

На правах рукописи

ФЕЙЗИЕВ ЭЛЬВИН ЭЙНУЛЛА ОГЛЫ

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

3.1.15 – сердечно-сосудистая хирургия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Курск – 2024 г.

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

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

Официальные оппоненты:

Чупин Андрей Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор.
Заведующий отделением сосудистой хирургии ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России.

Червяков Юрий Валентинович, доктор медицинских наук, профессор
кафедрой хирургии института последипломного образования ФГБОУ ВО ЯГМУ.

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

Защита диссертации состоится «28» 06 2024 г. в 12-00 часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.1.012.02, созданного на базе ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф. Владимирского», ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова» Минздрава России (105203, Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 70).

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

Автореферат разослан «19» 04. 2024 г.

Ученый секретарь объединенного диссертационного совета 99.1.012.02,
доктор медицинских наук, профессор

Матвеев Сергей Анатольевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

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

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

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

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

Создано множество методов, позволяющих восстановить магистральный кровоток при поражении артериального русла. Данные методы включают в себя открытые оперативные вмешательства и эндоваскулярные. К открытым вмешательствам относят стандартные операции, направленные на восстановление кровотока с использованием протеза или нативной вены для проведения шунтирования или протезирования. Эндоваскулярные методы применяются у большого количества пациентов, поскольку позволяют с помощью малоинвазивных манипуляций восстановить кровоток. К ним относятся балонная ангиопластика, стентирование и другие. Использование упомянутых методов позволяет восстановить кровоток и сохранить конечность у 70-80% пациентов.

При тяжелом поражении артериального русла, когда выполнение того или иного оперативного вмешательства сопряжено с рисками низкой эффективности, высокого хирургического риска или невозможности вмешательства, возможно использование иных методов реваскуляризации (реваскуляризирующая остеотрепанация, трансплантация аутологичного костного мозга и один из самых травматичных методов – поясничная симпатэктомия). Невозможность оперативного вмешательства у таких пациентов приводит к тому, что в РФ каждый год производится до 50 тысяч

ампутаций нижних конечностей. Это подтверждает необходимость поиска новых методов лечения и профилактики данного заболевания, заставляет искать консервативные методы коррекции данной патологии.

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

Степень научной разработанности темы исследования.

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

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

Использование статинов в качестве первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых событий позволило значительно улучшить прогноз таких пациентов. Статины характеризуются высоким уровнем эффективности и безопасности, что обуславливает их широкое применение. Статины действуют на одно из главных звеньев патогенеза атеросклероза, а именно на повышенный уровень липопротеидов низкой плотности в крови. Снижение данного показателя уже многие годы считается эффективным методом, позволяющим улучшить исходы лечения. Помимо основного эффекта, исследование статинов позволило также открыть их противовоспалительные

свойства. Их использование позволяет снизить уровень главных белков цитокинов воспаления: фактор некроза опухоли-а (ФНО-а), интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и интерлейкин-8 (ИЛ-8). Дальнейшие исследования могут доказать их эффективность при использовании в группе пациентов с хронической артериальной недостаточностью и, возможно, критической ишемией. Учитывая широкий спектр действия препаратов данной группы, польза от их использования несомненна.

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

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

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

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

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

Высокая эффективность применения ингибиторов фосфодиэстеразы-5 в отношении коррекции ишемии тканей, а также отсутствие в настоящее время данных о применении уденафила подчеркивают перспективность исследования данного препарата и вселяет надежду на его потенциальную

эффективность. Изучение эффективности уденафила следует провести как в монотерапии, так и в комбинации исследуемого препарата с пентоксифиллином и симвастатином без проведения и с проведением реваскуляризирующей остеотрепанации.

Цель исследования:

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

Задачи исследования:

1. Проанализировать клинические результаты лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей с применением непрямых методов реваскуляризации: консервативной терапии, симвастатина и РОТ в различных сочетаниях
2. Создать модель, достоверно имитирующую клиническую картину критической ишемии, схожую с таковой у пациентов при ХИНК с различными осложнениями. Провести на данной модели исследование динамики клинических признаков данной патологии, показателей микроциркуляции и морфологической картины в течение 90 дней.
3. Модифицировать методику реваскуляризирующей остеотрепанации путем активного забора и последующей имплантации моноклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированные ткани.
4. Оценить влияние применения монотерапии уденафилом, пентоксифиллином и симвастатином на систему микроциркуляции и морфологическую картину у крыс на фоне моделирования КИНК.
5. Оценить эффективность применения уденафила в сочетании с другими препаратами: с пентоксифиллином или симвастатином. Оценить влияние различных комбинаций препаратов на систему микроциркуляции и морфологическую картину у крыс на фоне моделирования КИНК.
6. Оценить эффективность применения уденафила в сочетании с пентоксифиллином и симвастатином и дополнительным проведением инъекции моноклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированные ткани. Оценить влияние консервативной терапии в данной комбинации препаратов в сочетании с реваскуляризирующей остеотрепанацией на систему микроциркуляции и морфологическую картину у крыс на фоне моделирования КИНК.

Научная новизна исследования.

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

Разработана модель, достоверно имитирующая клиническую картину критической ишемии, схожую с таковой у пациентов при ХИНК с различными осложнениями. Полученные результаты позволили воспроизвести такие симптомы, как гангрена конечности, ишемическая нейропатия периферических нервов и другие, свойственные пациентам с данной патологией. Данный метод заключается в иссечении магистральных артерий, соответствующих им вен (бедренная, подколенная, передняя задняя большеберцовые артерии и вены), а также седалищного нерва.

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

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

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

Инъекция производилась по 50 мкл в 4 точки на седьмые сутки после начала эксперимента. В ходе экспериментов были найдены оптимальные места введения препаратов костного мозга, позволяющие добиться наибольшей эффективности раскрытия коллатерального русла и ускорения процессов неоваскулогенеза. Они включали в себя следующие точки: паравазально в места отхождения латеральной артерии, огибающей бедренную кость и огибающей подвздошную кость поверхностной артерии; в место прикрепления гребенчатой и длинной приводящей мышц бедра (ориентиром является локализация отхождения мышечной ветви бедренной артерии); в область верхней трети икроножной мышцы ишемизированной конечности [104]. Механизмы компенсации ишемии включаются в среднем на 7 сутки после начала процесса, данного срока достаточно для мобилизации всех

компенсаторных резервов. Дальнейшая компенсация может происходить только воздействием извне.

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

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

- Способ моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных-крыс

- Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы симвастатином

- Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина и уденафила

- Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина и моноклеарной фракцией собственного костного мозга

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

Теоретическая и практическая значимость исследования.

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

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

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

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

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

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

Разработанный способ введения моноклеарной фракции собственного костного мозга способствует неоваскулогенезу в ишемизированных тканях и активизирует коллатеральное кровообращение путем вовлечения в кровоток незадействованных сосудов и улучшения притока крови, что было продемонстрировано на созданной модели имитации критической ишемии у лабораторных крыс.

Разработана модель, имитирующая КИНК у лабораторных животных, которая позволила бы получить классические проявления таковой у пациентов, имеющих такие осложнения, как гангрена конечности, ишемическая нейропатия периферических нервов и иные язвенно-некротические изменения. Данный метод заключается в иссечении магистральных артерий, соответствующих им вен (бедренная, подколенная, передняя задняя большеберцовые артерии и вены), а также седалищного нерва.

Использование таких препаратов, как уденафил в дозировке 8,6 мг/кг, пентоксифиллин в дозировке 60 мг/кг, симвастатин в дозировке 1,71 мг/кг, при интрагастральном введении в качестве монотерапии позволяют в разной степени компенсировать признаки критической ишемии нижних конечностей, что выражается в стимуляции коллатерального кровообращения и развития неоваскулогенеза в ишемизированных тканях, что было продемонстрировано на созданной модели имитации критической ишемии у лабораторных крыс.

