	II группа (n=31)	p
стенокардитические боли	16 (45,7%)	3 (9,7%)	<0.05
одышка	12 (34,1%)	6 (19,4%)	<0.05
периферические отеки	10 (28,6%)	5 (16,1%)	<0.05
нарушения ритма сердца	12 (34,3%)	8 (25,8%)	>0.05
острый коронарный синдром	4 (11,4%)	0 (0%)	<0.05

Анализ функционального класса стенокардии показал его увеличение в группе пациентов, перенёвших изолированное КШ. Больные 2 группы в 97% имели I-II ФК стенокардии (табл. 23).

Табл. 23.

Распределение пациентов по функциональному классу стенокардии CCS.

Функциональный класс стенокардии (CCS)	I группа (n=35)		II группа (n=31)		p
	абс.	%	абс.	%	
I	10	28,6	25	80,6	<0.05
II	5	14,3	7	22,6	<0.05
III	16	45,7	3	9,7	<0.05
IV	4	11,4	0	0	<0.05

При изучении анамнеза заболевания было выявлено, что 5 пациентов I группы перенесли ИМ после выписки в сроки от 6 месяцев до 1,5 лет после операции, у 5 пациентов были эпизоды развития нестабильной стенокардии (Табл. 24).

Табл. 24.

Острые коронарные события после операции.

Событие	I группа (n=35)	II группа (n=31)	p
нестабильная стенокардия	8 (22,9%)	1 (3,2%)	<0.05
ИМ	5 (14,3%)	1 (3,2%)	<0.05

Это послужило показанием для выполнения комплексного обследования, включая выполнение ЭхоКГ (в покое и при нагрузке), сцинтиграфии миокарда с нагрузкой и коронарошунтография.

Нагрузочные пробы (велоэргометрия, стресс ЭхоКГ, сцинтиграфия миокарда с нагрузкой) выявили ишемию миокарда у 22 (62,9%) пациентов I группы и 4 (12,9%) - II группы (p<0.05).

Результаты коронарошунтографий представлены в таблице 24.

Табл. 25.

Функционирование коронарных шунтов при КШГ.

Коронарный шунт	I группа (n=35)		II группа (n=31)		p
	абс.	%	абс.	%	
ЛВГА-ПМЖВ	29	82,9	28	90,3	>0.05
Аутовена-ОА	7	20	5	16,1	>0.05
Аутовена-ПКА	6	17,1	1	3,2	>0.05

Выявлено, что у 83% пациентов 1 группы (n=29) и 90% 2 группы (n=28) определяется удовлетворительное функционирование шунта ЛВГА-ПМЖВ, у оставшихся 7 пациентов шунт не работал. При ревизии же аутовенозных шунтов было обнаружено, что 80% шунтов к ОА и более 80% шунтов к ПКА не контрастируются при исследовании в обеих группах. Таким образом, в сроки до 3 лет произошла окклюзия 10% аутоартериальных (ЛВГА) шунтов к ПМЖА и 85% аутовенозных шунтов к ПКА и ОА. Анализ наличия дополнительных источников кровоснабжения миокарда обнаружил признаки экстракардиального кровоснабжения миокарда в виде множественных мелких сосудистых сетей из ветвей ЛВГА, френо-перикардиальных ветви, ветвей передних средостенных артерий, межрёберных артерий у пациентов 2 группы.

12 пациентам 1 группы и 1 пациенту второй группы с документированной ишемией миокарда выполнена операция баллонной ангиопластики и стентирования коронарных артерий. Послеоперационный период протекал гладко.

Таким образом, в группе пациентов, которым выполнено КШ, дополненное методикой ЮрЛеон I констатировано весьма хорошее состояние оперированных и весьма удовлетворительные показатели качества жизни при не работающих аутовенозных, а в ряде случаев и маммарокоронарных шунтах в отдалённом послеоперационном периоде. При комплексном анализе причин этого явления, мы можем объяснить такие хорошие результаты только

состоявшейся в отдалённые сроки экстракардиальной реваскуляризацией сердца, что подтверждается данными ангиографических исследований.

Выполнение изолированного КШ (I группа пациентов) также сопровождается нарушением функционирования 17% аутоартериальных и более 80% аутовенозных шунтов, однако при отсутствии резервных источников кровоснабжения миокарда, это приводит к формированию ишемии, а в последующем и ИМ у пациентов этой группы.

Примером клинического эффекта от выполнения методики ЮрЛеон I при КШ может служить следующее наблюдение:

Пациент И., 65 лет, поступил в НМХЦ им. Н.И Пирогова с жалобами на приступы давящих загрудинных болей, возникающих при незначительных физических нагрузках, купирующихся приёмом нитроглицерина. Из анамнеза известно, что клиника стенокардии возникла в 2000 году. В июне 2003 года перенёс инфаркт миокарда. С января 2007 года отметил снижение толерантности к физической нагрузке. Обследован в стационаре по месту жительства, выявлены показания для проведения реваскуляризации миокарда. 19.04.2007 госпитализирован в НМХЦ им Н.И. Пирогова для проведения оперативного лечения. При коронарографии выявлено многососудистое поражение коронарного русла: ПМЖА - стеноз 80%; ОВ - окклюзия; ПКА диффузно изменена, проксимальный стеноз 75% (Рис. 96).

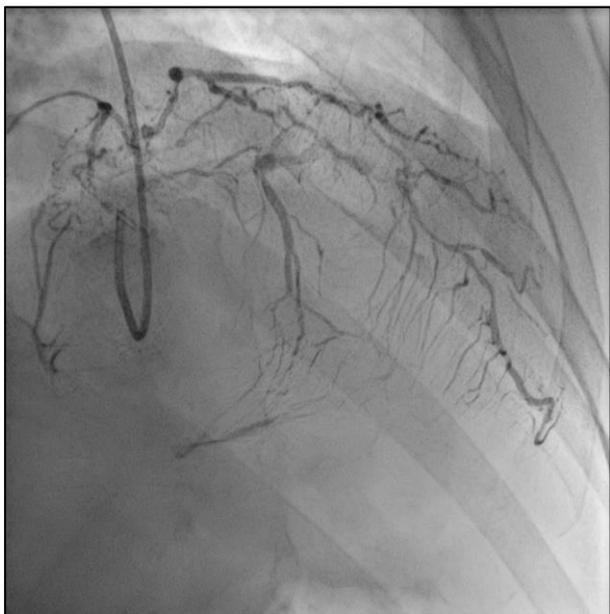


Рис. 96. Пациент И., 65 лет. Коронарография. Слева – ангиография ЛКА. Справа – ангиография ПКА.

При ЭхоКГ: КДО ЛЖ 165 мл, КСО ЛЖ 70 мл, МЖП 1,1 см, Зст. 1,2 см, систолическая функция ЛЖ снижена, ФВ 49% (Simpson); акинезия апикальной и средней частей МЖП; гипокинезия передней и нижней стенок ЛЖ; патологических изменений клапанного аппарата нет.

При сцинтиграфии миокарда выявлен дефект накопления радиофармпрепарата как по передней, так и по задней стенкам ЛЖ. На основании жалоб, анамнеза, данных обследования был поставлен клинический диагноз:

Основное заболевание: ИБС: стенокардия IV ФК. Постинфарктный кардиосклероз (ИМ от 06.2003.) Стенозирующий атеросклероз КА (ПМЖА стеноз 80%; ОВ - окклюзия; ПКА диффузно изменена, проксимальный стеноз 75%).

Фоновое заболевание: гипертоническая болезнь 3 стадии, риск 4. Артериальная гипертензия 3 степени. Сахарный диабет 2 тип, компенсирован по углеводному обмену. Ожирение 3 степени.

Осложнение основного заболевания: ХСН III степени (NYHA).

Сопутствующие заболевания: распространенный атеросклероз внечерепных отделов БЦА и сосудов ног: значимые стенозы бедренно-подколенного сегмента справа 35%, передней большеберцовой артерии слева 80%. Стенозирование ОСА слева 45%, каротидной бифуркации слева 35%, устья ВСА слева 47%, ОСА справа 30%, каротидной бифуркации справа 40%, наружной СА справа 45%. Хроническая обструктивная болезнь лёгких.

По исследуемым шкалам: EUROSCORE II, - 4,2 балла, SYNTAX - 37 баллов. Пациент отнесён к категории высокого риска хирургического вмешательства, однако выявлены показания к выполнению операции открытым способом.

При рассмотрении возможности выполнения открытой реваскуляризации миокарда отмечено, что характер атеросклеротического поражения ПКА носит диффузный характер. Решено выполнить маммарокоронарное шунтирование ПМЖА и аортокоронарное аутовенозное шунтирование ОА. Операция прошла штатно. Во время операции проведена методика ЮрЛеон I с целью стимуляции экстракардиальной реваскуляризации миокарда, особенно в зоне кровоснабжения ПКА – задняя и боковая часть ЛЖ, ПЖ. Пациент из операционной переведён в отделение кардиореанимации, где получал необходимую симптоматическую терапию. На вторые сутки во время удаления дренажей, введена жидкость, выделяющаяся по дренажам с измельченными аутологичными жировыми клетками. После пациент переведён в профильное отделение, откуда был выписан через 6 суток. Через 6 месяцев пациент был осмотрен амбулаторно. Отмечена положительная динамика в плане увеличения толерантности к физической нагрузке (до 100 Вт) и уменьшения дефекта перфузии в области передней и, что особенно важно, задней стенки на нагрузочных сцинтиграммах с 15% до 5% (Рис. 97).

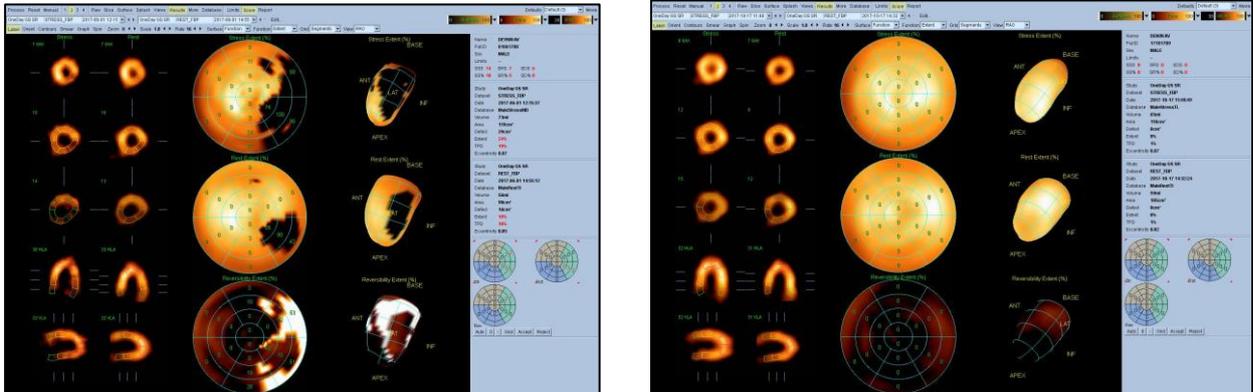


Рис. 97. Пациент И., 65 лет. Синхро-ОФЭКТ с ^{99m}Tc -технетрилом. Слева - до операции. Справа - через 6 мес. после операции: улучшение перфузии миокарда.

Продолжено наблюдение за пациентом. Через 5 лет после первичной операции выполнена контрольная КШГ, показанием для которой явилось подозрение на ишемические изменения при велоэргометрии, проведённой по месту жительства. При КШГ подтверждено функционирование аутоартериального шунта к ПМЖА, однако аутовенозный шунт к ОВ окклюзирован от устья.

При селективной шунтографии ЛВГА, а также при панорамной съёмке и неселективном контрастировании грудного отдела аорты, определяются сосуды, прорастающие из ветвей ЛВГА, а также межрёберных артерий, из мелких ветвей перикарда в миокард (Рис. 98-99).



Рис. 98. Пациент И., 70 лет. КШГ. Слева – селективное контрастирование

ЛВГА (шунт функционирует). Справа – селективное контрастирование ЛВГА (поздняя фаза контрастирования – определяются ветви ЛВГА, прорастающие в миокард).

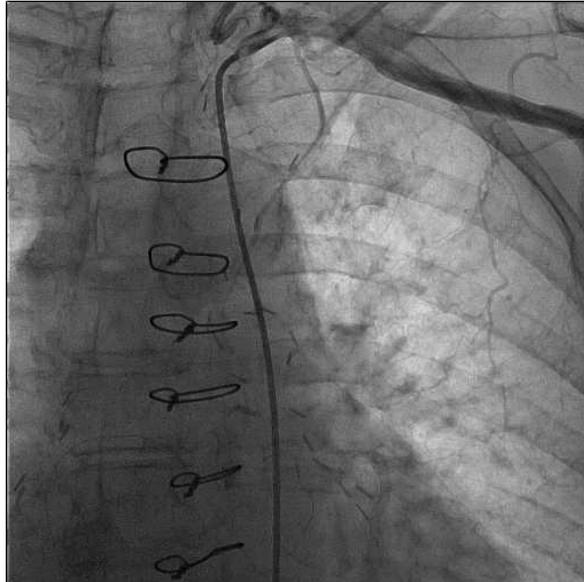


Рис. 99. Пациент И., 70 лет. КШГ. Неселективное контрастирование ветвей грудной аорты.

Выполнена сцинтиграфия миокарда. Отмечается отсутствие ишемических изменений по передней, боковой и задней стенками ЛЖ (Рис.100).

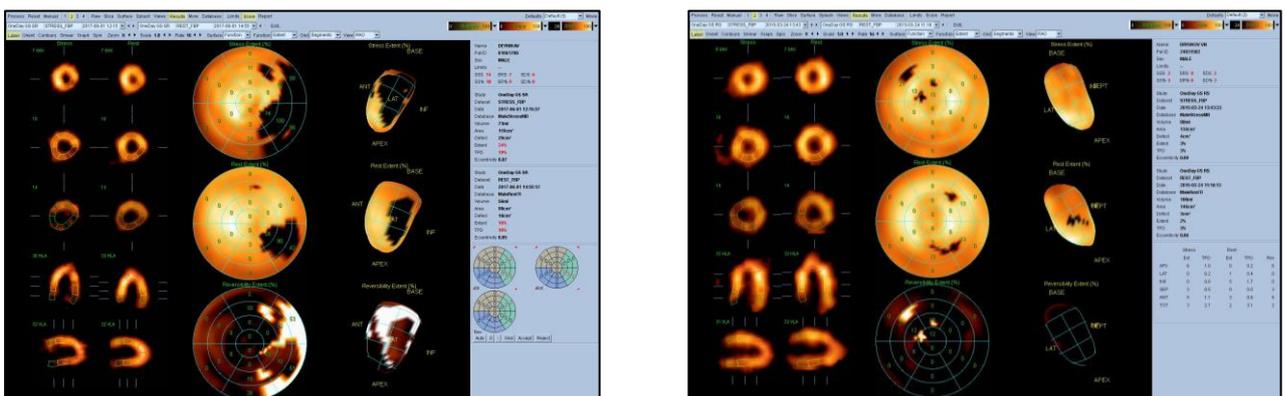


Рис. 100. Пациент И., 70 лет. Синхро-ОФЭКТ с ^{99m}Tc -технетрилом. Слева - до операции. Справа - через 6 л. после операции: улучшение перфузии миокарда.

Нарастание одышки в клинической симптоматике было связано с увеличением массы тела и бесконтрольным приёмом препаратов. Пациенту даны рекомендации.

Последующее обращение за медицинской помощью через 4 года. Пациент снизил массу тела, объективно чувствовал себя удовлетворительно. Жалоб не предъявлял. При контрольной КШГ отмечена окклюзия шунта к ПМЖА, однако от ветвей ЛВГА в перикард прорастают сосуды, по которым идёт коллатеральное кровоснабжение миокарда, кроме того отмечено наличие перикардиальных ветвей и ветвей межрёберных артерий, прорастающих в миокард (Рис. 101).

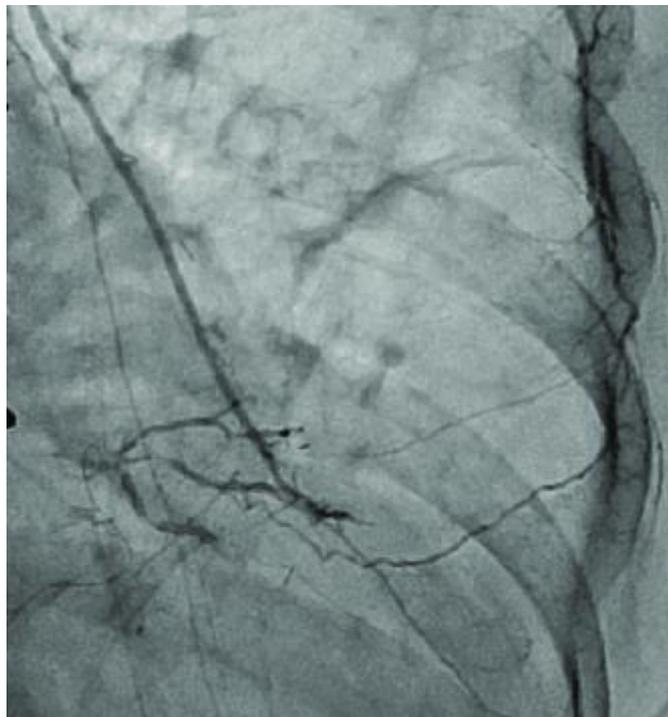


Рис. 101. Пациент И., 74 года. КШГ. Слева – шунтография ЛВГА-ПМЖА. Справа – прорастание ветвей ЛВГА в перикард.

При сцинтиграфии миокарда – без отрицательной динамики.

Таким образом, за 10-летний период наблюдения за пациентом выявлено последовательное окклюзирование изначально аутовенозного, затем аутоартериального шунтов. Однако при этом, в основном за счёт формирования экстракардиальных источников кровоснабжения миокарда, не выявлено нарастания ишемии и формирования ИМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Экстракардиальное кровоснабжение миокарда, как компенсаторный механизм, образуется в различных условиях нарушения естественного коронарного кровотока при патологии венечных сосудов, особенно при инфарктах миокарда, сопровождающихся воспалительными процессами мышцы, эпикарда и перикарда и возникновением между ними спаек; при различных формах перикардита, травмах сердца, сопровождающихся гемоперикардом, а также после операций на открытом сердце. Особенно выраженное прорастание сосудов из различных тканей, окружающих сердце (перикард, жировые ткани, ткань тимуса, грудина, диафрагма), возникает при развитии тяжелых воспалительных, в том числе гнойных, послеоперационных осложнений в средостенье: медиастинит, остеомиелит грудины, хондрит, перикардит, требующие продолжительного лечения и многократных санлирующих вмешательств на послеоперационной ране. Все это засвидетельствовано при многолетней работе в кардиохирургии, наблюдениями за многочисленными такими больными, их лечением и анализом исходов породило желание научиться управлять этими процессами и стимулировать экстракардиальную реваскуляризацию миокарда, как дополнение к традиционному хирургическому лечению ИБС.

История развития хирургических методов лечения больных ИБС насчитывает более века. За это время были предложены различные теории развития атеросклероза и поражения им коронарных сосудов. В 20-30 годы XX века господствовала теория «воспаления», доказывающая роль микроорганизмов в этиологии развития атеросклероза. Затем ведущая роль в этиопатогенезе была отдана холестерину. В разные годы развивались нервно-метаболическая, паразитарная, тромбогенная, иммунологическая, эндотелиальная и другие теории. До настоящего времени генез атеросклероза так до конца и не ясен. Выявлены многочисленные факторы риска его

возникновения и прогрессирования, однако роль каждого из них индивидуальна. Параллельно с развитием учения о патогенезе совершенствовались и методы лечения, как консервативные, так и оперативные. К настоящему времени основными терапевтическими методами лечения являются препараты, направленные на нормализацию липидного спектра крови, минимизацию факторов риска прогрессирования заболевания (гипертонической болезни, сахарного диабета и т.п.), а хирургические методы направлены на восстановления кровотока по поражённой артерии или на создание окольного прямого кровоснабжения миокарда снаружи.

Благодаря комбинации консервативных и оперативных методов лечения увеличивается продолжительность жизни пациентов с ИБС, и улучшается ее качество. Однако, изначальная проблема не решена: до настоящего времени смертность по причине развития сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ИБС, как в России, так и в мире находится на первом месте. Растёт количество пациентов, у которых невозможно восстановить проходимость венечных артерий из-за их малого диаметра или диффузного атеросклеротического поражения, и даже при выполнении относительно полной реваскуляризации миокарда вероятность сохранения дефицита кровоснабжения сердечной мышцы остаётся довольно высокой.

Многолетние наблюдения пациентов, перенёвших операцию реваскуляризации миокарда на открытом сердце, в отдалённом периоде вызывают множество размышлений и ставят многочисленные вопросы:

- чем обусловлен клинический эффект, наблюдаемый многими исследователями после операций Фиески, Вайнберга, Робсена и т.д.;
- почему у пациентов, перенесших более одного ИМ, когда каждый последующий инфаркт изначально вызывает ухудшение состояния, а впоследствии купируются приступы загрудинных болей, улучшается клиническая симптоматика;

- могут ли обширные перикардальные спайки, выявляемые во время операций КШ у подобных пациентов создать природный путь обходного кровоснабжения миокарда из перикарда;
- почему во время операций КШ у пациентов, перенесших синдрома Дресслера, кардиолиз сопровождается выраженной кровоточивостью листков, как эпикарда, так и перикарда, определяются артериальные сосуды, по которым кровь интенсивно поступает в полость перикарда при их рассечении;
- что предотвращает развитие острого ИМ и ухудшение КЖ у ряда пациентов после КШ при окклюзии шунтов (по статистике около 15-20% аутовенозных шунтов не функционируют уже в течение первого года, а порядка 75% шунтов окклюдизируются в последующие 4-5 лет);
- какова причина снижения функционального класса и сердечной недостаточности у части больных, перенёсших гнойно-септические осложнения (перикардит, медиастинит и др.) в раннем или отдалённом послеоперационном периоде операции КШ, когда большая часть шунтов облитерируется, а с клинической точки зрения пациент отмечает уменьшение интенсивности и частоты приступов стенокардии, регрессию СН и, в общем, улучшение КЖ?

Это заставляет пересмотреть роль «ятрогенного» неоангиогенеза, вызванного воздействием на перикард и эпикард у пациентов во время операций на открытом сердце, и предположить, что степень спаечного процесса у части больных и, как следствие, неоангиогенез, будут пропорциональны выраженности хирургической агрессии.

В многочисленных исследованиях было показано, что выполнение прямой хирургической реваскуляризации артерий сердца малого диаметра (менее 1,5 мм) сопряжено с высокой частотой развития тромбоза шунтов, с последующим развитием ИМ реваскуляризуемой зоны. Объясняется данный факт разным диаметром сосуда, несоответствием скорости кровотока в

шунтируемом сосуде скорости крови в питающем его кондуите, а также физиологической неспособностью принимающего сосуда (малый его диаметр, кальциноз и пр.) к столь большому объёму крови. Однако если воспроизвести анастомозирование сосудов сопоставимого диаметра и с соизмеримой скоростью кровотока, то можно улучшить кровоснабжение соответствующей части сердечной мышцы, при этом снизив выраженность стенокардии.

Этого можно достичь, используя окологердечные источники реваскуляризации – ветви внутренней грудной артерии, френо-перикардальные ветви, передние средостенные артерии, межрёберные артерии и пищеводные артериальные ветви. Дистальные ветви указанных артерий имеют диаметр 1-1,5 мм, достаточный кровоток для образования коллатеральной сети, однако существуют ряд проблем, связанных с невозможностью технически анастомозировать сосуды подобного диаметра и, что особенно важно, количество подобных анастомозов должно значимым.

Имеющиеся сегодня подходы к лечению пациентов после ИМ недостаточно эффективны в предотвращении процессов ремоделирования миокарда, поскольку они не обеспечивают замещение утраченных кардиомиоцитов и не стимулируют процессы их регенерации. Развитие науки и техники в XX и XXI веках, интеграция в современную клиническую практику клеточных технологий, применение факторов роста, кардинально изменили представление о возможностях терапевтического и хирургического лечения больных ИБС. Свойства гуморальных факторов роста, стволовых клеток влиять, регулировать и активизировать процессы неоангиогенеза внутри и вокруг сердца, открыли новые горизонты в лечении пациентов с ИБС и диффузным поражением коронарного русла.

Однако при рассмотрении вопросов использования гетерологического или искусственно созданного субстрата для стимуляции процессов неоангиогенеза и репарации в сердце, встаёт проблема трансплантации органов

и тканей человека, а также возможного развития онкологического процесса.

Вышеуказанные причины определили проведение экспериментальных и клинических исследований, направленных на улучшение хирургического лечения пациентов с ИБС и диффузным поражением коронарного русла, путем стимуляции экстракардиальной реваскуляризации. Исследование является проспективным и состояло из следующих основных этапов:

- а. Обоснование методики обработки перикарда и эпикарда на модели ИМ лабораторного животного (кролик) и использования предлагаемой липидно-фибриновой матрицы для стимуляции процессов неоангиогенеза.
- б. Гистологический анализ и обоснование методов обработки перикарда и эпикарда для формирования асептического воспаления и условий, способствующих неоангиогенезу, а также разработка миниинвазивных доступов для проведения вышеуказанной десквамации.

2. Эксперимент *in vitro*:

- а. Анализ содержания факторов роста в различных тканях и жидкостях организма;
- б. Исследование мезенхимальных стволовых клеток в жировой ткани организма;
- в. Разработка липидно-фибриновой матрицы, предназначенной для комплексного воздействия на процессы неоангиогенеза в полости перикарда у пациентов после операций на открытом сердце.

3. Клиническая апробация и внедрение методик в практику. Анализ ближайших и отдалённых (до 7 лет) результатов применения методик в клинической практике.

На первом этапе с целью экспериментального обоснования внедрения предлагаемых методик в клиническую практику выполнили эксперимент *in vivo*. В качестве лабораторных животных выбраны кролики породы «шиншилла». Исследование выполнено на 50 животных в соответствии с ГОСТ

10993.6 – 2009 и с требованиями «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708 н от 23.08.2010). Все манипуляции с животными проведены согласно принципам гуманного отношения к животным в соответствии с Международными рекомендациями, а также с соблюдением биоэтических норм и требований Международного комитета по науке.

Экспериментальное исследование состояло из трёх частей. Во время первой регистрировались основные инструментальные данные, включая ЭКГ и ЭхоКГ. Далее выполняли оперативное вмешательство, направленное на создание искусственного стеноза аорты с целью развития в последующем аварийной гипертрофии миокарда. Затем проводили динамическое наблюдение и обследование лабораторных животных в течение 21 суток.

На 21-23 сутки выполняли вторую часть - оперативное вмешательство, направленное на моделирование инфаркта миокарда у лабораторного животного путем хирургической перевязки ПМЖВ с регистрацией изменений на ЭКГ.

В третьей части была проведена программа стимуляции неоангиогенеза в полости перикарда. Для этого животные были разделены на группы:

1 группа (контрольная, n=15) — в полость перикарда вводили стерильный 0,9% раствор хлорида натрия, других манипуляций в перикарде не проводили. Выполнялось стандартное ушивание операционной раны.

2 группа (1 опытная, n=20) – в полости перикарда выполняли скарификацию перикарда и эпикарда. Полость перикарда ушивалась нитью пролен 6.0. Выполнялось стандартное ушивание операционной раны.

3 группа (2 опытная, n=15) – выполняли скарификацию перикарда и эпикарда. Проводили изъятие перикардального жира для изготовления липидно-фибриновой матрицы, обогащённой тромбоцитами. Затем размещали ее в полости перикарда над местом моделирования ИМ

Через 21-23 суток выводили животных из эксперимента согласно ГОСТ 33215-2014, п.6.11. с проведением аутопсии и гистологического исследования материала.

Полученные результаты показали, что у всех животных после первой экспериментальной операции прогрессивно нарастала мышечная масса сердца с максимальным развитием гипертрофии миокарда к 21 суткам после стенозирования восходящей аорты. По результатам ЭхоКГ в этот срок у всех прооперированных кроликов произошло утолщение стенки ЛЖ по сравнению с исходными показателями на 27% ($p < 0,05$) и увеличение его размеров, что сопровождалось снижением ФВ на 16%, уменьшением КДР и КСР, увеличением скорости кровотока в устье аорты.

Во время второго вмешательства макроскопически у 10% лабораторных животных в перикарде определялся незначительный спаечный процесс. При моделировании ИМ регистрировались изменения ЭКГ, характерные для инфаркта верхушечной области ЛЖ.

При аутопсии животных наблюдали уменьшение опалесценции тканей и минимальное их набухание. Выявлены обширные зоны спаечного процесса между медиастинальной плеврой, перикардом с одной стороны и костальной и стеральной плеврой с другой, а также между эпикардом и перикардом. Спайки были светло-серого цвета, относительно рыхлыми и достаточно легко поддающимися разделению; более плотными - бледно-розового цвета и содержали сосуды.

Степень фибробластной перивазальной инфильтрации и объем волокнистых компонентов косвенно свидетельствовали об активном неоангиогенезе в области ИМ. В опытной группе при гистологическом исследовании выявлены более выраженные явления воспалительной реакции. Следует отметить, что процессы васкуляризации во 2 группе в отличие от других сопровождались созреванием грануляционной ткани с формированием

большого количества полнокровных сосудов и рубца с умеренным количеством фибробластов, аморфного соединительнотканного матрикса с волокнами коллагена. Терминальное сосудистое русло в околоинфарктной зоне достигало максимальной плотности. Причём в опытных группах количество новообразованных сосудов достигало наибольшего значения в сравнении с контрольной серией.

Признаки васкуляризации во всех опытных группах значительно превышали аналогичные в контрольной, при этом в динамике скорость и объём реваскуляризации распределялась от наибольшего в следующем порядке: группа с комплексным воздействием на перикард и эпикард, группа с изолированной скарификацией перикарда и эпикарда, контрольная группа. Максимальные показатели при этом были достигнуты во 2 опытной группе.

Таким образом, в ходе экспериментального исследования показана возможность стимуляции неоангиогенеза для лечения ИБС (ИМ) у экспериментальных животных. Показатели васкуляризации значительно возрастали при применении методик механической обработки перикарда и эпикарда, а также при использовании липидно-фибриновой матрицы.

Для оценки реакции перикарда и эпикарда на различные воздействия внешних факторов при повреждении мезотелиального слоя (десквамации) с целью активации процессов неоангиогенеза, проведена серия клинических исследований. Методом случайной выборки отобраны 15 пациентов, находившиеся на лечении в отделении сердечно-сосудистой хирургии и поступившие для выполнения АКШ. Во время операции часть перикарда площадью 4x4 см подвергали воздействию абразивных и механических (тальк, обработка перчаткой), химических (60% и 96% этиловый спирт, раствор йода 2% спиртовой, сода кальцинированная), физических (локальный нагрев до 80-90оС) факторов. В дальнейшем оценивали реакцию перикарда путем иссечения обработанных участков перикарда и проведения гистологического

исследования.