Использование уденафила с симвастатином (в дозировке 0,86 мг/кг каждого препарата 1 раз в сутки в течение 7 дней), уденафила с пентоксифиллином (в дозировке 0,86 мг/кг и 30 мг/кг соответственно 1 раз в сутки в течение 7 дней) с дополнительной однократной инъекцией моноклеарной фракции собственного костного мозга на седьмые сутки после начала явлений ишемии в пораженную конечность позволяет компенсировать признаки КИНК. Такая комбинация позволяет снизить частоту использования препаратов до 7 дней (1 раз в сутки), и уменьшить их дозировку, что снижает частоту возникновения побочных эффектов, а также достичь максимального ответа на проводимое лечение, что было продемонстрировано на созданной модели имитации критической ишемии у лабораторных крыс.

Степень достоверности и апробация результатов диссертации.

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

Апробация и практическая реализация работы.

Апробация работы состоялась 16 января 2024 года на совместном заседании кафедр общей хирургии, оперативной хирургии и топографической анатомии им. профессора А.Д. Мясникова, гистологии, эмбриологии, цитологии, хирургических болезней института непрерывного образования, хирургических болезней №2 федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Материалы диссертационного исследования представлены на международной научной – практической конференции (Уфа, 2023).

Публикации результатов исследования. По материалам диссертации опубликованы 7 печатных работ, из них 7 в изданиях, рекомендуемых ВАК, из которых 1 с индексацией в базе Scopus. По материалам диссертационной работы получены 5 патентов на изобретение.

Личный вклад автора.

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование состояло из двух частей. Целью первой части исследования стало клиническое изучение эффективности консервативной терапии у пациентов с наличием хронической артериальной недостаточности и явлений

КИНК без и с проведением реваскуляризирующей остеотрепанации в сочетании с применением симвастатина 20 мг 1 раз в сутки. Целью второй части исследования стало изучение эффективности уденафила в качестве монотерапии при явлениях критической ишемии, а также применение исследуемого препарата в сочетании с пентоксифиллином и симвастатином для коррекции критической ишемии нижних конечностей и оценка влияния проведения реваскуляризирующей остеотрепанации на исход заболевания.

Клиническое исследование. За период с 2002 по 2003 годы в отделении сосудистой хирургии ОБУЗ КГКБ СМП г. Курска проведено комплексное обследование и лечение 80 пациентов с острым артериальным тромбозом периферических артерий, тромбозом бедренно-подколенных шунтов и критической ишемией III-IV стадий на фоне облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей [101]. Все пациенты были мужского пола и считались неоперабельными в связи с тяжелым поражением дистального артериального русла и невозможностью выполнения реконструктивной операции. Все пациенты были распределены на 4 группы:

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

Критерии включения пациентов с явлениями хронической ишемии нижних конечностей:

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

Клиническое обследование пациентов проводилось стандартным образом. Производился сбор анамнеза с установлением длительности заболевания, дистанцию безболевого ходьбы, КИНК в анамнезе, наличие, местоположение и интенсивность болевого синдрома, а также данных о сопутствующей патологии. Были использованы лабораторные и инструментальные методы исследования: общий и биохимический анализ крови, липидный профиль с измерением уровня общего холестерина, липопротеидов низкой и высокой плотности, общий анализ мочи. Все инструментальные исследования были выполнены до проведенного лечения и спустя 1 месяц после его окончания, и включали плетизмографию, реовазографию, ультразвуковое исследование (УЗИ) артерий нижних конечностей с измерением лодыжечно-плечевого

индекса (ЛПИ), а также ЭКГ, флюорографию или рентгенографию органов грудной клетки перед началом исследования. У всех пациентов был исследован характер поражения и кровотока в сосудах нижних конечностей.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Экспериментальное исследование.

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

Моделирование критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных.

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

Оценка уровня микроциркуляции в мышцах голени крыс методом лазерной доплеровской флоуметрии.

Оценка уровня микроциркуляции в мышечной ткани голени осуществлялась с применением лазерной доплеровской флоуметрии (далее флоуметрия) при помощи лазерного доплеровского флоуметра «Biorac-systems MP 100» и датчика «TSD-144».

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

Методы морфологического и морфометрического исследования

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

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

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

Статистическая обработка результатов исследования.

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

Полученные экспериментальные данные анализировали с помощью методов описательной статистики путем определения таких показателей как среднее арифметическое, стандартное отклонение и стандартная ошибка. В качестве основного способа определения уровня статистической значимости отличий между средними величинами использовали методику определения границ доверительного интервала (t) при допустимом уровне $p \leq 0,05$ для экспериментальных медико-биологических исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты клинического исследования.

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

Таблица 1

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

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

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

Таблица 2

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

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

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

Таблица 3

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

Показатель		№3 Консервативная терапия + симвастатин	
		До лечения	Через 60 дней
Фотоплетизмографический индекс (%)		35,1±2,0	33,1±2,7

	индекс (%)		p=0,123	
	Реовазографический индекс	голень	0,31±0,02	0,26±0,02
			p=0,185	
	стопа	0,24±0,01	0,19±0,01	
		p=0,054*		
Лодыжечно-плечевой индекс		0,3±0,02	0,22±0,01	
		p=0,005*		

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

Таблица 4

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

Показатель	№4 РОТ + симвастатин		
	До лечения	Через 60 дней	
Фотоплетизмографический индекс (%)	35,3±2,4	35,4±3,2	
	p=0,674		
Реовазографический индекс	голень	0,29±0,02	0,28±0,02
		p=0,547	
	стопа	0,23±0,01	0,22±0,01
		p=0,530	
Лодыжечно-плечевой индекс		0,3±0,02	0,29±0,01
		p= 0,454	

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

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

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

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

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

Результаты экспериментальной части исследований

Разработка способа моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных. В первой (интактные) и второй (ложнооперированные) группах признаков ишемии выявлено не было. Клиническая картина возникшего нарушения кровоснабжения в третьей (с использованием классического метода удаления артериального русла) и четвертой (с удалением всех магистральных сосудов и пересечением седалищного нерва по разработанной методике) группах отличалась по частоте возникновения различных симптомов, данные представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика клинической картины хронической ишемии

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

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

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

Влияние различных методов на показатели перфузии при различных методах отражено в таблице 6. В опытной группе с проведением вмешательства по разработанной методике площадь некроза была больше (таблица 13), а показатели перфузии были ниже не только по сравнению с показателями интактных и ложнооперированных животных, но и по сравнению с группой сравнения ($p < 0,05$), а в группе сравнения показатели перфузии возрастали (рис. 11)

Через 3-5 суток в группе контроля острая ишемия переходила в хроническую: оперированная конечность включилась в процесс движения, развивались характерные симптомы перемежающейся хромоты, исчезали бледность, развивалась гиперемия кожных покровов (осложнения развивались

лишь у 13,3% лабораторных крыс), а в основной группе у всех животных выявлялись признаки язвенно-некротического поражения.

Таблица 6 – Динамика перфузии в мышцах голени ($M \pm m$) в перфузионных единицах

Группа животных	10 сутки (n=10)	21 сутки (n=10)	28 сутки (n=10)
Интактная (группа 1)	528,6±11,4	531,6±12,08	533,4±11
Ложнооперированная (группа 2)	521,4±11,46	523±13,79	524,1±15,1
Классический метод (группа 3)	213,6±7,53*	320,9±3,7*	376,7±10,68*
	p1=5,55114x10-15	p1=2,17061x10-12	p1=6,3787x10-09
Разработанный метод (группа 4)	160,5±3,28* **	249,1±7,31* **	302,9±6,46* **
	p1=2,62189x10-17	p1=9,57171x10-14	p1=5,53976x10-13
	p2=0,000004417	p2=0,000000065	p2=0,000013482

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

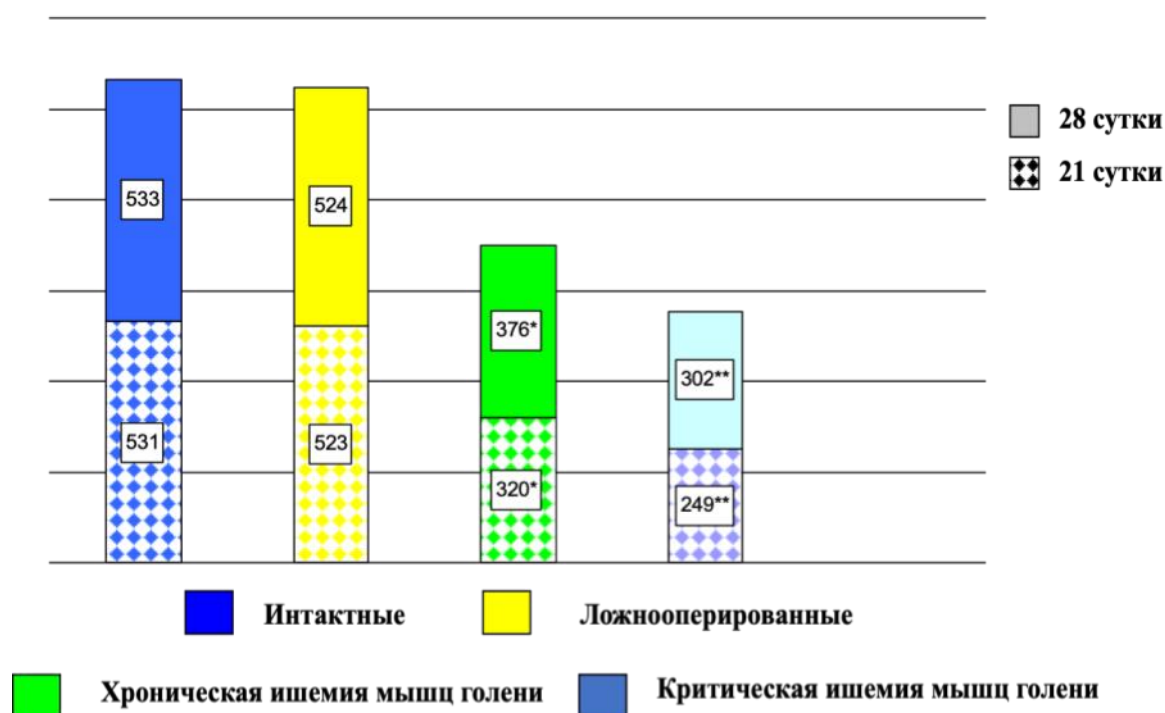


Рисунок 1. Уровень перфузии мышц голени у крыс в 1-4 экспериментальных группах выраженный в перфузионных единицах.

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

Таблица 7

Динамика площади некроза (%)

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

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

Микроскопическое изучение гистологических срезов интактных животных.

На гистологических препаратах выявлялась нормальная скелетная мышечная ткань без признаков поражения (рис. 2 и 2А).

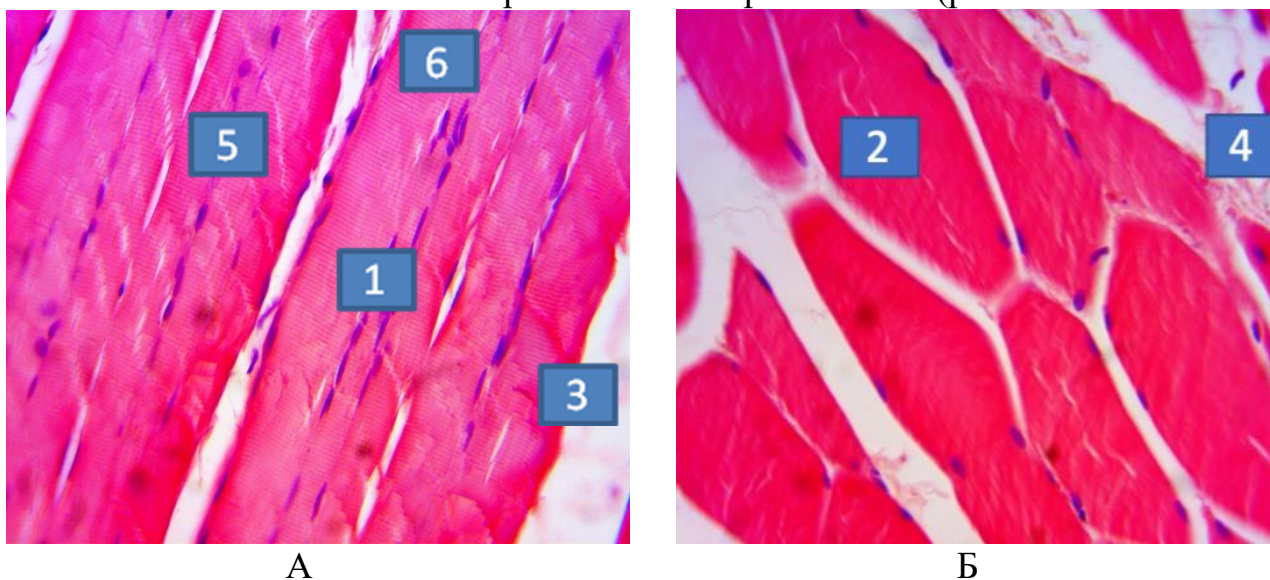
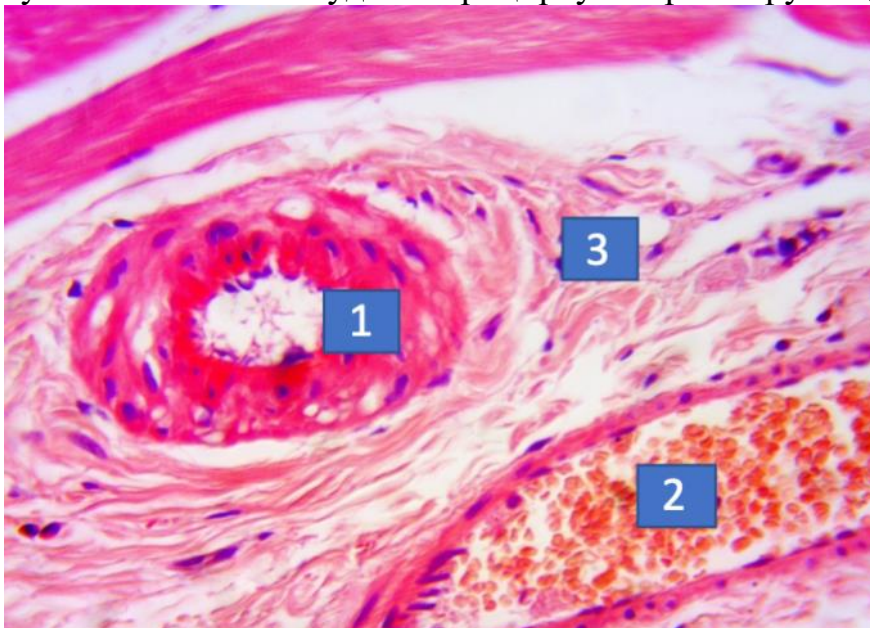


Рисунок 2. Микрофотография среза скелетной мышечной ткани в области средней трети бедра у лабораторных животных крыс в группе

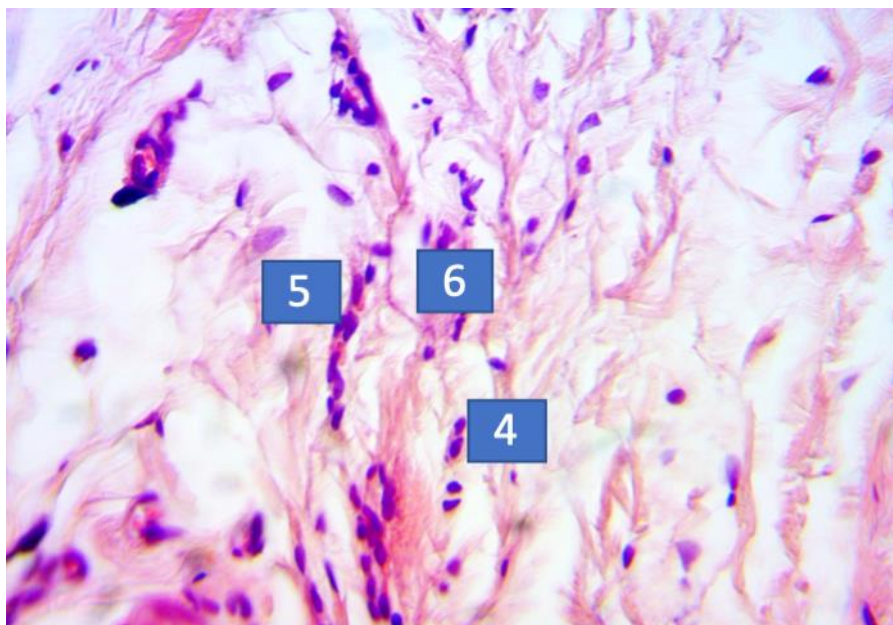
интактных животных. А – продольный срез. Б – поперечный срез. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

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

В прослойках соединительной ткани между мышечных волокон локализуются кровеносные сосуды артериального и венозного русла различного диаметра (рис. 3А). В соединительной ткани эпимизия визуализируются клетки фибробластического дифферона, единичные лимфоциты, тучные клетки и сосуды микроциркуляторного русла (рис. 13Б).