Основным условием для неоангиогенеза, сопровождающего типичные фазы воспалительного процесса в полости перикарда, является обратимое повреждение пери- и эпикарда с островковым удалением клеток мезотелия без повреждения базальной мембраны. Подобную характеристику повреждения выявили при обработке механическим абразивом. При иных способах обработки создаются преимущественно условия для образования соединительной ткани. Этот эксперимент показал преимущество механического воздействия на перикард и эпикард с целью десквамации клеток мезотелия. Был разработан инструментарий для скарификации перикарда и эпикарда из мини-доступа, который успешно прошёл клинические испытания.

Следующий этап исследования выполняли в клинике. Он был посвящён изучению факторов, стимулирующих ангиогенез у больных ИБС. Для этого исследования проведены в следующих направлениях:

- выбор и исследование гуморальных факторов роста, способных стимулировать образование новых сосудов при ишемии;
- исследование стволовых клеток, способных как к дифференцировке в эндотелиальные клетки, так и к выделению ростовых факторов, обладающих проангиогенным эффектом;
- получение комплексной субстанции, которую можно использовать при хирургической реваскуляризации миокарда для стимуляции ангиогенеза в послеоперационном периоде.

В качестве определяемого источника стимуляции неоангиогенеза был выбран фактор роста эндотелия сосудов - VEGF. Случайным образом были отобраны 22 пациента. При прямой реваскуляризации миокарда проводили забор и подготовку тканевого материала: жировой ткани в области инволютивно изменённого тимуса; жировой ткани эпикарда; участка ЛВГА;

участка перикарда; части большой подкожной вены; фрагмента резецированного ушка правого предсердия. Далее производили подготовку тканевого материала и в лабораторных условиях выполняли выделение белка из него. При помощи иммунофлуоресцентного метода количественно определяли наличие человеческого васкулоэндотелиального ростового фактора (VEGF) в исследуемых образцах. Выявлено, что у пациентов с ИБС в тканях организма содержится VEGF, причём наибольшая его концентрация определялась в жировой ткани эпикардального жира. Второе по значимости депо находилось в ткани инволютивно изменённого тимуса.

Определение содержания данного фактора в течение 3 суток выявило постоянство его концентрации, что позволяет использовать жировую ткань для поддержания постоянной концентрации фактора роста в зоне ишемии.

Полученные результаты позволяют предложить применение ткани эпикардального жира и ЖТ инволютивно изменённого тимуса, как источника факторов стимуляции неоангиогенеза у пациентов с ИБС во время проведения реваскуляризации миокарда. Особого внимания заслуживает возможность использования жидкости, отделяемой по дренажам в послеоперационном периоде КШ. Выявлено, что концентрация VEGF в этом аспирате, превосходит концентрацию данных факторов в периферической крови ($p < 0.05$). Предложенный метод центрифугирования для отделения форменных элементов от исследуемой жидкости позволил уменьшить количество получаемой жидкости с сопоставимой концентрацией фактора роста эндотелия.

Последующие экспериментальные исследования *in vitro* были посвящены исследованию жировой ткани различной локализации на наличие и количество мезенхимальных стволовых клеток. На моделях ишемии миокарда у животных разными авторами показано, что локальное и системное введение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК-ЖТ) способствует увеличению количества сосудов в тканях с нарушенным кровоснабжением и

улучшению перфузии тканей кровью. Данные эффекты обусловлены различными механизмами воздействия выбранных стволовых клеток:

1. МСК-ЖТ секретируют большое количество ангиогенных факторов роста, которые способствуют миграции и пролиферации эндотелиальных клеток и их предшественников, а также формированию новых сосудов;
2. МСК-ЖТ секретируют активаторы плазминогена и матриксные протеазы, способствуя локальному разрушению внеклеточного матрикса и миграции клеток, участвующих в образовании сосудистой стенки, а также высвобождению связанных с матриксом ангиогенных факторов;
3. МСК-ЖТ могут дифференцироваться в гладкомышечные и эндотелиальные клетки, встраивающиеся в растущие сосуды, а также стабилизировать вновь образованные сосуды, выполняя функцию перицитов.

Исследование выполнено, используя аутоматериал пациентов, поступивших для выполнения хирургической реваскуляризации миокарда. Оно состояло из нескольких этапов: интраоперационного – изъятие и подготовка тканевого материала; подготовка клеточной суспензии; культивирование клеток и определение количества клеток в единице объёма выделенного тканевого материала. Выявлено, что в эпикардиальной жировой ткани и жировой ткани в области иволютивно изменённого тимуса содержится больше МСК-ЖТ (в эпикардиальной 12300 ± 100 клеток, в перикардиальной 8400 ± 150 клеток), чем в ткани подкожного жира (6000 ± 100 клеток). К тому же выделение перикардиальной жировой ткани относится к одному из этапов КШ. Это позволило рассмотреть использование данной ЖТ в качестве источника МСК-ЖТ.

Учитывая полученные результаты, основываясь на данных литературы и опыте применения плазмы, обогащённой тромбоцитами, базируясь на взаимодействии фибрина и клеток имплантируемого материала разработана

методика получения липидно-фибриновой матрицы, содержащей тканевые микрографты (депо МСК-ЖТ) и факторы роста (VEGF) для лечения пациентов с ИБС и диффузным поражением коронарного русла.

Полученные данные *in vitro* и *in vivo* позволили внедрить предлагаемые методики в клиническую практику. Изначально была разработана методика ЮрЛеон I, состоящая из 2-х этапов:

1 этап – интраоперационный – включал механическую обработку эпикарда и перикарда с целью их десквамации;

2 этап заключался во введении стерильного дренажного экссудата, отделяющегося по дренажам в 1 сутки после операции интраперикардially на 2 сутки после операции.

Позднее разработанная методика была дополнена методами, доказавшими свою эффективность при исследовании *in vivo*:

На дооперационном этапе - подготовкой обогащённой тромбоцитами плазмы крови.

На операционном этапе – извлечением жировой ткани из полости переднего средостенья и эпикардially жира; подготовкой липидно-фибриновой матрицы; механической обработкой эпикарда и перикарда с целью их десквамации; размещением полученной матрицы и ее фиксацией в перикардially полости;

На послеоперационном этапе - введением дренажного аспирата интраперикардially на 2 сутки после операции.

Каждая из методик изначально прошла через этап оценки безопасности клинического применения, во время которого 40 пациентам (20 пациентов на первичном этапе разработки методики ЮрЛеон I и 20 пациентов методики ЮрЛеон II) во время проведения операции коронарного шунтирования применены предлагаемые методики. Оценены интраоперационные и ранние послеоперационные показатели. Не выявлено осложнений во время проведения

операций, связанных с применением методик ЮрЛеон. Проведён анализ воспалительной реакции организма. Полученные данные свидетельствуют о том, что воспалительный ответ после сочетания операций коронарного шунтирования и стимуляции асептического воспаления в полости перикарда выходит за рамки физиологической воспалительной реакции на хирургическую травму и сопровождается компенсаторной активацией антиперекисных и антипротеолитических механизмов биологической защиты

Бактериологический анализ показал стерильность раны во время всех этапов операции и не выявил признаков инфицирования аспирата, вводимого в полость перикарда.

Проведён инструментальный контроль формирования перикардита посредством выполнения ЭхоКГ в послеоперационном периоде. Выявленный перикардит потребовал дренирования полости перикарда в 2 наблюдениях. У других пациентов признаки перикардита исчезли самостоятельно в отдалённом послеоперационном периоде.

При наблюдении за пациентами в период до года прогрессирование СН не наблюдалось ни у одного из пациентов. ФК стенокардии (CCS) статистически значимо улучшился у всех пациентов. Таким образом, доказана безопасность проводимой методики, выполнен следующий этап исследования для выявления эффективности предлагаемой методики.

В данное исследование было включено 1864 пациента. Проспективно сформированы три группы пациентов. Все они были рандомизированы при поступлении, используя генератор случайных чисел.

I группа (1 опытная, n=865) - традиционную хирургическую реваскуляризацию миокарда дополняли методикой десквамации эпикарда и перикарда, а также дополнительным введением дренажного аспирата в первые сутки после операции. Методика получила название ЮрЛеон I;

II группа (контрольная, n=865) - выполняли общепринятую хирургическую реваскуляризацию миокарда;

III группа (2 опытная, n=134) - традиционную хирургическую реваскуляризацию миокарда дополняли механической обработкой эпикарда и перикарда, введением дренажного аспирата в первые сутки после операции, подготовку и формирование липидно-фибриновой матрицы, размещение её в полости перикарда. Методика получила название ЮрЛеон II.

Во время КШ, дополненного методиками ЮрЛеон, интраоперационных осложнений, связанных с самой методикой, не отмечено.

В раннем послеоперационном периоде на госпитальном этапе лечения (длительностью до 10 суток) все выявленные осложнения были разделены на две группы: некардиальные и кардиальные. При анализе некардиальных осложнений отмечено отсутствие значимых различий между группами по большинству показателей ($p > 0,05$).

Выявлено, что в группе, где была применена методика ЮрЛеон II, отчётливо прослеживалось уменьшение послеоперационной кровопотери по дренажам и, соответственно, снижение потребности в переливании препаратов крови в послеоперационном периоде. В этой группе не было выполнено ни одной рестернотомии с целью остановки кровотечения, что связано с применяемой методикой – концентрат факторов свёртывания крови и тромбоцитов, который находится в липидно-фибриновой матрице, приводит к ускорению процессов тромбообразования в зоне операции в ближайшем послеоперационном периоде, обуславливая снижение кровоточивости повреждённых тканей и, соответственно, уменьшение отделяемого по дренажам. Что привело к отсутствию рестернотомий в III группе. Таким образом, при подготовке кардиохирургической операции, с прогнозируемой большой кровопотерей (большой объем операции с массивным повреждением тканей в средостении, наличие предпосылок для кровотечения), необходимо

рекомендовать применение липидно-фибриновой матрицы для таргетного местного лечения нарушений гемостаза, наряду с применением уже известных гемостатических средств.

При анализе респираторных, неврологических осложнений, нарушений функции других органов и систем значимых различий между группами не выявлено.

Проведён анализ выживаемости в период наблюдения до 84 месяцев (в III группе до 30 месяцев). Общая летальность в I группе за этот период на этапе 84-месячного контроля составила 10,53% (91 больной), во II группе 14,57% (126 больных), в III группе 2,2% (3 больных). Среди всех причин летальности выявлено преобладание кардиальных причин (развитие ИМ, прогрессирование СН). В I группе она составила за период наблюдения 9,14% (79 больных), во II группе - 12,83% (111 больных), в III группе - 2,2% (3 больных). Таким образом, выявлено значимое увеличение продолжительности жизни в группе пациентов, у которых хирургическая реваскуляризация миокарда была дополнена методикой ЮрЛеон I. Ввиду наблюдения за III группой только до 30 месяцев не представляется возможным статистически оценить разницу между группами в отдалённый период, однако в период до 2 лет в III группе отмечена меньшая летальность, чем в I группе.

В дальнейшем проведён анализ функциональных резервов миокарда. Анализ динамики изменения ФК стенокардии наглядно показывает статистически достоверное его снижение в отдалённые сроки после операции в группе, где выполнялась КШ в сочетании с методикой ЮрЛеон I ($p < 0,05$) и при наблюдении в течение 2-летнего периода в III группе ($p < 0,05$). В группе, где выполнялось стандартное КШ показатель снижался в течение первых трёх месяцев, затем наблюдалась отрицательная динамика, что объясняется перенесением ИМ рядом пациентов в этот период.

Проведённый тест 6-минутной ходьбы, показал, что толерантность к физической нагрузке статистически значимо возростала в отдалённые сроки в группе, где выполняли КШ в сочетании с методикой ЮрЛеон I и ЮрЛеон II ($p < 0,05$).

Проведена оценка глобальной и региональной сократимости ЛЖ у пациентов в различные сроки после операции. Выявлено, что КШ в комплексе с методикой ЮрЛеон (I и III группы) способствует восстановлению дисфункциональных, но жизнеспособных сегментов ЛЖ. При анализе показателей локальной сократимости миокарда до оперативного вмешательства в I группе, среднее количество зон гипокинезии было $1,6 \pm 0,4$, а сегментов акинезии - $1,8 \pm 0,4$. После операции через две недели количество сегментов гипокинезии незначительно снизилось до $1,3 \pm 0,5$ ($p > 0,05$), сегментов акинезии - $1,7 \pm 0,5$ ($p > 0,05$). Уже через 6 месяцев после операции зарегистрировали продолжающееся снижение количества сегментов гипокинезии - $0,8 \pm 0,4$ ($p < 0,05$), а сегментов акинезии становилось недостоверно меньше - $1,4 \pm 0,2$ ($p > 0,05$). Через 12 месяцев после операции количество сегментов гипокинезии уменьшилось до $0,6 \pm 0,2$ ($p < 0,05$), а акинезии до $1,0 \pm 0,5$ ($p < 0,05$). Через 12 месяцев, 3 года, 5 и 7 лет отметили достоверное уменьшение зон гипокинезии миокарда по сравнению с до- и послеоперационными значениями ($p < 0,05$).

При анализе показателей локальной сократимости миокарда в контрольной группе, где выполнялось изолированное КШ, до оперативного вмешательства количество сегментов гипокинезии составило $1,25 \pm 0,5$, сегментов акинезии - $2,2 \pm 0,4$. После операции через две недели количество сегментов гипокинезии снизилось до $1,2 \pm 0,6$ ($p > 0,05$), а сегменты акинезии оставались на прежнем уровне - $2,2 \pm 0,4$ ($p > 0,05$). Через 6 месяцев после операции не отмечено никакой динамики в сторону улучшения или ухудшения сократительной способности миокарда. Через год отмечено увеличение сегментов акинезии до $2,2 \pm 0,7$ ($p < 0,05$) за счёт уменьшения зон гипокинезии. В

отдалённом периоде (год и более) не было отмечено никаких изменений сегментарной сократимости миокарда.

В III группе показатели дооперационного нарушения сократимости миокарда ЛЖ были на уровне $2,1 \pm 0,4$ зоны акинезии и $1,4 \pm 0,4$ зоны гипокинезии. Через 3 месяца после операции не было отмечено значимого изменения данных показателей ($p > 0,05$). Положительная динамика отмечалась, начиная с 6 месяцев, со снижением показателей нарушения сократимости ЛЖ до $1,6 \pm 0,4$ сегментов акинезии и $0,7 \pm 0,3$ сегментов гипокинезии ($p < 0,05$).

Таким образом, наблюдается уменьшение зон нарушения локальной сократимости миокарда ЛЖ у всех пациентов, однако более выраженная динамика отмечена у пациентов, которым КШ дополняли методиками ЮрЛеон.

Среди многочисленных методов обследования больных сердечно-сосудистыми заболеваниями особое место занимает радионуклеидное исследование перфузии миокарда ЛЖ сердца – сцинтиграфия миокарда. Чувствительность и специфичность этой методики в выявлении участков ишемии миокарда составляют 80–90%, а постинфарктных рубцовых изменений – 100%. В отличие от коронарографии, которая даёт визуальную информацию о распространённости и степени коронарного стеноза, СинхроОФЭКТ отображает функциональное состояние перфузии миокарда в соответствующей зоне коронарного поражения.