А



Б

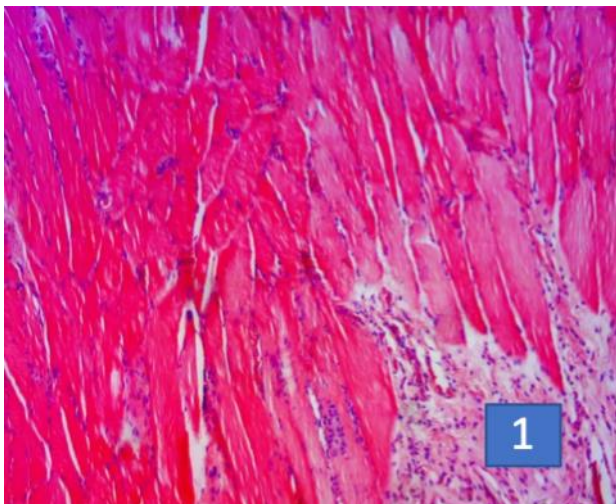
Рисунок 3. Микрофотография среза крупных кровеносных сосудов, расположенных между пучками скелетной мышечной ткани (А). Соединительная ткань эпимизия с преобладанием в поле зрения клеток фибробластического дифферона и кровеносных сосудов микроциркуляторного русла. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x400.

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

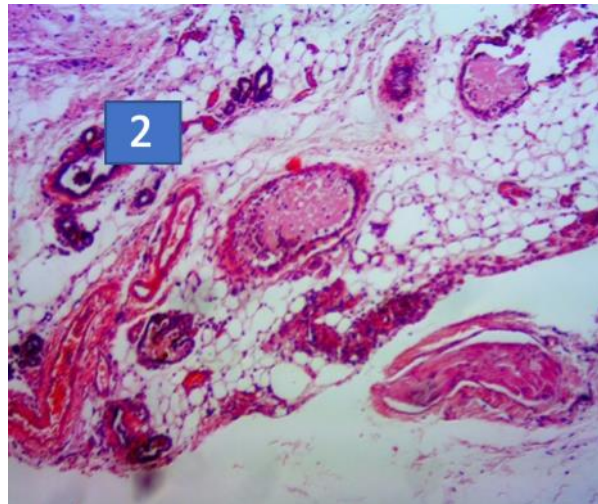
У ложнооперированных крыс достоверных различий в строении мышечной ткани от интактных крыс не обнаружено.

Микроскопическое изучение гистологических срезов в опытной группе.

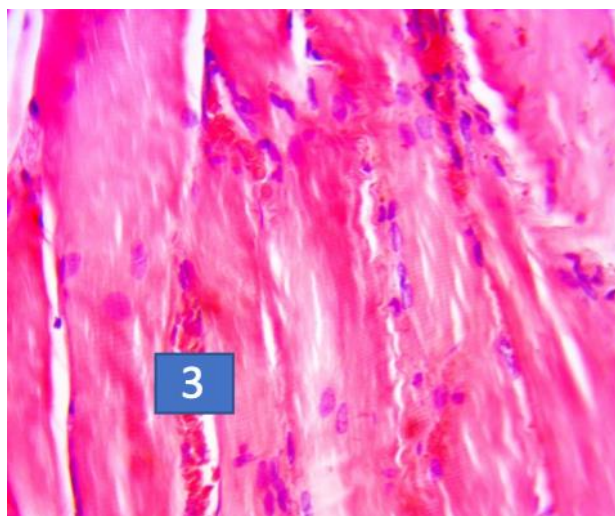
В экспериментальной группе – удалены магистральные артерии. Степень реактивности тканей очень высокая. Ярко выражены признаки воспалительного процесса: визуализируются преимущественно клетки воспаления, а в эпимизии выявляется интерстициальный отек. (рис. 4 А). Выявляется большое количество неокapилляров, локальные участки скопления клеток воспалительного ряда периневрально (рис. 14Б).



А



Б



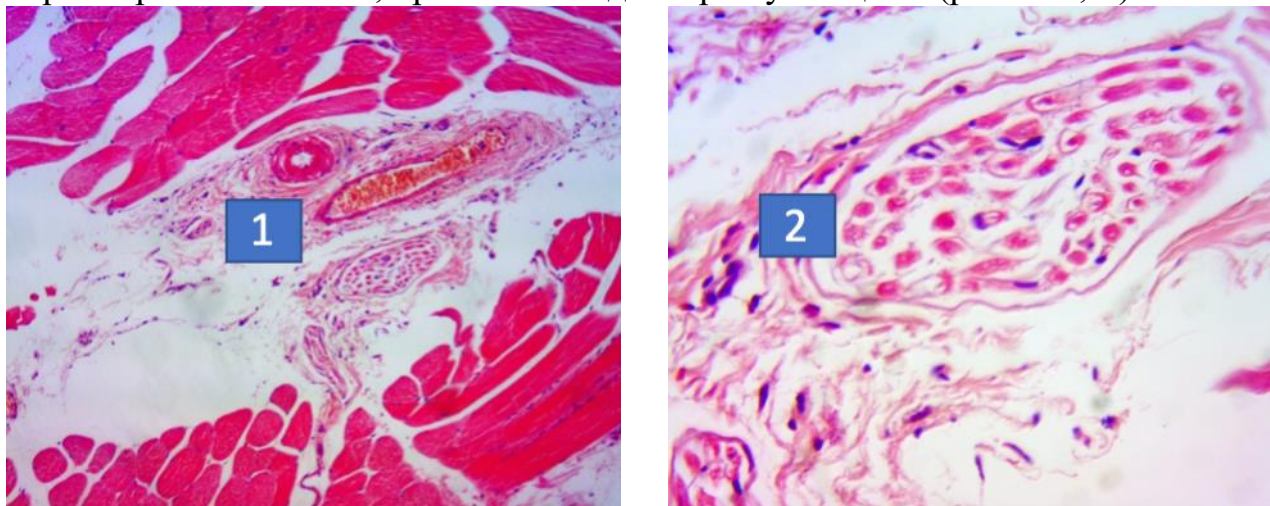
В

Рисунок 4. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе удаления магистральных сосудов и пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x200 (А, Б), x400 (В).

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

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

В глубоко расположенных между мышцами сосудисто-нервных пучках наблюдаются признаки воспалительной реакции. Периваскулярно и периневрально повышена клеточная плотность, преимущественно за счет лимфоцитов. В артериях утолщена мышечная оболочка, с признаками начинающегося фиброза. Вены расширены и кровенаполнены, их стенка тонкая. В периферических нервных стволах выражены признаки эндо- и периневрального отека, прослойки эндоневрия утолщены (рис. 5 А, Б).



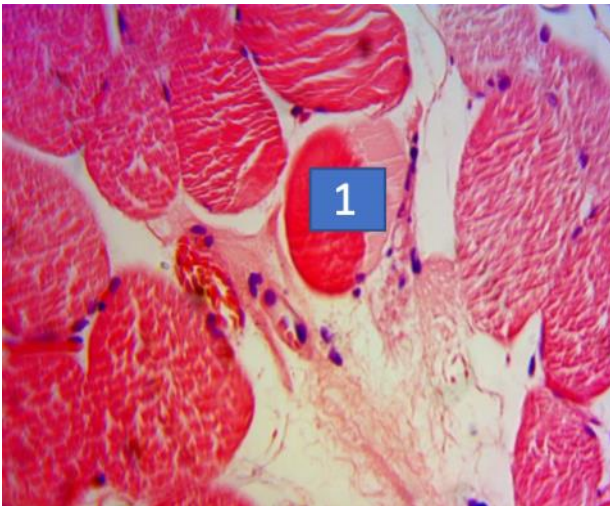
А

Б

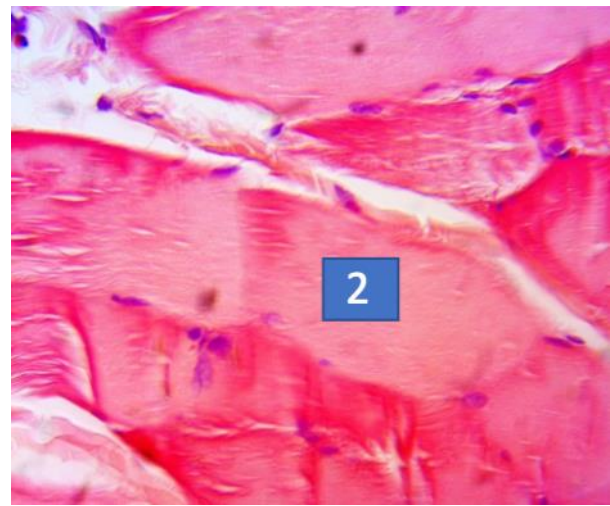
Рисунок 5. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе удаления магистральных сосудов и пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х200 (А), х400 (Б).

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

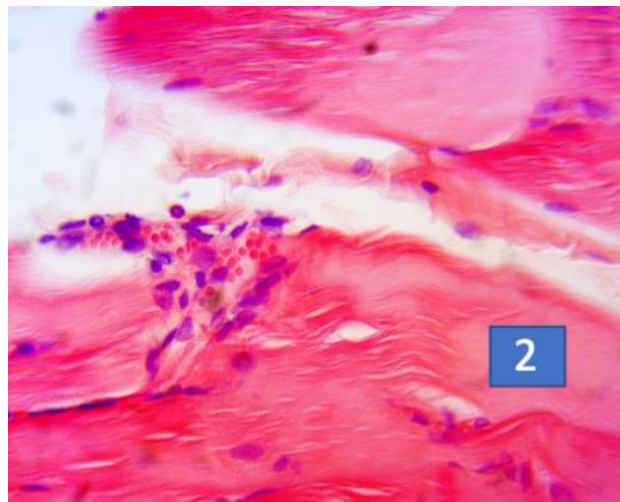
Ядра симпластов увеличенные в размерах и с измененной формой (с палочковидной или сигарообразной на овальную). В некоторых симпластах выявлены участки с признаками некротических изменений, саркоплазма окрашивается красителями неоднородно, на фоне яркой оксифилии визуализируются симпласты со слабо окрашенной саркоплазмой. В большинстве продольно срезанных мышечных волокон не определяется поперечная исчерченность на фоне хорошо визуализируемого отека и разволокнения коллагеновых волокон, образующих симпласты. Данные изменения наиболее выражены на поперечных срезах мышечных волокон (рис 6 А, Б, В).



А



Б

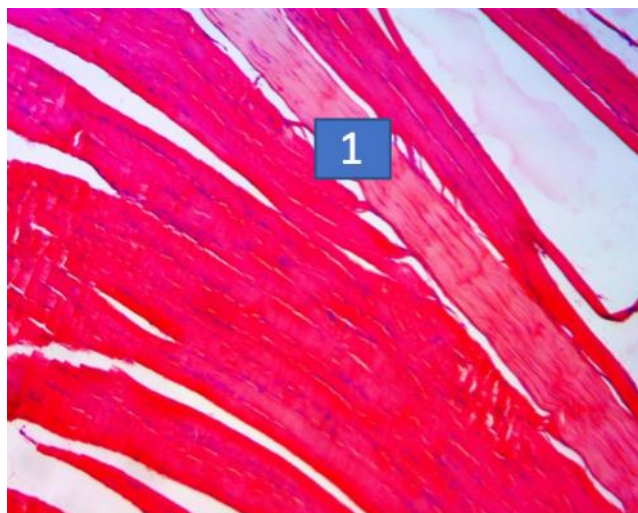


В

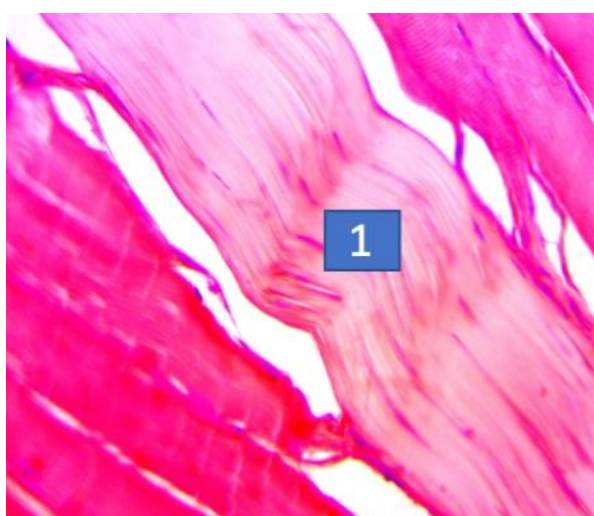
Рисунок 6. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе удаления магистральных сосудов и пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

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

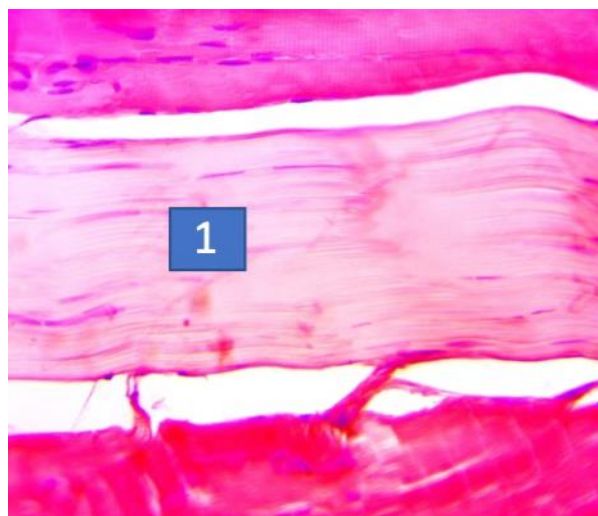
Так же, необходимо отметить, о наличии участков в продольно срезанной мышечной ткани, образованных несколькими симпластами с признаками некротических изменений, саркоплазма в которых не окрашивается, поперечная исчерченность не визуализируется, ядра с признаками кариопикноза и кариорексиса (рис. 7 А, Б, В).



А



Б



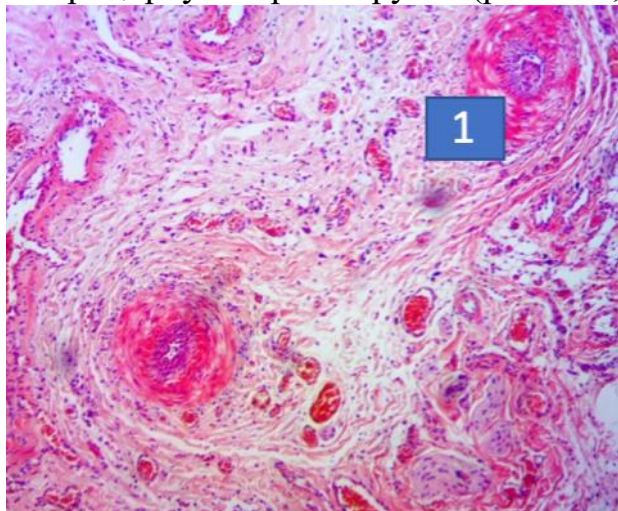
В

Рисунок 17. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе удаления сосудов и пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x200 (А), x400 (Б, В).