Улучшение перфузии миокарда по данным СинхроОФЭКТ в 3-х летний период выявлено во всех группах пациентов. Наиболее выраженная положительная динамика была зарегистрирована при нагрузке. При этом у пациентов I группы показатель SSS, свидетельствующий о степени нарушения перфузии при нагрузке, снизился в среднем с 17,4 до 8 баллов ($p < 0,05$), а показатель SDS, отражающий выраженность стресс-индуцированной ишемии, с 10,1 до 2 баллов ($p < 0,05$). Во II группе пациентов динамика указанных показателей была не столь существенной: SSS и SDS снизились с 20 до 18 и с

10 до 8 баллов, соответственно ($p > 0,05$). В III группе отмечено снижение показателя SSS с 18,8 до 9 баллов.

Показатель SRS, отражающий степень нарушения перфузии в покое, в I группе снизился недостоверно в течение первых 3-х лет, а у пациентов II группы даже несколько вырос с 12,8 до 16,5 баллов ($p < 0,05$). Такая динамика (хоть и незначительная) данного показателя у пациентов I группы объясняется размером зоны истинно рубцового поражения и восстановлением незначительного количества гибернированного миокарда в постинфарктной зоне. В III группе в течение первых трёх лет SRS не достоверно снизился с 13,5 до 12,6 баллов ($p > 0,05$).

В дальнейшем сравнивали лишь пациентов I и II группы. Через 5 лет и 7 лет наблюдения в I группе показатели нарушения перфузии миокарда значительно снизились ($p < 0,05$). Во II группе также отмечена положительная динамика, однако данное снижение было незначимым ($p > 0,05$).

Анализ данных синхро-ОФЭКТ по размерам зон поражения миокарда в период наблюдения до 3 лет показал, что у пациентов I группы общий дефект перфузии при нагрузке уменьшился в среднем в 2 раза (51,2%), у пациентов II группы - лишь на 27,5%, а у пациентов III группы на 49,5%. Эти изменения также свидетельствовали об уменьшении зоны стресс-индуцированной ишемии во всех группах пациентов с более значимым эффектом у пациентов в группе, где выполняли КШ в сочетании с методиками ЮрЛеон. Кроме того, в I и III группах регистрировалось уменьшение дефекта перфузии в покое на 18,2% и 16%, соответственно, что было связано с восстановлением гибернированного миокарда после реваскуляризации.

Увеличение перфузии миокарда касалось зон, подвергшихся в первую очередь хирургической реваскуляризации либо прилежащих к ним, что привело к улучшению перфузии миокарда и снижению преходящих дефектов перфузии как через 6, 12 месяцев, так и через 3 года, и через 5 и 7 лет после операции.

Установлено, что участки рубцового поражения, слабого накопления радиофармпрепарата, в которых не было выполнено шунтирование хирургическим методом во II группе, не претерпевали изменения в ближайшем и отдалённом послеоперационном периоде. В I же группе прослеживалось улучшение показателей перфузии, особенно в отдалённом послеоперационном периоде (более 3 лет). Сопоставляя результаты до- и послеоперационных сцинтиграмм, установлено, что наиболее высокие показатели улучшения перфузии миокарда после КШ в сочетании с методиками ЮрЛеон получены в зонах, где до операции были выявлены достоверно обратимые дефекты перфузии.

Коронарошунтография выполнена 158 больным в послеоперационном периоде. Она позволила установить, что дополнительные экстракардиальные источники кровоснабжения миокарда формировались у пациентов не ранее чем через 3 месяца после операции. Частота выявления не прямых источников реваскуляризации миокарда была выше во I и III группах, однако, учитывая отсутствие объективных критериев выявления данных сосудов, статистический анализ не проводили.

Качество жизни больного - один из важных критериев оценки эффективности лечения, получивших в последние годы широкое распространение в странах с высоким уровнем развития медицины.

Отмечена положительная динамика у пациентов, которым хирургическая реваскуляризация миокарда была дополнена методикой ЮрЛеон I. Наиболее выраженная динамика прослеживается по шкалам RF, BP, GH, SF и RE ($p < 0,05$). В это же время во II группе отмечена отрицательная динамика по ряду шкал: PF, RP, BP, SF и RE ($p < 0,05$).

Таким образом, учитывая полученные в ходе проведённого исследования данные, можно сделать заключение о том, что КШ, дополненное методами индукции экстракардиальной реваскуляризации миокарда – безопасный и

эффективный метод, улучшающий клинические данные и прогноз. В настоящее время не существует другой альтернативы для применения факторов роста и МСК-ЖТ при хирургическом лечении пациентов с ИБС и диффузным поражением КА, которая бы имела минимальное число негативных эффектов и, в то же время, давала бы больным реальный шанс на положительный эффект терапии.

При этом на основе многолетнего клинико-функционального анализа прослежена динамика различных, жизненно важных клинических, функциональных и гемодинамических показателей у больных с ИБС и диффузным поражением венечных артерий после использования методик ЮрЛеон I и ЮрЛеон II. При подходе к лечению пациентов с ИБС важно учитывать всю совокупность структурных процессов, вызванных нарушениями гемодинамики и использовать весь высокотехнологичный потенциал, имеющийся в настоящее время в арсенале кардиохирургических клиник, включая более широкое использование клеточной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Экстракардиальная реваскуляризация миокарда при его ишемии – это естественный компенсаторный механизм увеличения кровоснабжения миокарда. Как правило, она реализуется через воспалительные процессы (асептической или инфекционной природы), что подтверждается анализом провоспалительных цитокинов у пациентов с асептическим перикардитом после операции (повышение уровней С-реактивного белка, альфа₁-антитрипсина, С-реактивного белка, альфа₂-макроглобулина).
2. Воспроизведение асептического перикардита в эксперименте (ЮрЛеон I), а также применение липидно-фибриновой матрицы (ЮрЛеон II) активируют неоангиогенез с формированием артериоло-капиллярной сети на модели инфаркта миокарда у животных.
3. Концентрация VEGF в эпикардиальном жире (230 ± 30 pg/ml) и экссудате из полости перикарда в 1-е сутки после коронарного шунтирования – ($216 \pm 6,44$ pg/ml), существенно превышает содержание его в плазме крови 80 ± 10 pg/ml ($p < 0.05$). Это позволяет применять их в качестве источников факторов роста сосудов и стимуляции ангиогенеза у пациентов с ИБС. Эпикардиальная (12300 ± 100 МСК в 1 г) и перикардиальная жировая ткань (8400 ± 150 МСК в 1 г), как источника аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, способных не только дифференцироваться в эндотелиоциты и кардиомиоциты, но и обладающих выраженным паракринным эффектом, более эффективна при хирургическом лечении пациентов с ИБС, чем применение подкожной жировой ткани (6000 ± 100 МСК в 1 г).
4. Липидно-фибриновая матрица является депо факторов роста сосудов (концентрация VEGF $769 \pm 40,44$ pg/ml) и МСК-ЖТ (9500 ± 200 в г жировой ткани), заключённых в фибриновый остов. Она обеспечивает пролонгированное выделение VEGF и создаёт оптимальные условия для неоангиогенеза в полости перикарда. Кроме этого, её применение способствует уменьшению кровопотери

на 49% ($p < 0.05$).

5. Клинический эффект при комплексном лечении этой категории больных развивается через 4-6 месяцев после операции (ФК стенокардии снижается с $3,5 \pm 0,5$ в I группе до $1,5 \pm 0,4$ и с $3,5 \pm 0,5$ в III группе до $1 \pm 0,5$ ($p < 0.05$), улучшаются результаты теста 6-ти минутной ходьбы с 320 ± 19 в I группе до 398 ± 18 , и с 305 ± 15 в III группе до 390 ± 8 ($p < 0.05$).

6. Методики стимуляции экстракардиального ангиогенеза улучшают сократимость миокарда по данным ЭхоКГ (снижение количества сегментов акинезии на 39% в 1 группе, на 11% в 3 группе ($p < 0.05$), сегментов гипокинезии на 78% в 1 группе, на 61% в 3 группе ($p < 0.05$). В группе с изолированным коронарным шунтированием динамика не столь существенна (снижение количества сегментов акинезии на 11%, сегментов гипокинезии на 50% ($p < 0.05$). Перфузия миокарда по данным СинхроОФЭКТ повышалась значимо в сравнении с исходными значениями в группах пациентов, где была применена предлагаемая программа лечения (снижение показателей SSS и SDS, общего дефекта перфузии при нагрузке, зоны стресс-индуцированной ишемии, $p < 0.05$). Во 2 группе пациентов в отдалённом периоде (от 1 года до 7 лет) не выявлено значимой положительной динамики исследуемых показателей ($p > 0.05$).

7. Методики ЮрЛеон улучшают основные показатели качества жизни: ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием (на 35%), физическое функционирование (на 39%), интенсивность боли (снижение на 46%), повседневной деятельности и социального функционирования (на 28%), вне зависимости от исходной степени выраженности нарушений ($p < 0.05$). В группе пациентов, перенёсших изолированное коронарное шунтирование, динамика этих показателей была незначимой (улучшение на 14, 18, 19 и 20%, соответственно) в поздний послеоперационный период (более 2 лет) ($p > 0.05$).

8. Наиболее эффективной методикой активации неоангиогенеза при операции на открытом сердце является абразивная обработка перикарда и

эпикарда (основной компонент методик ЮрЛеон). Применение специальной абразивной перчатки обеспечивает слущивание до 60% мезотелиальных клеток, что в дальнейшем увеличивает адгезивные свойства (на 30%), не повышая риск фиброза.

9. Комплексная реваскуляризация миокарда со стимуляцией экстракардиального ангиогенеза (методики ЮрЛеон I и II) является безопасной и эффективной программой лечения больных ИБС с диффузным поражением коронарного русла; позволила снизить количество повторных коронарных вмешательств в группах пациентов, обращающихся за медицинской помощью и летальность в сравнении с группой изолированного коронарного шунтирования при более чем 7-летнем наблюдении.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При лечении больных ИБС с диффузным поражением коронарного русла целесообразно использовать комплексную реваскуляризацию миокарда со стимуляцией экстракардиального ангиогенеза (методики ЮрЛеон I и II).
2. Методика ЮрЛеон I заключается в проведении во время операции коронарного шунтирования механической обработки эпикарда и перикарда с целью их десквамации (использование абразивной перчатки и скальпеля). В послеоперационном периоде собирается стерильный дренажный экссудат из полости перикарда, который центрифугируется (10 мин. При 1000 об/мин., при $r=15$ центрифуги). 50-100 мл центрифугата вводится интраперикардially на 2 сутки после операции при удалении дренажей.
3. Отличие методики ЮрЛеон II заключается в дополнительной подготовке липидно-фибриновой матрицы, которую следует размещать в полости перикарда во время операции коронарного шунтирования.
4. Для получения липидно-фибриновой матрицы следует центрифугировать кровь для отделения слоя плазмы, богатого тромбоцитами (12 мин. при 1500 об/мин., при $r=15$ центрифуги), добавить измельчённую перикардiallyную жировую ткань для создания гомогенной структуры и активировать полученный раствор 10% CaCl_2 в концентрации 100-200 мг/мл для осаждения фибрина.
5. При подготовке кардиохирургической операции с прогнозируемой большой кровопотерей целесообразно применять липидно-фибриновую матрицу для таргетного местного лечения нарушений гемостаза.
6. Тщательно подобранная медикаментозная терапия и динамическое наблюдение имеет особое значение, так как эффект экстракардиальной реваскуляризации миокарда после применения методик ЮрЛеон I и II наступает в течение 4-6 месяцев после проведённой операции.

7. Абразивная обработка эпикарда и перикарда при коронарном шунтировании показана с целью индукции асептического воспаления и стимуляции неоангиогенеза в послеоперационном периоде.
8. При лечении пациентов с ИБС и диффузным поражением коронарного русла целесообразно применять эпи- и перикардальную жировую ткань, а также экссудат из полости перикарда, полученный на 1 сутки после открытой реваскуляризации миокарда, для создания депо факторов роста и мезенхимальных стволовых клеток.
9. Модель стимуляции неоангиогенеза *in vivo* при лечении экспериментального инфаркта миокарда адекватна для изучения особенностей экстракардиальной реваскуляризации миокарда у лабораторных животных из околосердечных источников.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берсенева А.В. Трансплантация клеток пуповинной крови в область повреждения спинного мозга анализ первого клинического наблюдения. // Гены и клетки. 2006. Т. 1. № 1. С. 30-31.
2. Богова О.Т., Чукаева И.И. Инфаркт миокарда. Воспаление и прогноз. // Российский кардиологический журнал. 2003. Т. 4. С. 18-23.
3. Бойцов С.А., Проваторов С.И. Сердечно-сосудистые заболевания в Российской Федерации: основные составляющие смертности и направления профилактики // Вестник Росздравнадзора. 2018. № 5. С. 12-18.
4. Бойцов С.А., Самородская И.В., Никулина Н.Н., Якушин С.С., Андреев Е.М., Заратьянц О.В., Барбараш О.Л. Сравнительный анализ смертности населения от острых форм ишемической болезни сердца за пятнадцатилетний период в РФ и США и факторов, влияющих на ее формирование // Терапевтический архив. 2017. Т. 89. № 9. С. 53-59.
5. Бокерия Л.А., Георгиев Г.П., Голухова Е.З. Возможности использования генных и клеточных технологий для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. // Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания. Креативная кардиология Новые технологии в диагностике и лечении заболеваний сердца». 2004. № 3. С. 19-38.
6. Бокерия Л.А., Гудкова Л.Г. Сердечно-сосудистая хирургия. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. Москва: НЦССХ им. А.Н. Бакулева, 2014. 226 с. с.
7. Бокерия Л.А., Егорова М.О., Маликов В.Е., Беришвили И.И., Теряева Н.Б., Юсифов А.С., Хвичия Л.Э. Биохимическая оценка послеоперационного

- периода при хирургической реваскуляризации миокарда // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2005. Т. 6. № 2. С. 36–41.
8. Бокерия Л.А. Минимально инвазивная хирургия сердца. М.: Медицина, 1998. 92 с.
 9. Борщев Г.Г. Экстравазальная реваскуляризация миокарда в комплексном лечении пациентов с ИБС: исторические предпосылки и современные реалии // Медицинский вестник Юга России. 2015. № 2. С. 4-8.
 10. Бочков П.Н., Константинов Б.А., Гавриленко А.В. Генно-инженерные технологии в лечении хронической ишемии нижних конечностей. ; 9–10: 6–11. // Вестник РАМН. 2006. № 10. С. 6-11.
 11. Бураковский В.И. Первые шаги. Записки кардиохирурга. Т. 34. М: Медицина, 1988.
 12. Волков А.В. Перспективы создания зуба методами тканевой инженерии. // Гены и клетки. 2005. № 1. С. 44-45.
 13. Гавриленко А.В., Воронов Д.А., Бочков Н.П. Комплексное лечение пациентов с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных индукторов ангиогенеза: ближайшие и отдаленные результаты // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. 6. № 3. С. 84-88.
 14. Гавриленко А.В., Воронов Д.А. Генные технологии стимуляции ангиогенеза как инновационное направление в ангиологии и сосудистой хирургии // Ангиология и сосудистая хирургия. 2015. Т. 21. № 2. С. 7-14.
 15. Гавриленко А.В., Воронов Д.А. Результаты комплексного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных

- технологий стимуляции ангиогенеза (часть 1) // Ангиология и сосудистая хирургия. 2015. Т. 21. № 3. С. 7-15.
16. Гавриленко А.В., Воронов Д.А. Результаты комплексного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных технологий стимуляции ангиогенеза (часть 2) // Ангиология и сосудистая хирургия. 2015. Т. 21. № 4. С. 29-34.
 17. Герасимов Ю.В., Фриденштейн А.Я., Чайлахян, Р.К. Дифференцировочные потенции клональных штаммов костномозговых фибробластов. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1986. Т. 6. С. 717-719.
 18. Головкин А.С., Великанова Е.А., Матвеева В.Г. Динамика сывороточного уровня ростовых факторов при терапии инфаркта миокарда стволовыми мезенхимальными клетками в эксперименте. // Гены и клетки. 2011. Т. 6. № 2.
 19. Головнева Е.С., Попов Г.К. Экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия при формировании новой сосудистой сети под воздействием высокоинтенсивного лазерного излучения. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 136. С. 624-626.
 20. Епифанов С.А. Инновационные технологии в реконструктивной хирургии носа: клинико-экспериментальное исследование. дис.. доктора медицинских наук. Москва. 2016. 217 с. с.
 21. Журавский Л.С. Дополнительное кровоснабжение миокарда с помощью тонкокишечного трансплантата // Грудная хирургия. 1965. № 3. С. 34 - 39.
 22. Иванюк Д.И., Турчин В.В., Попандопуло А.Г. Механизмы иммуномодулирующего действия мезенхимных стволовых клеток. // Гены

- и клетки. 2011. Т. 6. № 2. С. 27-31.
23. Ишенин Ю.М. Актуальные вопросы реконструктивной и восстановительной хирургии. Иркутск. 1986. 257-258 с.
25. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Деев Р.В., Мжаванадзе Н.Д. Опыт использования методики терапевтического ангиогенеза в комбинированном лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания. 2017. Т. 18. № S3. С. 66.
24. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Деев Р.В., Мжаванадзе Н.Д., Крылов А.А. Генная индукция ангиогенеза у неоперабельных пациентов с атеросклерозом и сахарным диабетом // Ангиология и сосудистая хирургия. 2018. Т. 24. № 2. С. 33-39.
26. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Деев Р.В., Крылов А.А. Результаты применения методики терапевтического ангиогенеза в комбинации с прямой реваскуляризацией конечности у пациентов с осложненными формами периферического атеросклероза // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания. 2017. Т. 18. № S6. С. 210.
27. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С., Мжаванадзе Н.Д., Крылов А.А., Плакса И.Л., Деев Р.В. Эффективность препарата для терапевтического ангиогенеза в комплексном лечении пациентов с сахарным диабетом и критической ишемией нижних конечностей // Казанский медицинский журнал. 2016. № 5. С. 674-680.

28. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей. // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2011. Т. 3. № 4. С. 32-39.
29. Каримов Х.Я., Саидов А.Б., Исраилов Р.И. Особенности морфологических изменений миокарда крыс с разной устойчивостью к гипоксии после перевязки коронарной артерии. 2001. Т. 131. № 10. С. 477-480.
30. Кирик В.М., Бутенко Г.М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического примене(обзор литературы) // Ж. Акад. мед. наук України. 2010. Т. 16. № 16. С. 576-604.
31. Кнышев Г..В., Фуркало С..Н., Уреуленко В..И. Возможности прогностической оценки состояния коронарного аортокоронарных русла у трансплантатов ишемической и динамики болезнью изменений после больных сердца аортокоронарного шунтирования. Груд. и сердечно-сосуд // Груд. и сердечно-сосудистая хирургия. 1994. Т. 2. С. 27-30.
32. Кононов А..Я., Зайцев В..Т. Способ лечения ишемической болезни сердца. 1992. 4-9 с. А.с. № 4702502/14.
33. Коноплянников М.А., Кальсин В.А., Аверьянов А.В. Стволовые клетки для терапии ишемической болезни сердца: достижения и перспективы. // Клини. практика. 2012. № 3. С. 63-73.
34. Константинова Е.В., Константинова Н.А. Клеточные и молекулярные механизмы воспаления в патогенезе инфаркта миокарда. // Вестник РГМУ. 2010. № 1. С. 60-64.
35. Космачёва С.М., Волк М.В., Потапнев М.П. Стволовые клетки взрослых: проблемы получения, дифференцировки in vitro, перспективы

клинического применения. // Медицинские новости. 2008. Т. 9. С. 5-9.

36. Кругляков К.В., Соколова И.Б., Зинькова К.Н. Дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток в кардиомиоцитарном направлении *in vitro* и *in vivo*. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006. № 4. С. 194-197.
37. Крюков Н.Н., Николаевский Е.Н., Поляков В.П. Ишемическая болезнь сердца (современные аспекты клиники, диагностики, лечения, профилактики, медицинской реабилитации, экспертизы). М.: ООО «ИПК «Содружество», 2010. 63-65 с.
38. Куртова А.В., Зуева Е.Е., Немков А.С. Постинфарктная клеточная регенерационная терапия сердечной мышцы. // Гены и клетки. 2006. Т. 1. № 2. С. 35-43.
39. Луценко С.М. Экспериментальный инфаркт миокарда и коллатеральное кровообращение сердца. // Экспер. хир. 1962. Т. 3. С. 21-25.
40. Михайличенко В.Ю., Самарин С.А. Ангиогенез при инфаркте миокарда и его коррекция трансплантацией мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте. 2015. Т. 151. № 2. С. 98-105.
41. Мыш Г.Д., Непомнящих Л.М. Ишемия миокарда и реваскуляризация сердца. Новосибирск. 1980. 292 с.
42. Мыш Г.Д., Непомнящих Л.М. Компенсаторно-приспособительные меха- // В кн.: Восстановительные процессы и компенсаторные реакции в патологии : материалы к 5 Пленуму общества патофизиологов Сибири и Дальнего Востока / ред. институт Н.г.м. Новосибирск. 1965. С. 261.

43. Непомнящих Л.М., Семенов Д.Е. Апоптоз кардиомиоцитов как крайнее проявление регенераторно-пластической недостаточности миокарда. // Бюл. exper. биол. 2000. Т. 130. № 9. С. 336-341.
44. Никулин В.И. Широкая перикардотомия при хронической коронарной недостаточности // В кн.: Симпозиум по хирургическому лечению коронарной болезни. Москва. 1962. С. 57—58.
45. Огнев Б.В. Оперативные вмешательства на перикарде при сердечной астме // Хирургия. 1952. № 8. С. 66—70.
46. Оппель В.А. Коллатеральное кровообращение. СПб. 1911. 23-24 с.
47. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Перспективы генной терапии сердечнососудистых заболеваний // Вопросы медицинской химии. 2000. Т. 46. № 3. С. 293-310.
48. Петренко А.Ю., Иванов Э.Н., Петренко Ю.А. Стволовые клетки из жировой ткани // Biotechnologia Acta. 2008. Т. 4. № 1. С. 39-48.
49. Петрова Л.В., Кушлинский Н.Е., Ильина Л.В. Фактор роста эндотелия сосудов как показатель гипоксии тканей, его возможная роль в патогенезе плоского лишая слизистой оболочки рта // Вестник дерматологии и венерологии. 2004. № 5. С. 7-8.
50. Повещенко О.В., Колесников А.П., Ким И.И. Способы выделения и условия культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников. // Сибирский научный медицинский журнал. 2008. № 5. С. 90-95.
51. Работников В.С., Власов Г.П., Казаков Э.Н. Техника операции аорто-коронарного шунтирования 3-5 венечных артерий сердца. // Грудная

- хирургия. 1985. Т. 2. С. 51-55.
52. Рейнберг Г.А. Абдоминализация сердца — новый принцип хирургического лечения коронарной болезни // Хирургия. 1957. № 1. С. 16—19.
53. Репин В.С., Ржанинова А.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. М.: РеМеТэкс, 2002. 24-113 с.
54. Рубцов Ю.П., Суздальцева Ю.Г., Горюнов К.В. Регуляция иммунитета мультипотентными мезенхимными стромальными клетками. // Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2012. Т. 4. № 1. С. 24-33.
55. Сагарадзе Г.Д., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю. Терапевтический потенциал секреторных компонентов мезенхимных стромальных клеток человека: проблема стандартизации. // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. № 6. С. 750-759.
56. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. // Гены и клетки. 2005. № 2. С. 39-42.
57. Сухих Г.Т., Спивак Н.Я., Малайцев В.В. Мезенхимальные стволовые и прогениторные клетки. Биологические свойства и перспективы использования. // Фізіол. журн. 2007. Т. 53. № 1.
58. Флоря Г.В. Роль ремоделирования левого желудочка в патогенезе хронической недостаточности кровообращения // Кардиология. 1997. № 5. С. 63–70.
59. Хубулава Г.Г., Журавлев В.П., Бирюков А.В. Сравнительная оценка методов защиты миокарда при операциях коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения. // Кардиология и сердечно-

сосудистая хирургия. 2009. Т. 1. С. 51-55.

60. Хубулава Г.Г., Козлов К.Л., Федорец В.Н., Лукьянов Н.Г., Китачев К.В., Мещеряков Д.Н. Особенности проблемы и перспективы реваскуляризации миокарда у пациентов пожилого и старческого возраста // Успехи геронтологии. 2007. Т. 20. № 4. С. 94–105.
61. Хубулава Г.Г., Пайвин А.А., Волков А.М., Оденисюк Д.О., Юрчетсо Д.Л., Любимов А.И. Особенности хирургического лечения рецидива ишемии миокарда у пациентов после коронарного шунтирования // Вестник Северо-Западного государственного медицинского униве. 2009. Т. 1. № 3. С. 21-28.
62. Хулуп Г.Я., Мостицкая С.Ю., Зафранская М.М. Дифференцировочные и иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток как потенциальные механизмы положительного действия при инфаркте миокарда. // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2009. Т. 8. № 1. С. 1-23.
63. Чукаева И.И., Богова О.Т., Корочкин И.М. Инфаркт миокарда и воспаление. // Медицина неотложных состояний. 2007. Т. 11. № 4. С. 19-23.
64. Шаблей В.А., Кучма М.Д., Кирик В.М. Криоконсервирование ткани плаценты человека источник гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. // Гены и клетки. 2012. Т. 7. № 1. С. 54-62.
65. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. // Гены и

- клетки. 2012. Т. 7. № 1. С. 23-33.
66. Шевченко Ю.Л., Борисов И.А., Попов Л.В., Травин Н.О., Стоногин А.В., Березовец И.Г. Хирургическое лечение ишемической болезни сердца: современное состояние проблемы // Качество жизни, № 2, 2003. С. 25-27.
67. Шевченко Ю.Л., Борщев Г.Г., Фомина В.С., Ким К.Ф. Исследование фактора роста эндотелия сосудов у пациентов с ИБС, которым выполняется операция коронарного шунтирования // Гены и клетки. Т. 9. № 1. С. 10-18.
68. Шевченко Ю.Л., Борщев Г.Г. Значение витаминов в ангиогенезе // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2018. Т. 13. № 3. С. 103-109.
69. Шевченко Ю.Л., Борщев Г.Г. Стимуляция ангиогенеза эндогенными факторами роста // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2018. Т. 13. № 3. С. 96-103.
70. Шевченко Ю.Л., Виллер А.Г., Борщев Г.Г., Литвинов А.А. Роль экстра- и интракардиального коллатерального кровообращения у пациентов с хронической формой ИБС // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2018. Т. 13. № 4. С. 10-18.
71. Шевченко Ю.Л., Виллер А.Г. Экстракардиальная реваскуляризация у больных ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования – существующий фактор кровоснабжения миокарда // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2007. Т. 2. № 2. С. 9-14.
72. Шевченко Ю.Л., Матвеев С.А., Махнев Д.А. Эмбриональные

- кардиомиоциты в заместительной клеточной терапии патологии миокарда // 4-й Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». 1997. С. 144.
74. Шевченко Ю.Л., Матвеев С.А., Соловьев И.А. Роль ангиогенеза в норме и патологии // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. 2001. Т. 5. № 1. С. 92-97.
73. _Шевченко Ю.Л., Матвеев С.А., Новожилова А.П., Крейчман Г.С., Соловьев И.А. Культуральные технологии в ангиохирургии // Вестн. Российской Военно-медицинской академии. 2000. № 1. С. 35-39.
75. Шевченко Ю.Л., Матвеев С.А. Имплантация эмбриональных кардиомиоцитов в инвалидный миокард (перспективы заместительной терапии) // Вестн. Российской Военно-медицинской академии. 1999. № 1. С. 94-96.
76. Шевченко Ю.Л., Матвеев С.А. Клеточные технологии в сердечно-сосудистой хирургии. Москва: Медицина, 2005.
77. Шевченко Ю.Л., Пинаев Г.П., Матвеев С.А., Махнев Д.А., Семенова, В.Г., Ерохина И.Л., Емельянова О.И. Экспериментальное обоснование применения эмбриональных кардиомиоцитов для заместительной клеточной терапии патологии миокарда // Физиология человека. 1999. Т. 25. № 4. С. 109-117.
78. Шевченко Ю.Л., Пинаев Г.П., Матвеев С.А., Семенова В.Г., Ерохина И.Л., Махнев Д.А. Первый опыт имплантации эмбриональных кардиомиоцитов (ЭК) человека в комплексном лечении больных ишемической болезнью сердца // 4-й Всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов. 1998. С. 85.

79. Шевченко Ю.Л., Симоненко В.Б., Борщев Г.Г. Экстракардиальная реваскуляризации миокарда при диффузном поражении коронарного русла, как компонент комплексного лечения больных ИБС // Клиническая медицина. 2018. № 11. С. 10-18.
80. Шевченко Ю.Л. Клеточные технологии в кардиологии // Вестн. Российской академии медицинских наук. 2003. № 11. С. 6-10.
81. Шмерлинг М.Д. Морфологические аспекты эффективности реваскуляризации миокарда в эксперименте. Новосибирск. 1968. 47 с.
82. Эстрин С.И. Сравнительная оценка интракоронарного и внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток при рефрактерной стенокардии. // Вісник серцево-судинної хірургії. 2014. Т. 22. С. 410-412.
83. Acquistapace A., Bru T., Lesault P.F., Figeac F., Coudert A.E., le Coz O., Christov C., Baudin X., Auber F., Yiou R., Dubois-Randé J.L., and Rodriguez A.M. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. // Stem Cells. 2011. Vol. 29. No. 5. pp. 812-824.
84. Allen K., Delrossi A., Realyvasquez F., Lefrak E., Shaar C., and Dowling R. Transmyocardial revascularization combined with coronary artery bypass grafting versus coronary artery bypass grafting alone // Circulation. 1998. Vol. 98. No. 1. P. 217.
85. Anker I., Scherjon S.A., Kleijburg-van der Keur C., Noort W.A., Claas F.H., Willemze R., Fibbe W.E., and Kanhai H.H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation // Blood. 2003. Vol. 102. No. 4. pp. 1548-1549.

86. Arminan A., Gandia C., Garcia-Verdugo J.M., Lledó E., Trigueros C., Ruiz-Saurí A., Miñana M.D., Solves P., Payá R., Montero J.A., and Sepúlveda P. Mesenchymal stem cells provide better results than hematopoietic precursors for the treatment of myocardial infarction. // *J Am Coll Cardiol.* 2010. Vol. 55. No. 20. pp. 2244-2253.
87. Arslan F., de Kleijn D.P., and Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. // *Nat Rev Cardiol.* 2011. Vol. 8. No. 5. pp. 292-300.
88. Asahara N., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M., and Isner J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. // *Circ. Res.* 1999. Vol. 85. pp. 221-228.
89. Atluri P., Panlilio C.M., Liao G.P., Suarez E.E., McCormick R.C., Hiesinger W., Cohen J.E., Smith M.J., Patel A.B., Feng, W., and Woo Y.J. Transmyocardial revascularization to enhance myocardial vasculogenesis and hemodynamic function. // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2008. Vol. 135. pp. 283-291.
90. Bagno L.L., Werneck-de-Castro J.P., and Oliveira P.F. Adipose-derived stromal cell therapy improves cardiac function after coronary occlusion in rats. // *Cell Transplant.* 2012. Vol. 21. No. 9. pp. 1985-1996.
91. Barbash I.M., Chouraqui P., Baron J., Feinberg M.S., Etzion S., Tessone A., Miller L., Guetta E., Zipori D., Kedes L.H., Kloner R.A., and Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. // *Circulation.* 2003. Vol. 108. pp. 863-868.