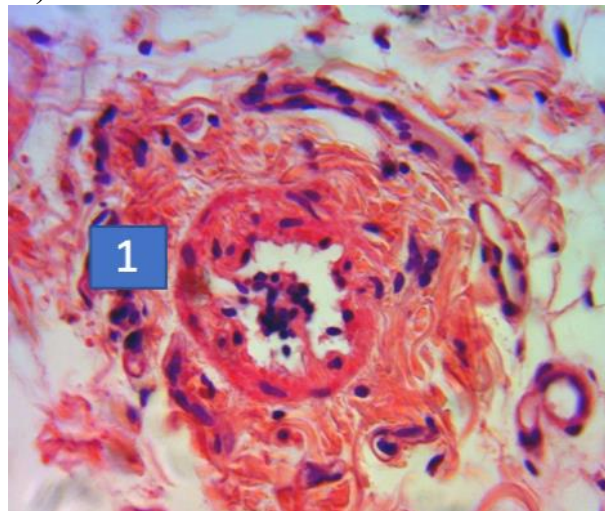
Где: (1) участки в продольно срезанной мышечной ткани, образованных несколькими симпластами с признаками некротических изменений, саркоплазма в которых не окрашивается, поперечная исчерченность не визуализируется.

Следует отметить наличие ярко выраженных изменений в структуре глубоких сосудов. Во-первых, наблюдается большое количество новообразованных мелких сосудов, кровенаполненных с признаками тромбоза. Во-вторых, в стенке более крупных артериол выражены признаки гиалиноза и фиброза. Наличие дистрофических изменений в гладких миоцитах стенки сосуда. Внутренняя эластическая мембрана утолщена и резко структурирована. Со стороны интимы наблюдается гиперпролиферация ее клеток, приводящая к сужению просвета сосуда. Эндотелиоциты кубической формы, ось их клетки ориентирована перпендикулярно поверхности базальной мембраны. В

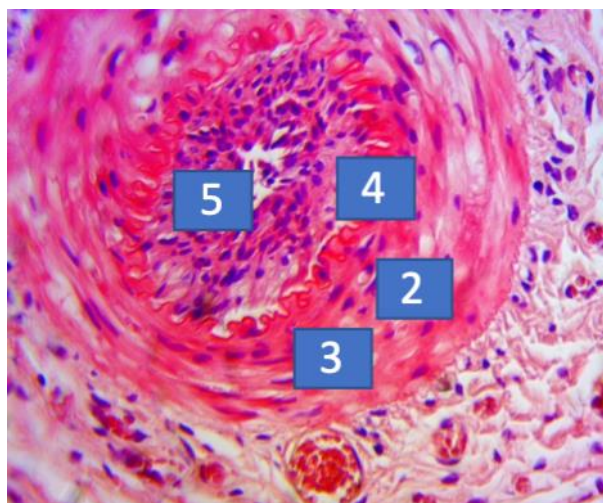
некоторых кровеносных сосудах в адвентиции наблюдается гиперпролиферация фибробластов, приводящая к ее утолщению, а также имеет место быть большое количество новообразованных кровеносных сосудов микроциркуляторного русла (рис. 8 А, Б, В).



А



Б



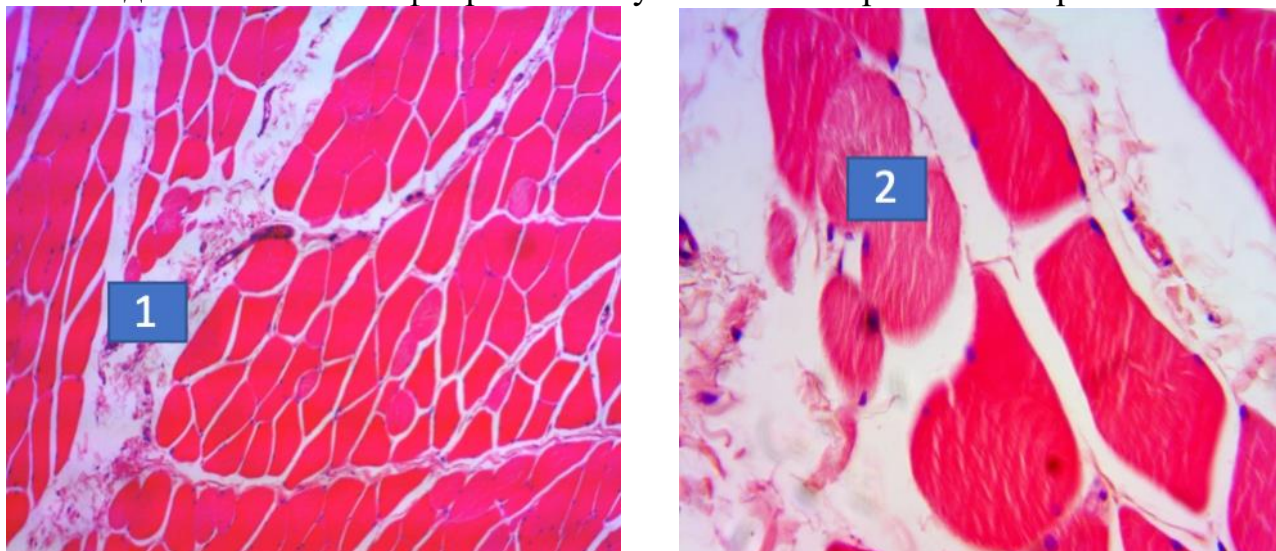
В

Рисунок 8. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе удаления магистральных сосудов и пересечения нерва. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x200 (А), x400 (Б, В).

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

Микроскопическое изучение гистологических срезов в группе сравнения

В экспериментальной группе с удалением только сосуда степень выраженности морфологических изменений несколько ниже, чем в предыдущей группе наблюдения. Между продольно и поперечно срезанными симпластами в прослойках соединительной ткани визуализируется круглоклеточная инфильтрация и выражены признаки интерстициального отека (рис. 9 А, Б). В единичных случаях встречаются поперечно срезанные симпласты со слабо окрашенной цитоплазмой, продольным разволокнением вплоть до коллагеновых фибрилл и отсутствием поперечной исчерченности.