92. Beck C.S. The development of a new blood supply to the heart by operation // *Ann Surg.* Nov. 1935. Vol. 102. No. 5. pp. 801-13.
93. Beck C. Revascularization of the heart. // *Ann. Surg.* 1948. Vol. 4. pp. 854-864.
94. Blatchford J.W., L. R. The first successful cardiorrhaphy // *Ann Thorac Surg.* 1985. No. 39. pp. 492-5.
95. Boodhwani M., Voisine P., Ruel M., Sodha N.R., Feng J., Xu S.H., Bianchi C., and Sellke F.W. Comparison of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 in a swine model of endothelial dysfunction // *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008. Vol. 33. No. 4. pp. 645-50.
96. Bunting K.D. ABC Transporters as Phenotypic Markers and Functional Regulators of Stem Cells. // *Stem Cell.* 2002. Vol. 20. pp. 11-20.
97. Busso N., Masur S.K., Lazega D., Waxman S., and Ossowski L. Induction of cell migration by prourokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells // *The Journal of Cell Biology.* 1994. No. 126. pp. 259-270.
98. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease // *Nat Med.* 2003. Vol. 9. pp. 653-60.
99. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. // *Nat Med.* 2000. Vol. 6. No. 4. pp. 389-95.
100. Cashman T.J., Gouon-Evans V., and Costa K.D. Mesenchymal stem cells for cardiac therapy: practical challenges and potential mechanisms. // *Stem Cell Rev.* 2013. Vol. 9. No. 3. pp. 254-265.
101. Ceccaldi C., Bushkalova R., Alfarano C., Lairez O., Calise D., Bourin P.,

- Frugier C., Rouzaud-Laborde C., Cussac D., Parini A., Sallerin B., and Fullana S.G. Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. // *Acta Biomater.* 2014. Vol. 10. No. 2. pp. 901-911.
102. Chazaud B., Hittinger L., Sonnet C., Champagne S., Le Corvoisier P., Benhaiem-Sigaux N., Unterseh T., Su J., Merlet P., Rahmouni A., et al. Endoventricular porcine autologous myoblast transplantation can be successfully achieved with minor mechanical cell damage. // *Cardiovasc Res.* 2003. Vol. 58. No. 2. pp. 444-450.
103. Chen J., Guo R., Zhou Q., and Wang T. Injection of composite with bone marrow-derived mesenchymal stem cells and a novel synthetic hydrogel after myocardial infarction: a protective role in left ventricle function. // *Kaohsiung J Med Sci.* 2014. Vol. 30. No. 4. pp. 173-180.
104. Chu V..F., Giaid A., and J. K. Angiogenesis in transmural revascularization // *Ann. Thorac. Surg.* 1999. Vol. 68. pp. 301- 308.
105. Colombo R..F., Torrente Y., Casati R., Benti R., S. C., Salani S., D'Angelo M.G., A. D., Scarlato G., Bresolin N., and Gerundini P. Biodistribution studies of ^{99m}Tc-labeled myoblasts in a murine model of muscular dystrophy. // *Nucl Med Biol.* 2001 Nov. Vol. 28. No. 8. pp. 935-40.
106. Conejo-Garcia J.R., Benencia F., Courreges M.C., Kang E., Mohamed-Hadley A., Buckanovich R.J., Holtz D.O., Jenkins A., Na H., Zhang L., et al. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A // *Nat Med.* 2004. Vol. 10. No. 9. pp. 950-8.

107. Dai W., Hale S.L., Martin B.J., Kuang J.Q., Dow J.S., Wold L.E., and Kloner R.A. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. // *Circulation*. 2005. Vol. 112. No. 2. pp. 214-223.
108. De Bari C., Dell'Accio F.P., Tylzanowski P., and Luyten F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane // *Arthritis Rheum*. 2001. Vol. 44. No. 8. pp. 1928-1942.
109. Detillieux K.A., Sheikh F., Kardami E., and Cattini P.A. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium // *Cardiovasc Res*. 2003. Vol. 57. No. 1. pp. 8-19.
110. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., and Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. 2006. Vol. 8. No. 4. pp. 315-7.
111. Dong C., Goldschmidt-Clermont P.J. Endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for cardiovascular disease. // *J Interv Cardiol*. 2007. Vol. 20. No. 2. pp. 93–95.
112. Ducret M., Fabre H., Degoul O., Atzeni G., McGuckin C., Forraz N., Mallein-Gerin F., Perrier-Groult E., Alliot-Licht B., and Farges J.C. Immunophenotyping Reveals the Diversity of Human Dental Pulp Mesenchymal Stromal Cells In vivo and Their Evolution upon In vitro Amplification. // *Front Physiol*. 2016. Vol. 7. P. 512.
113. Effler D.B. Myocardial revascularization - direct or indirect? // *J. thorac.*

- cardiovasc. 1971. Vol. 61. pp. 498-500.
114. Fauteux M., Svenson O. Pericoronary neurectomy in abolishing anginal pain in coronary disease. // Arch Surg. 1946. Vol. 53. pp. 169-172.
115. Fauteux M. Experimental study of the surgical treatment of coronary disease. // Surg. Gynec. Obstet. 1940. Vol. 71. pp. 151-155.
116. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. // Kidney International. 1999. Vol. 56. pp. 794-814.
117. Fieschi D. Criteri anatomico-fisiologici per intervento chirurgico lieve in malati di infarto e cuore di angina // Arch Ital Chir. 1942. No. 63. pp. 305-10.
118. Fisher P. E., Khomoto T., DeRosa C.M., Spotnitz H.M., Smith C.R., and Burkhoff D. Histologic analysis of transmural channels. // Ann. Thorac. Surg. 1997. Vol. 64. pp. 466 - 472.
119. Fisher S.A., Doree C., Mathur A., and Martin-Rendon E. Meta-Analysis of Cell Therapy Trials for Patients with Heart Failure - An Update // Circ Res. Jan 2015. pp. pii: CIRCRESAHA.114.304386.
120. Fiumana E., Pasquinelli G., Foroni L., Carboni M., Bonafé F., Orrico C., Nardo B., Tsivian M., Neri F., Arpesella G., et al. Localization of mesenchymal stem cells grafted with a hyaluronan-based scaffold in the infarcted heart. // J Surg Res. 2013. Vol. 179. No. 1. pp. 21-29.
121. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. // N Engl J Med/. 1971. Vol. 285. pp. 1182-6.
122. Fraigneau S., Monvoisin A., Clarhaut J., Talbot J., Simonneau C., Kanthou C., and Benzakour O. The vitamin K-dependent anticoagulant factor, protein S,

- inhibits multiple VEGF-A-induced angiogenesis events in a Mer- and SHP2-dependent manner // *Blood*. 2012. No. 120. pp. 5073–5083.
123. Francois-Frank C.A. Signification physiologique de la resection du sympathique dans la maladie de basedow, l'epilepsie, l'idiotie et le glaucome. // *Bull Acad Med Paris*. 1899. Vol. 41. pp. 565-594.
124. Frangogiannis N.G. Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. // *Curr Med Chem*. 2006. Vol. 13. No. 16. pp. 1877-1893.
125. Freedman S.B., Jeffrey Isner M. Therapeutic Angiogenesis for Coronary Artery Disease. REview. // *Ann.Intern.Med*. 2002. Vol. 132. pp. 54-71.
126. Freedom R.M., Wilson G., and Trusler G.A. Pulmonary atresia and intact ventricular septum. // *Scand. J. thorac. cardiovasc*. 1983. Vol. 17. pp. 1-24.
127. Freyman T., Polin G., Osman H., Crary J., Lu M., Cheng L., Palasis M., and Wilensky R.L. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. // *Eur Heart J*. 2006. Vol. 27. No. 9. pp. 1114-1122.
128. Fuchs S., Dib N., Cohen B.M., Okubagzi P., Diethrich E.B., Campbell A., and Macko J. A randomized, double-blind, placebo- controlled, multicenter, pilot study of the safety and feasibility of catheter- based intramyocardial injection of AdVEGF121 in patients with refractory advanced coronary artery disease. // *Catheter Cardiovasc Interv*. Sep 2006. Vol. 68. No. 3. pp. 372-8.
129. Fumihiko S., Yoshiaki T., Junya A., Iekushi K., Dosaka N., Yokoi T., Koibuchi N., Kusunoki H., Aizawa Y., and Morishita R. Hepatocyte Growth Factor, but not Vascular Endothelial Growth Factor, Attenuates Angiotensin II-Induced Endothelial Progenitor Cell Senescence // *Hypertension*. 2009. No. 1. pp. 128-

- 134.
130. Gao F., He T., Wang H., Yu S., Yi D., Liu W., and Cai Z. A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. // *Can J Cardiol.* 2007. Vol. 23. No. 11. pp. 891–898.
131. Garikipati V.N., Jadhav S., Pal L., P. P., Dikshit M., and Nityanand S. Mesenchymal stem cells from fetal heart attenuate myocardial injury after infarction: an in vivo serial pinhole gated SPECT-CT study in rats. // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. No. 6. P. e100982.
132. Gassier N., Wintzer H., Stubbe H., Wullbrand A., and Helmchen U. Transmyocardial laser revascularization: histological features in human nonresponder myocardium. // *Circulation.* 1997. Vol. 95. pp. 371-375.
133. Gittenberger-de-Groot A.C., Sauer U., and Bindl L. Competition of coronary arteries and ventriculo-coronary arterial communications in pulmonary atresia with intact, ventricular septum. // *Int. J. Cardiol.* 1988. Vol. 18. pp. 234-258.
134. Gnecci M., Zhang Z., A. N., and Dzau V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. 2008. Vol. 103. No. 11. pp. 1204-1219.
135. Gregg D. Coronary circulation in health and disease. Philadelphia. 1950. 288 pp.
136. Grines C.L., Watkins M.W., Helmer G., Penny W., Brinker J., Marmur J.D., West A., Rade J.J., Marrott P., Hammond H.K., and Engler R.L. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. // *Circulation.* Mar 2002. Vol. 105. No. 11. pp. 9083-4.
137. Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P.G., and Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo // *Proc Natl Acad Sci USA.*

2000. Vol. 97. No. 25. pp. 13625-13630.
138. Gross L., Blum L., and Silverman G. Experimental attempts to increase blood supply to dogs heart by means of coronary sinus occlusion. // *J. Exp. Med.* 1937. Vol. 65. pp. 91-108.
139. Gulbins H., Meiser B.M., Reichenspurner H., and Reichart B. Cell transplantation--a potential therapy for cardiac repair in the future? // *Heart Surg Forum.* 2002. Vol. 5. No. 4. pp. E28-34.
140. Guo Y., He J., Wu J., Yang L., Dai S., Tan X., and Liang L. Locally overexpressing hepatocyte growth factor prevents post-ischemic heart failure by inhibition of apoptosis via calcineurin-mediated pathway and angiogenesis. // *Arch Med Res.* 2008. Vol. 39. No. 2. pp. 179-188.
141. Hakuno D., Fukuda K., Makino S., Konishi F., Tomita Y., Manabe T., Suzuki Y., Umezawa A., and Ogawa S. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. // *Circulation.* 2002. Vol. 105. No. 3. pp. 380-386.
142. Hamano K., Nishida M., Hirata K., Mikamo A., Li T.S., Harada M., Miura T., Matsuzaki M., and Esato K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results // *Jpn Circ J.* Sep 2001. Vol. 65. No. 9. pp. 845-7.
143. Hannan E.L., Wu C., Smith C.R., Higgins R.S., Carlson R.E., Culliford A.T., Gold J.P., and Jones R.H. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass graft surgery: differences in short-term outcomes and in long-term mortality and need for subsequent revascularization // *Circulation.* Sep 2007. Vol. 116. No. 10.
144. Hardy R.I., Bove K.E., James W.F., Kaplan S., and Goldman L. A histologic

- study of laser-induced transmural channels. // *Lasers. Surg. Med.* 1987. Vol. 6. pp. 563-573.
145. Harken D.E., Black H., Dickson J.F., and Wilson H.E. De-epicardialization: a simple, effective surgical treatment for angina pectoris // *Circulation.* 1955. Vol. 12. No. 6. pp. 955-62.
146. Hatzistergos K.E., Quevedo H., Oskouei B.N., Hu Q., Feigenbaum G.S., Margitich I.S., Mazhari R., Boyle A.J., Zambrano J.P., Rodriguez J.E., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. // *Circ Res.* 2010. Vol. 107. No. 7. pp. 913-922.
147. Haynesworth S.E., Baber M.A., and Caplan A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. // *J Cell Physiol.* 1996. Vol. 166. No. 3. pp. 585-592.
148. Heldin C.H., Miyazono K., and ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins // *Nature.* 1997. No. 390. pp. 465-471.
149. Helisch A., Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. // *Microcirculation.* 2003. Vol. 10. pp. 83-97.
150. Henry T.D., Annex B.H., McKendall G.R., Azrin M.A., Lopez J.J., Giordano F.J., Shah P.K., Willerson J.T., Benza R.L., Berman D.S., et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. // *Circulation.* 2003. Vol. 107. pp. 1359 -1365.
151. Henry T.D., Grines C.L., Watkins M.W., Dib N., Barbeau G., Moreadith R., Andrasfay T., and Engler R.L. Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an

- analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials. // *J Am Coll Cardiol*. Sep 2007. Vol. 50. No. 11. pp. 1038-46.
152. Horvath K. Shedding light on denervation and transmural laser revascularization. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001. Vol. 122. pp. 647-648.
153. House S.L., Bolte C., Zhou M., Doetschman T., Klevitsky R., Newman G., and Schultz J.J. Cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 protects against myocardial dysfunction and infarction in a murine model of low-flow ischemia // *Circulation*. 2003. Vol. 108. No. 25. pp. 3140-8.
154. Hua P., Tao J., Liu J.Y., and Yang S.R. Cell transplantation into ischemic myocardium using mesenchymal stem cells transfected by vascular endothelial growth factor. // *Int J Clin Exp Pathol*. Oct 2014. Vol. 7. No. 11. pp. 7782-8.
155. Huang C.C., Tsai H.W., Lee W.Y., Lin W.W., Chen D.Y., Hung Y.W., Chen J.W., Hwang S.M., Chang Y., and Sung H.W. A translational approach in using cell sheet fragments of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cellular cardiomyoplasty in a porcine model. // *Biomaterials*. 2013. Vol. 34. No. 19. pp. 4582-4591.
156. Hundson C.L., Moritz A.K., and Wearn J.T. The extracardiac anastomoses of the coronary arteries. // *J. exp. Med.* 1932. Vol. 4. pp. 919-925.
157. Huss R.N. Isolation of Primary and Immortalized CD34- Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells from Various Sources. // *Stem cell*. 2000. Vol. 18. pp. 1-9.
158. Ikeuchi M., Tsutsui H., Shiomi T., Matsusaka H., Matsushima S., Wen J., Kubota T., and Takeshita A. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction // *Cardiovasc*

Res. 2004. No. 64. pp. 526 -535.