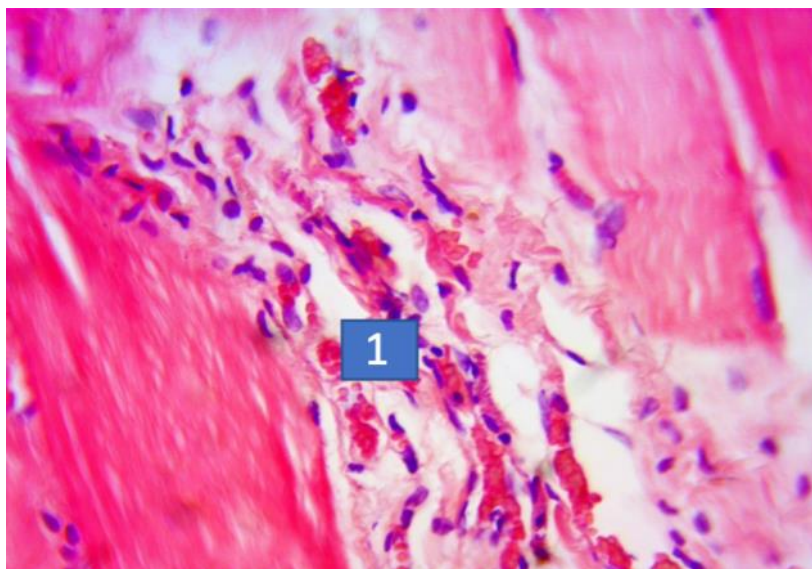
А

Б

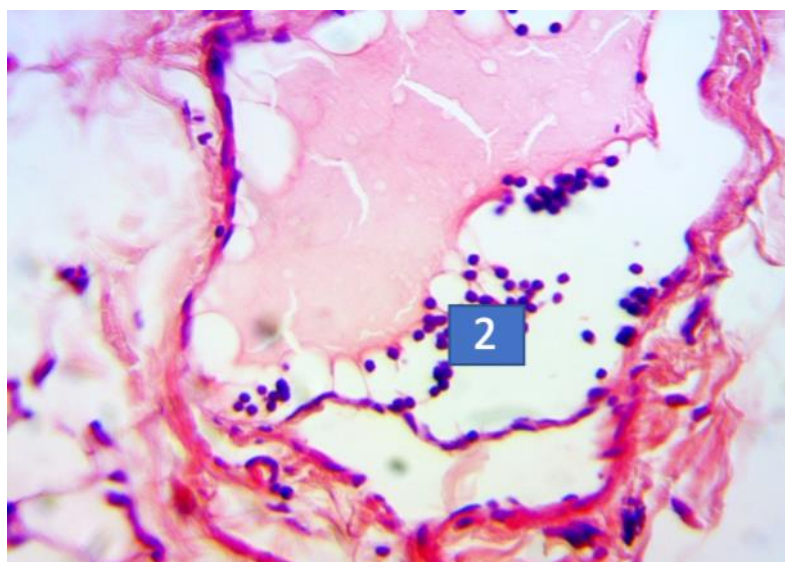
Рисунок 9. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе удаления артерий. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х200 (А), х400 (Б).

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

Обращает на себя внимание наличие большого количества кровенаполненных сосудов микроциркуляторного русла в прослойках эндомизия (рис. 10 А) и наличие расширенных тонкостенных вен с признаками краевого стояния лейкоцитов (рис. 10 Б).



А



Б

Рисунок 100. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе удаления артерий. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x400.

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

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

В группе с применением уденафила в качестве препарата монотерапии показатель уровня регионарного кровотока достоверно выше, чем в контрольной группе без проведенного лечения (таб. 8, 9).

Таблица 8

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

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

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

Таблица 9

Динамика показателей некроза в группах животных с различными типами лечения

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



Рисунок 11. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с коррекцией критической ишемии конечности уденафилом. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x400.

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

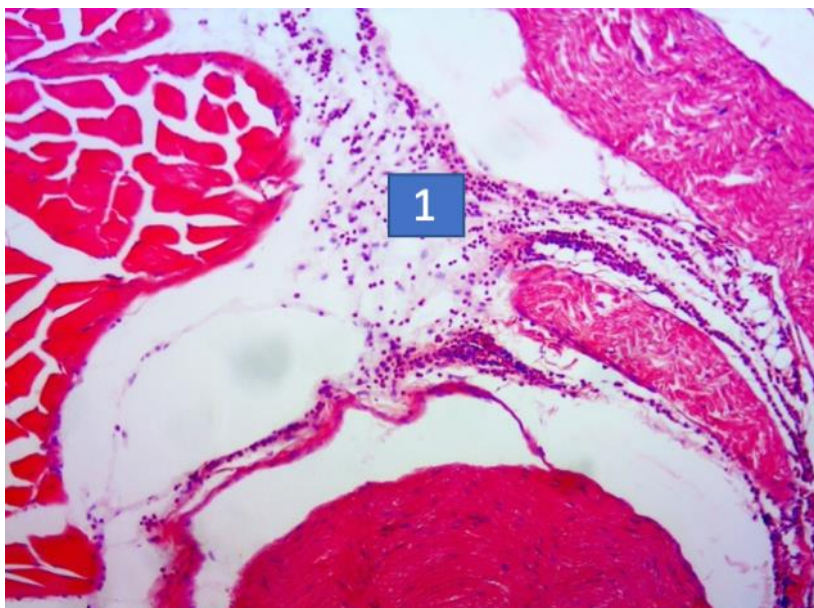


Рисунок 12. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с коррекцией критической ишемии конечности пентоксифиллином. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x400.

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

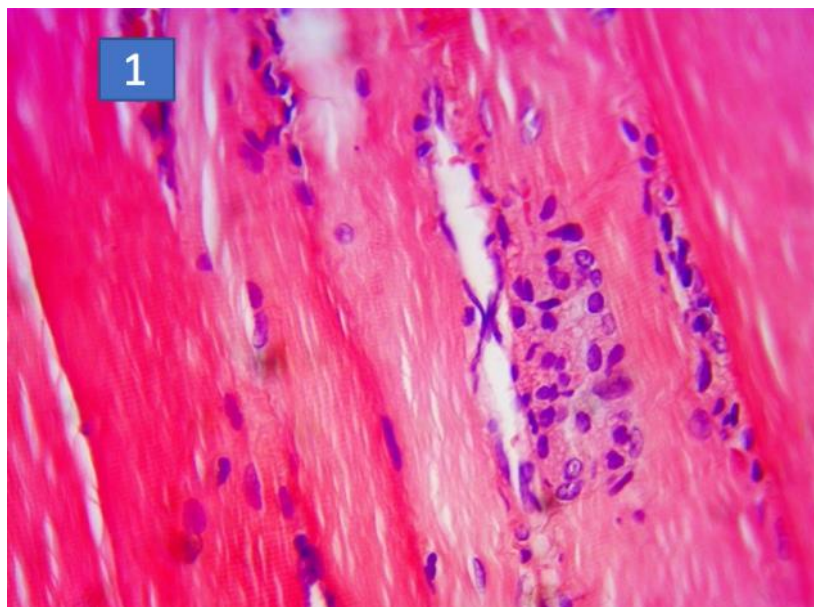


Рисунок 13. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных, в группе с коррекцией критической ишемии конечности симвастатином. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

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

При микроскопии в группе уденафила встречались мелкие очаги атрофирующихся миоцитов с пролиферацией клеток. Продолжала сохраняться круглоклеточная инфильтрация прослоек соединительной ткани между мышцами. Мелкие кровеносные сосуды были расширены, с признаками тромбоза. Выявлялось уменьшение размера и количества участков некроза с формированием вблизи новой капиллярной сети и молодой соединительной ткани. (рис. 11). Гистологическая картина в группах пентоксифиллина и симвастатина была подобной группе с применением уденафила, но следует отметить менее выраженное расширение мелких кровеносных сосудов особенно в группе с пентоксифиллином (рис. 12-13).

Уровень микроциркуляции в исследуемой группе постепенно приближался к значениям группы без проведенного вмешательства. Монокоррекция пентоксифиллином и симвастатином также положительно влияла на показатели микроциркуляции (рис. 14).