159. Isner J.M., Vale P., Douglas W., Symes J., Losordo D.W., and Asahara T. Angiogenesis and cardiovascular disease. // *Dialogues in Cardiovascular Medicine*. 2001. Vol. 6. No. 3.
160. Iso Y., Spees J.L., Serrano C., Bakondi B., Pochampally R., Song, Y.H., Sobel B.E., Delafontaine P., and Prockop D.J. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2007. Vol. 354. No. 3. pp. 700-706.
161. Jiang C.Y., Gui C., He A.N., Hu X.Y., Chen J., Jiang Y., and Wang J.A. Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction. // *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008. Vol. 9. No. 8. pp. 630-637.
162. Jin J., Jeong S.I., Shin Y.M., Lim K.S., Shin H., Lee Y.M., Koh H.C., and Kim K.S. Transplantation of mesenchymal stem cells within a poly(lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold improves cardiac function in a rat myocardial infarction model. // *Eur J Heart Fail*. 2009. Vol. 11. No. 2. pp. 147-153.
163. Jonnesco T. Angine de poitrine guerie par la resection du sympathique cervicothoracique. // *Bull Acad Med Paris*. 1920. Vol. 84. pp. 93-102.
164. Kai D., Wang Q.L., Wang H.J., Prabhakaran M.P., Zhang Y., Tan Y.Z., and Ramakrishna S. Stem cell-loaded nanofibrous patch promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in rat model. // *Acta Biomater*. 2014. Vol. 10. No. 6. pp. 2727-2738.
165. Kardami E., Detillieux K., Ma X., Jiang Z., Santiago J.J., Jimenez S.K., and Cattini P.A. Fibroblast growth factor-2 and cardioprotection // *Heart Fail Rev*.

2007. Vol. 12. No. 3. pp. 267-77.
166. Khurana R., Simons M. Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease // *Trends Cardiovasc Med.* 2003. No. 13. pp. 116-22.
167. Kim C., Kesten B., R., and Javier M. Kim C.B., Kesten R., Javier M. Percutaneous method of transmyocardial revascularization. // *Cathet. Cardiovasc. Diag.* 1997. Vol. 40. pp. 223-228.
168. Kim S.J., Depre C., and Vatner S.F. Novel mechanisms mediating stunned myocardium. // *Heart Fail Rev.* 2003. Vol. 8. pp. 143-53.
169. Kim Y.S., Park H.J., Hong M.H., Kang P.M., Morgan J.P., Jeong M.H., Cho J.G., Park J.C., and Ahn Y. TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium. // *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009. Vol. 14. pp. 2845-2856.
170. Kinnaird T. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms / T. Kinnaird, E. Stabile, M.S. Burnett et al. // *Circulation.* 2004. Vol. 109. No. 12. pp. 1543-1549.
171. Kocher T. Ueber Kropfexstirpation und ihre Folgen. // *Arch Klin Chir.* 1883. Vol. 29. pp. 254-337.
172. Koh G.Y., Klug M.G., Soonpaa M.H., and Field L.J. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart // *J Clin Invest.* Sep 1993. Vol. 92. No. 3. pp. 1548-54.
173. Koh G.Y., Soonpaa M.H., Klug M.G., and Field L.J. Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium // *Am J Physiol.* May 1993.

Vol. 264. No. 5 Pt 2. pp. H1727-33.

174. Kohmoto T., Fisher P., Gu A., Zhu S., Yano O., Spotnitz H., Smith C., and Burkhoff D. Does blood flow through holmium: YAG transmyocardial laser channels? *Ann. Thorac. Surg.* - 1996. - Vol. 61. - P. 861-868.) // *Ann. Thorac. Surg.* 1966. Vol. 61. pp. 861-868.
175. Komi Y., Sogabe Y., Ishibashi N., Sato Y., Moriwaki H., Shimokado K., and Kojima S. Acyclic retinoid inhibits angiogenesis by suppressing the MAPK pathway // *Lab Invest.*. 2010. Vol. 90. No. 1. pp. 52-60.
176. Koolwijk P., van Erck M.G., de Vree W.J., Vermeer M.A., Weich H.A., Hanemaaijer R., and van Hinsbergh V.W. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity // *The Journal of Cell Biology.* 1996. Vol. 132. No. 6. pp. 1177-88.
177. Krabatsch T., Schaper F., Leder C., Tulsner J., Thalmann U., and Hetzer R. Histological findings after transmyocardial laser revascularization. // *J. Cardiac. Surg.* 1996. Vol. 11. pp. 326 - 331.
178. Kuzela L., Miller G. Experimental evaluation of direct transventricular revascularization. // *J. thorac. cardiovasc.* 1969. Vol. 57. pp. 770-773.
179. Lagasse E.N., Connors H.A., and Al-Dhalimy M.L. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. // *Nat. Med.* 2000. Vol. 6. pp. 1229 - 1234.
180. Lama V.N., Smith L., and Badri L. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. // *J Clin Invest.* 2007. Vol. 117. No. 4. pp. 989-996.

181. Le Visage C., Gournay O., Benguirat N., Hamidi S., Chaussumier L., Mougenot N., Flanders J.A., Isnard R., Michel J.B., Hatem S., Letourneur D., and Norol F. Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection. // *Tissue Eng Part A*. 2012. Vol. 18. No. 1-2. pp. 35-44.
182. Lee H.W., Lee H.C., Park J.H., Kim B.W., Ahn J., Kim J.H., Park J.S., Oh J.H., Choi J.H., Cha K.S., et al. Effects of Intracoronary Administration of Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Acute Myocardial Infarction in a Porcine Model. // *Yonsei Med J*. 2015. Vol. 56. No. 6. pp. 1522-1529.
183. Lee Y.S., Joo W.S., Kim H.S., and Kim S.W. Human Mesenchymal Stem Cell Delivery System Modulates Ischemic Cardiac Remodeling With an Increase of Coronary Artery Blood Flow. // *Mol Ther*. 2016. Vol. 24. No. 4. pp. 805-811.
184. Lei L., Zhou R., Zheng W., Christensen L.P., Weiss R.M., and Tomanek R.J. Bradycardia induces angiogenesis, increases coronary reserve, and preserves function of the postinfarcted heart // *Circulation*. 2004. Vol. 110. No. 7. pp. 796-80.
185. Levine S.A., Cutler E.C., and Eppinger E.C. Thyroidectomy in treatment of advanced congestive heart failure and angina pectoris. // *New Eng J Med*. 1933. Vol. 209. P. 667.
186. Levit R.D., Landazuri N., Phelps E.A., Brown M.E., García A.J., Davis M.E., Joseph G., Long R., Safley S.A., Suever J.D., et al. Cellular encapsulation enhances cardiac repair. // *J Am Heart Assoc*. 2013. Vol. 2. No. 5. P. e000367.
187. Lezius A. Der operative Verschluss von Bronchialfisteln und Gitterlungen durch Muskelplastiken. // *Arch. f. klin. Chir*. 1938. Vol. 193. P. 493.

188. Li C.L., Jonson G.R. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization. // *Blood*. 1995. Vol. 85. pp. 1472-1479.
189. Li C.Y., Wu X.Y., Tong J.B., Yang X.X., Zhao J.L., Zheng Q.F., Zhao G.B., and Ma Z.J. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. // *Stem Cell Res Ther*. 2015. Vol. 6. P. 55.
190. Loffredo F., Lee R.T. Therapeutic vasculogenesis: it takes two. // *Circ Res*. 2008. Vol. 103. No. 2. pp. 128-130.
191. Loukogeorgakis S.P., De Coppi P. Stem cells from amniotic fluid--Potential for regenerative medicine. // *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016. Vol. 31. pp. 45-57.
192. Madonna R., De Caterina R. Adipose tissue: a new source for cardiovascular repair. // *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2010. Vol. 11. No. 2. pp. 71-80.
193. Madonna R., Geng Y.J., and De Caterina R. Adipose tissue-derived stem cells: characterisation and potencial for cardiovascular repair. // *Arterioscler Thromb Vase Biol*. 2009. No. 29. pp. 1723-1729.
194. Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D., Hardy W.B., Moorman M.A., McIntosh K.R., and Mosca J.D. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. // *J Biomed Sci*. 2003. Vol. 10. No. 2. pp. 228-241.
195. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. // *J Clin Invest*. 1999. Vol. 103. No. 5. pp. 697-

705.

196. Massague J. Type beta transforming growth factor from feline sarcoma virus-transformed rat cells. Isolation and biological properties // *J Biol Chem.* 1984. No. 259. pp. 9756-9761.
197. Massimo C., Boffi L. Myocardial revascularization by a new method of carrying blood directly from the left ventricular cavity into the coronary circulation. // *J. thorac. Surg.* 1957. Vol. 34. pp. 257-264.
198. Mathieu E., Lamirault, G., Toquet C., Lhommet P., Rederstorff E., Sourice S., Biteau K., Hulin P., Forest V., Weiss P., Guicheux J., and Lemarchand P. Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. No. 12. P. e51991.
199. Matsubara K., Matsumoto H., Mizushina Y., Lee J.S., and Kato N. Inhibitory effect of pyridoxal 5'-phosphate on endothelial cell proliferation, replicative DNA polymerase and DNA topoisomerase. // *Int J Mol Med.* 2003. Vol. 12. No. 1. pp. 51-5.
200. Matsubara K., Mori M., Matsuura Y., and Kato N. Pyridoxal 5'-phosphate and pyridoxal inhibit angiogenesis in serum-free rat aortic ring assay // *Int J Mol Med.* 2001. Vol. 8. No. 5. pp. 505-8.
201. Matsumoto K., Nakamura T. Hepatocyte growth factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases // *Kidney Int.* 2001. No. 59. pp. 2023-2038.
202. Maureira P., Marie P.Y., Yu F., Poussier S., Liu Y., Groubatch F., Falanga A., and Tran N. Repairing chronic myocardial infarction with autologous

- mesenchymal stem cells engineered tissue in rat promotes angiogenesis and limits ventricular remodeling. // *J Biomed Sci.* 2012. Vol. 19. P. 93.
203. Mazhari R., Hare J.M. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007. Vol. 4. No. 1. pp. 21-26.
204. Menasché P., Hagege A.A., Scorsin M., Pouzet B., Desnos M., Duboc D., Schwartz K., Vilquin J.T., and Marolleau J.P. Myoblast transplantation for heart failure // *Lancet.* Jan 2001. Vol. 357. No. 9252. pp. 279-80.
205. Menasché P., Hagege A.A., Vilquin J.T., Desnos M., Abergel E., Pouzet B., Bel A., Sarateanu S., Scorsin M., Schwartz K., et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction // *J Am Coll Cardiol.* Apr 2003. Vol. 41. No. 7. pp. 1078-83.
206. Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., Curat C.A., Busse R., and Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. // *Circulation.* 2004. Vol. 110. No. 3. pp. 349-55.
207. Mirhoseini M., Cayton M., Shelgikar S., and Fisher J. Clinical report: Laser myocardial revascularization. // *Lasers. Surg. Med.* 1986. Vol. 6. pp. 459-461.
208. Mirotsov M., Jayawardena T.M., Schmeckpeper J., Gnechi M., and Dzau V.J. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. // *J Mol Cell Cardiol.* 2011. Vol. 50. No. 2. pp. 280-289.
209. Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M., Yanagawa B., Tanaka K., Hao H., Ishino K., Ishida H., Shimizu T., Kangawa K., et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. // *Nat Med.* 2006. Vol. 12. No. 4. pp. 459-465.

210. Motohiro K., Yukio K., Toshikazu N., and Yuichi S. Efficient Extraction by the Liver Governs Overall Elimination of Hepatocyte Growth Factor in Rats // *Farmakology*. 1999. No. 290. pp. 373-379.
211. Mu D., Zhang X.L., Xie J., Yuan H.H., Wang K., Huang W., Li G.N., Lu J.R., Mao L.J., Wang L., et al. Intracoronary Transplantation of Mesenchymal Stem Cells with Overexpressed Integrin-Linked Kinase Improves Cardiac Function in Porcine Myocardial Infarction. // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. pp. 19-155.
212. Mueller R.L., Rosengart T.K., and Isom O.W. The history of surgery for ischemic heart disease. // *Ann Thorac Surg*. 1997. Vol. 63. pp. 869-878.
213. Mueller X.M., Tevaearai H.T., Chaubert P., Genton C.Y., and von Segesser L. K. Does laser injury induce a different neovascularization pattern from mechanical or ischaemic injuries? // *Heart*. 2001. Vol. 85. pp. 697-701.
214. Muinck E.D., Simons M. Re-evaluating therapeutic neovascularization. // *J Mol Cell Cardiol*. 2004. Vol. 36. pp. 25-32.
215. Nagaya N., Kangawa K., Itoh T., Iwase T., Murakami S., Miyahara Y., Fujii T., Uematsu M., Ohgushi H., Yamagishi M., et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. // *Circulation*. 2005. Vol. 112. No. 8. pp. 1128-1135.
216. Nah D.Y., Rhee M.Y. The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction. // *Korean Circ J*. 2009. Vol. 39. No. 10. pp. 393-398.
217. Najimi D.N., Khuu P.A., Lysy M., Jazouli N., Abarca J., Sempoux C., and Sokal E.M. Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? // *Cell Transplant*. 2007. Vol. 16. No. 7. pp. 717-728.

218. Naoki K., Koichi N., Kuniaki N., Morishita R., Kaneda Y., Uenoyama M., Ikeda T., and Fujikawa K. Nonviral Gene Transfer of Human Hepatocyte Growth Factor Improves Streptozotocin-Induced Diabetic Neuropathy in Rats // *Diabetes*. 2005. No. 54. pp. 846-854.
219. Naprstek Z., Rockwell R. J. Some laser applications in cardiovascular research. *Proceedings of the 22nd Annual Conference of Engineering in Medicine and Biology.*, Vol. 34, 1969. P. 6.
220. Neuss S., Becher E., Woltje M., Tietze L., and Jahnen-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. // *Stem Cells*. 2004. Vol. 22. No. 3. pp. 405-414.
221. Nian M., Lee P., Khaper N., and P. L. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. // *Circ Res*. 2004. Vol. 94. No. 12. pp. 1543-1553.
222. Noiseux N., Ghecchi M., Lopez-Illasaca M., Zhang L., Solomon S.D., Deb A., Dzau V.J., and Pratt R.E. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. // *Mol Ther*. 2006. Vol. 14. No. 6. pp. 840-850.
223. O'Shaughnessy L. Surgical treatment of cardiac ischemia // *Lancet*. 1937. No. 1. P. 185.
224. O'Connor W.N., Cash J., Cottrill C.M.G., Johnson L., and Noonan J.A. Ventriculocoronary connections in hypoplastic left hearts. // *Circulation*. 1982. Vol. 66. pp. 1078-1086.

225. Ohnishi S., Sumiyoshi H., Kitamura S., and N. N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. // *FEBS Lett.* 2007. Vol. 581. No. 21. pp. 3961-3966.
226. Ohno T., Yuge T., Kariyazono H., Igarashi H., Joh-o K., Kinugawa N., Kusuhara K., and Hara T. Serum hepatocyte growth factor combined with vascular endothelial growth factor as a predictive indicator for the occurrence of coronary artery lesions in Kawasaki disease. // *Eur J Pediatr.* Feb 2002. Vol. 161. No. 2. pp. 105-11.
227. Ono K., Matsumori A., Shioi T., Furukawa Y., and Sasayama S. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model // *Circulation.* 1995. No. 1. pp. 2552-2558.
228. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Bodine D.M., Leri A., and Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. // *Nature.* 2001. Vol. 410. No. 6829. pp. 701-705.
229. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Bodine D.M., Leri A., and Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium // *Pediatr Transplant.* 2003. Vol. 7. No. Suppl 3. pp. 86-8.
230. Oswald J., Boxberger S., Jørgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhäuser M., and Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. // *Stem Cells.* 2004. Vol. 22. No. 3. pp. 377-384.
231. Otto Beitnes J., Oie E., Shahdadfa A., Karlsen T., Müller R.M., Aakhus S., Reinholt F.P., and Brinchmann J.E. Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function. // *Cell Transplant.* 2012. Vol.

21. No. 8. pp. 1697-1709.
232. Pagani F.D., DerSimonian H., Zawadzka A., Wetzel K., Edge A.S., Jacoby D.B., Dinsmore J.H., Wright S., Aretz T.H., Eisen H.J., and Aaronson K.D. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation // *J Am Coll Cardiol*. Mar 2003. Vol. 41. No. 5. pp. 879-88.
233. Palmen M., Daemen M.J., De Windt L.J., Willems J., Dassen W.R., Heeneman S., Zimmermann R., Van Bilsen M., and Doevendans P.A. Fibroblast growth factor-1 improves cardiac functional recovery and enhances cell survival after ischemia and reperfusion: a fibroblast growth factor receptor, protein kinase C, and tyrosine kinase-dependent mechanism // *J Am Coll Cardiol*. 2004. Vol. 44. No. 5. pp. 1113-23.
234. Panchal V.R., Rehman J., Nguyen A.T., Brown J.W., Turrentine M.W., Mahomed Y., and March K.L. Reduced pericardial levels of endostatin correlate with collateral development in patients with ischemic heart disease. // *J Am Coll Cardiol*. 2004. Vol. 43. pp. 1383-7.
235. Park S.E., Jung N.Y., Lee N.K., Lee J., Hyung B., Myeong S.H., Kim H.S., Suh Y.L., Lee J.I., Cho K.R., et al. Distribution of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSCs) in canines after intracerebroventricular injection. // *Neurobiol Aging*. 2016. Vol. 47. pp. 192-200.
236. Perin E.C., Dohmann H.F., Borojevic R., Silva S.A., Sousa A.L., Mesquita C.T., Rossi M.I., Carvalho A.C., Dutra H.S., Dohmann H.J., et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure // *Circulation*. May 2003. Vol. 107. No. 18. pp. 2294-302.

237. Pifarre R., Jasuja M., Lynch R., and Neville W. Myocardial revascularization by transmyocardial acupuncture. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1969. Vol. 58. pp. 424-431.
238. Pittenger M.F., Martin B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. // *Circ Res.* 2004. Vol. 95. No. 1. pp. 9-20.
239. Planat-Benard V., Menard C., Andre M., Puceat M., Perez A., Garcia-Verdugo J.M., Pénicaud L., and Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. // *Circ Res.* 2004. Vol. 64. No. 2. pp. 223-9.
240. Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., André M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. // *Circulation.* 2004. Vol. 109. No. 5. pp. 656-63.
241. Prager G.W., Breuss J.M., Steurer S., Mihaly J., and Binder B.R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells // *Blood.* 2004. Vol. 103. No. 3. pp. 955-962.
242. Prockop D.G. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. // *Science.* 1997. Vol. 276. pp. 1634-1642.
243. Rahman S., Patel Y., Murray J., Patel K.V., Sumathipala R., Sobel M., and Wijelath E.S. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells // *BMC Cell Biol.* 2005. No. 6. pp. 8-15.
244. Rangappa S., Fen C., Lee E.H., Bongso A., and Sim E.K. Transformation of

- adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes
// *Ann Thorac Surg*. Mar 2003. Vol. 75. No. 3. pp. 775-9.
245. Ratajczak M.Z., Kucia M., Jadczyk T., Greco N.J., Wojakowski W., Tendera M., and Ratajczak J. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? // *Leukemia*. 2012. Vol. 26. No. 6. pp. 1166-1173.
246. Ribatti D. History of research on tumor angiogenesis. Netherlands: Springer, 2009. 125 pp.
247. Roberts A.B., Anzano M.A., Lamb L.C., Smith J.M., Frolik C.A., Marquardt H., Todaro G.J., and Sporn M.B. Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by EGF // *Nature*. 1982. No. 295. pp. 417-419.
248. Ruwhof C., van Wamel A.E., Egas J.M., and van der Laarse A. Cyclic stretch induces the release of growth promoting factors from cultured neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts // *Mol Cell Biochem*. 2000. No. 208. pp. 89-98.
249. Salomon N.W., Page U.S., and Bigelow J.C. Reoperative coronary surgery. Comparative analysis of 6591 patients undergoing primary bypass and 508 patients undergoing reoperative coronary artery bypass // *J. thorac. cardiovasc.* 1990. Vol. 100. pp. 250-260.
250. Schultz A., Lavie L., Hochberg I., Beyar R., Stone T., Skorecki K., Lavie P., Roguin A., and Levy A.P. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: Significance for the development of the coronary artery

- collateral circulation. // *Circulation*. 1999. Vol. 100. pp. 547–52.
251. Segers V.F., Van Riet I., Andries L.J., Lemmens K., Demolder M.J., De Becker A.J., Kockx M.M., and De Keulenaer G.W. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006. Vol. 290. No. 4. pp. 1370-1377.
252. Seiler C. The human coronary collateral circulation // *Eur J Clin Invest*. May 2010. Vol. 40. No. 5. pp. 465-76.
253. Sellke F.W., Wang S.Y., Friedman M., Harada K., Edelman E.R., Grossman W., and Simons M. Basic FGF enhances endothelium-dependent relaxation of the collateral-perfused coronary microcirculation // *Am J Physiol*. 1994. Vol. 267. No. 4. pp. 1303-11.
254. Sen P.K., Udawadia T. E., Kinare S.G., and Parulkar G.B. Transmyocardial acupuncture. // *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1950. Vol. 50. pp. 181–189.
255. Shi Y., Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus // *Cell*. 2003. No. 113. pp. 685-700.
256. Shumacher B., Pecher P., and von Specht B.U. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: First clinical results of a new treatment of coronary heart disease. // *Circulation*. 1998. Vol. 97. No. 7. pp. 645-650.
257. Silva G.V., Litovsky S., Assad J.A., Sousa A.L., Martin B.J., Vela D., Coulter S.C., Lin J., Ober J., Vaughn W.K., et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. // *Circulation*. 2005. Vol. 111. No. 2. pp. 150-156.

258. Siminiak T., Fiszer D., Jerzykowska O., Grygielska B., Kałmucki P., and Kurpisz M. Percutaneous autologous myoblast transplantation in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment--report on two cases // *Kardiol Pol.* Dec 2003. Vol. 59. No. 12. pp. 492-501.
259. Siminiak T., Fiszer D., Jerzykowska O., Grygielska B., Rozwadowska N., Kałmucki P., and Kurpisz M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial // *Eur Heart J.* Jun 2005. Vol. 26. No. 12. pp. 1188-95.
260. Smadja D.M., Cornet A., Emmerich J., Aiach M., and Gaussem P. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. // *Cell Biol Toxicol.* 2007. Vol. 23. No. 4. pp. 223–39.
261. Soeki T., Tamura Y., Shinohara H., Tanaka H., Bando K., and Fukuda N. Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction. // *Cardiolog.* 2000. Vol. 93. No. 3. pp. 168-74.
262. Solomatina M., Plekhanova O., Men'shikova M., Ratner E., Tkachuk V., and Parfenova E. Urokinase Increases the Content and Activity of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 during in Vivo Constrictive Arterial Remodeling // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2005. Vol. 139. No. 3. pp. 283-6.
263. Song H., Kwon K., Lim S., Kang S.M., Ko Y.G., Xu Z., Chung J.H., Kim B.S., Lee H., Joung B., et al. Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions // *Mol Cells.* 2005. Vol. 19. No. 3. pp. 402-7.

264. Sorrell J.M., Baber M.A., and Caplan A.I. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes // *J Cell Physiol.* Jul 2004. Vol. 200. No. 1. pp. 134-45.
265. Stamm C., Westphal B., Kleine H.D., Petzsch M., Kittner C., Klinge H., Schümichen C., Nienaber C.A., Freund M., and Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration // *Lancet.* Jan 2003. Vol. 361. No. 9351. pp. 45-6.
266. Steingen C., Brenig F., Baumgartner L., Schmidt J., Schmidt A., and Bloch W. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. // *J Mol Cell Cardiol.* 2008. Vol. 44. No. 6. pp. 1072-1084.
267. Strauer B.E., Brehm M., Zeus T., Köstering M., Hernandez A., Sorg R.V., Kögler G., and Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans // *Circulation.* Oct 2002. Vol. 106. No. 15. pp. 1913-8.
268. Suzuki H., Murakami M., Shoji M., Iso Y., Kondo T., Shibata M., Ezumi H., Hamazaki Y., Koba S., and Katagiri T. Hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in ischaemic heart disease. // *Coron Artery Dis.* Jul 2003. Vol. 14. No. 4. pp. 301-7.
269. Svet-Moldavsky G.J., Chimishkyan K.L. Tumor angiogenesis factor for revascularization in ischemia and myocardial infarction // *Lancet.* 1977. No. 1. pp. 913-6.
270. Tamura K., Nakajima H., Rakue H., Sasame A., Naito Y., Nagai Y., and Ibukiyama C. Elevated circulating levels of basic fibroblast growth factor and

- vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. // *Jpn Circ J*. May 1999. Vol. 63. No. 5. pp. 357-61.
271. Tang J., Wang J., Yang J., X. K.F., Zheng L., Guo L., Zhang Y., and Huang Y. Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats. // *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009. Vol. 36. No. 4. pp. 644-650.
272. Tang J., Xie Q., Pan G., J. W., and Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. // *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006. Vol. 30. No. 2. pp. 353-361.
273. Thornton A.D., Ravn P., Winslet M., and Chester K. Angiogenesis inhibition with bevacizumab and the surgical management of colorectal cancer // *Br J Surg*. Dec 2006. Vol. 93. No. 12. pp. 1456-63.
274. Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J., and Kessler P.D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart // *Circulation*. 2002. Vol. 105. No. 1. pp. 93-98.
275. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J., Barnabé-Heider F., Sadikot A., Kaplan D.R., and Miller F.D. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin // *Nat Cell Biol*. 2001. Vol. 3. No. 9. pp. 778-784.
276. Tomita M., Adachi Y., and Yamada T. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. // *Stem cell*. 2002. Vol. 20. pp. 279-283.
277. Ueda H., Nakamura T., Matsumoto K., Sawa Y., Matsuda H., and Nakamura T. A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats // *Cardiovasc Res*. 2001. No. 51. pp. 41-50.

278. van Royen N., Voskuil M., Hoefler I., Jost M., de Graaf S., Hedwig F., Andert P.J., Wormhoudt A.T., Hua J., Hartmann S., et al. CD44 regulates arteriogenesis in mice and is differentially expressed in patients with poor and good collateralization. // *Circulation*. 2004. Vol. 109. pp. 1647–52.
279. Vatner S.F. FGF induces hypertrophy and angiogenesis in hibernating myocardium // *Circ Res*. 2005. Vol. 96. No. 7. pp. 705-7.
280. Verfaillie C.M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. // *Ann. NY Acad. Sci.*. 2000. Vol. 938. pp. 231-235.
281. Verheul H.A., Moulijn A.C., and Hondema S. Late results of 200 repeat coronary artery bypass operations // *Amer. J. Cardiol*. 1991. Vol. 67. pp. 24-30.
282. Viniberg A. Treatment of coronary artery insufficiency by implantation of the intrnal mammary artery into the ventricular myocardium // *J. Thor. Surg*. 1952. Vol. 23. No. 2. pp. 42-54.
283. Wang C.C., Chen C.H., Lin W.W., Hwang S.M., Hsieh P.C., Lai P.H., Yeh Y.C., Chang Y., and Sung H.W. Direct intramyocardial injection of mesenchymal stem cell sheet fragments improves cardiac functions after infarction. // *Cardiovasc Res*. 2008. Vol. 77. No. 3. pp. 515-524.
284. Wang T., Tang W., Sun S., Wan Z., Xu T., Huang Z., and Weil H.M. Mesenchymal stem cells improve outcomes of cardiopulmonary resuscitation in myocardial infarcted rats. // *J Mol Cell Cardiol*. 2009. Vol. 46. No. 3. pp. 378-384.
285. Wearn J.T., Mettier S.R., Klump T.G., and Zschesche A.B. The nature of the vascular communications between the coronary arteries and the chambers of the

- heart. // *Am. Heart. J.* 1933. Vol. 9. pp. 143-170.
286. Wedel J., Conn G., and Lord J. Revascularization of the heart by pedicled skin flap. // *Surgery.* 1955. Vol. 37. pp. 32-53.
287. Wei H.J., Chen C.H., Lee W.Y., Chiu I., Hwang S.M., Lin W.W., Huang C.C., Yeh Y.C., Y. C., and Sung H.W. Bioengineered cardiac patch constructed from multilayered mesenchymal stem cells for myocardial repair. // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29. No. 26. pp. 3547-3556.
288. Wen Z., Zheng S., Zhou C., J. W., and T. W. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. // *J Cell Mol Med.* 2011. Vol. 15. No. 5. pp. 1032-1043.
289. Whitlow P.L., Knopf W.D., O'Neill W.W., Kaul U., H. L., and Shawl F.A. Percutaneous transmymocardial revascularization in patients with refractory angina. // *Circulation.* 1998. Vol. 98. No. 1. P. 87.
290. Williams J.T., Southerland S.S., and Souza J. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. // *Am Surg.* 1999. Vol. 65. No. 1.
291. Wustmann K., Zbinden S., Windecker S., Meier B., and Seiler C. Is there functional collateral flow during vascular occlusion in angiographically normal coronary arteries? // *Circulation.* 2003. Vol. 107. pp. 2213–20.
292. Xiang Z., Liao R., Kelly M.S., and Spector M. Collagen-GAG scaffolds grafted onto myocardial infarcts in a rat model: a delivery vehicle for mesenchymal stem cells. // *Tissue Eng.* 2006. Vol. 12. No. 9. pp. 2467-2478.
293. Yasuda S., Goto Y., Baba T., Satoh T., Sumida H., Miyazaki S., and Nonogi H. Enhanced secretion of cardiac hepatocyte growth factor from an infarct region is

- associated with less severe ventricular enlargement and improved cardiac function // *J Am Coll Cardiol*. 2000. No. 36. pp. 115-121.
294. Yoon A., Wecker L., Heyd L., Park J.S., Tkebuchava T., Kusano K., Hanley A., Scadova H., Qin G., Cha D.H., et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. // *J Clin Invest*. 2005. Vol. 115. No. 2. pp. 326-338.
295. Yusuf S., Zucker D., Peduzzi P., Fisher L.D., Takaro T., Kennedy J.W., Davis K., Killip T., Passamani E., and and Norris R. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialists Collaboracion. Vol 344. *Lancet*. 1994. 563-70 pp.
296. Zhang F., Yang Z., Chen Y., Qin J., Zhu T., Xu D., Xu Z., Xu Q., Qian Y., Ma W., et al. Clinical cellular cardiomyoplasty: technical considerations // *J Card Surg*. May-Jun 2003. Vol. 18. No. 3. pp. 268-73.
297. Zhang M., Volpert. O., Shi Y., and Bouck N. Maspin is an angiogenesis inhibitor // *Nature Medicine*. 2000. Vol. 1. pp. 196-199.
298. Zheng W., Seftor E.A., Meininger C.J., Hendrix M.J., and Tomanek R.J. Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF-beta. // *Am J Physiol, Heart Circ Physiol*. 2001. No. 280. pp. H909-17.
299. Zuk P.A., Zhu M., and Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng*. 2001. Vol. 7. No. 2. pp. 211-228.