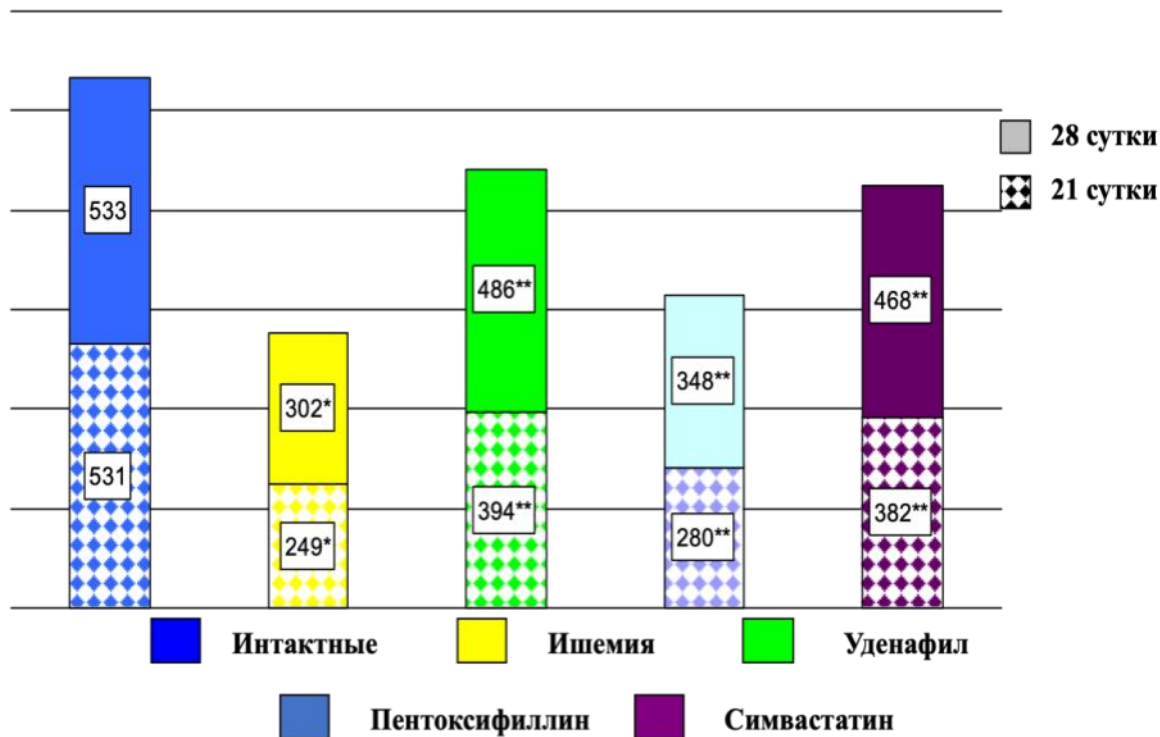


Рисунок 14. Уровень перфузии мышц голени у крыс в 1 и 4-7 экспериментальных группах выраженный в перфузионных единицах.

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

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

Коррекция ишемии мышечной ткани с применением комбинации уденафила и симвастатина способствовала достоверному повышению уровня перфузии по сравнению с показателями группы контроля, на 28-е сутки данный показатель приближался к в группе интактных животных (таб. 10, 11) Коррекция ишемии с применением комбинации симвастатина и пентоксифиллина также демонстрировала эффективность, однако следует отметить, что уровень микроциркуляции в данной группе был несколько ниже, чем в группе с комбинированной коррекцией критической ишемии конечности уденафилом и симвастатином (рис. 15).

Таблица 10

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

	21 сутки (n=10)	28 сутки (n=10)
Критическая ишемия + уденафил + симвастатин	433,2±16,87*	538,6±9,75*

(группа 8)	$p=8,75884 \times 10^{-9}$	$p=8,48373 \times 10^{-14}$
Критическая ишемия + уденафил + пентоксифиллин (группа 9)	414,1±23,38*	526,7±6,62*
	$p=2,58104 \times 10^{-6}$	$p=3,54384 \times 10^{-15}$

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

Таблица 11

**Динамика показателей некроза в группах животных с различными типами
лечения**

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

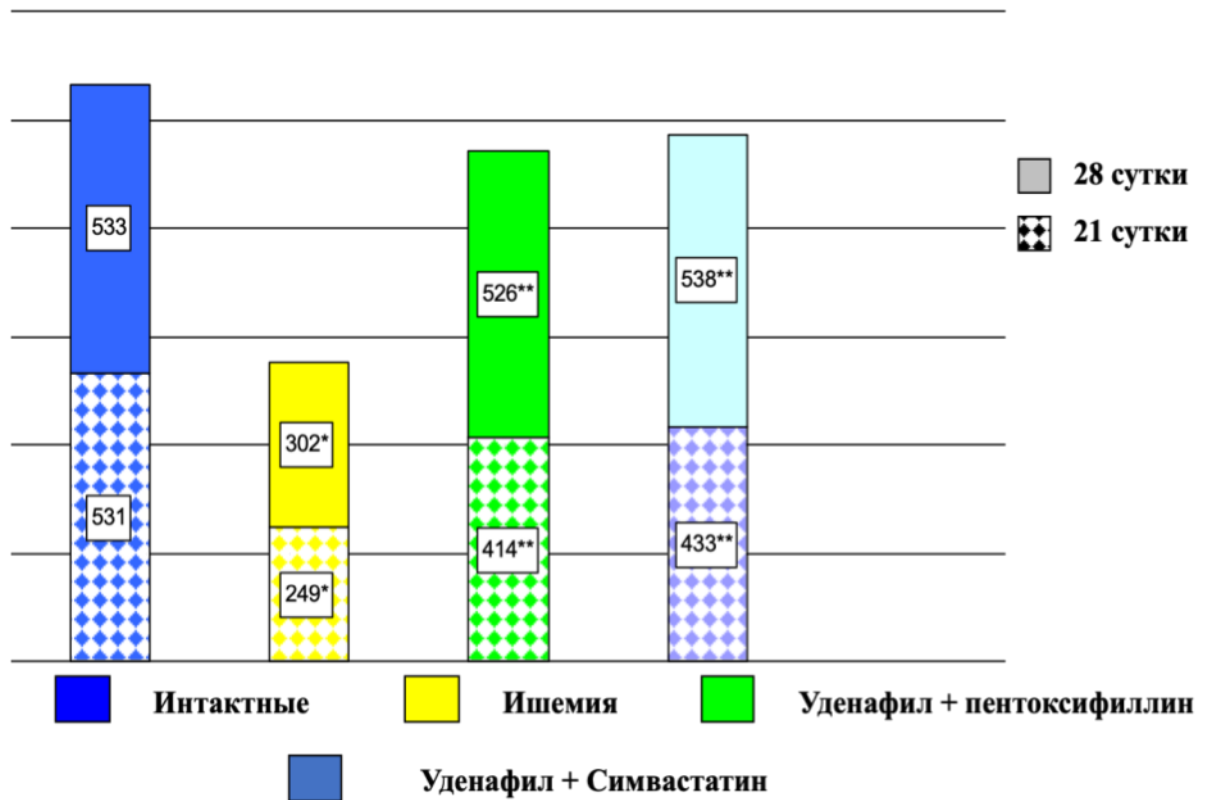


Рисунок 15 - Уровень перфузии мышц голени у крыс в 1,4,8,9 экспериментальных группах выраженный в перфузионных единицах.

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

Выраженность морфологических изменений в группе уденафила+симвастатина была минимальной. Симпласты мышечных волокон имеют однородную окраску саркоплазмы, определяются мелкие вытянутой формы расположенные по периферии мышечных волокон ядра. В прослойках соединительной ткани преобладают клетки фибробластического дифферона. Капилляры наполнены кровью, без признаков структурных нарушений. В широких прослойках соединительной ткани визуализируется большое количество новообразованных кровеносных сосудов, частично с признаками тромбоза. Можно считать, что у животных этой группы сформировалось новое микроциркуляторное русло (рис. 16).

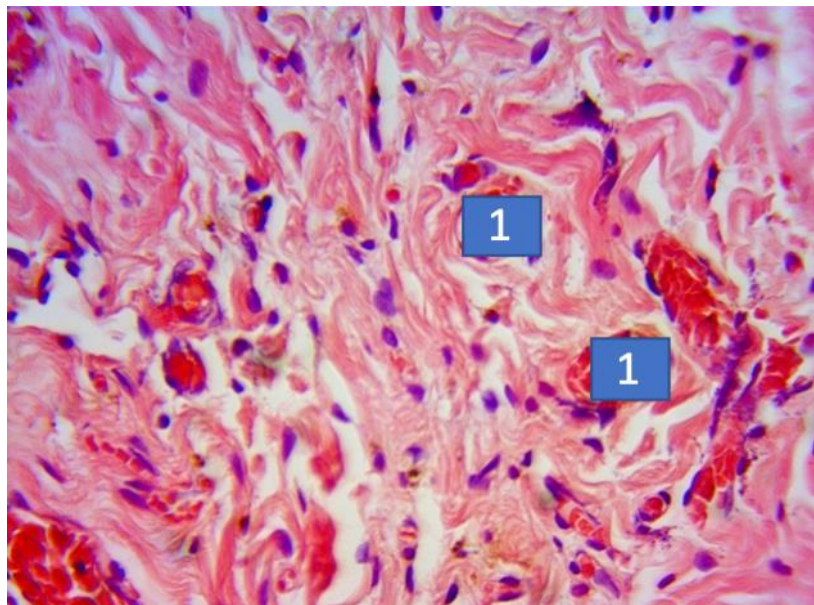


Рисунок 16. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе с коррекцией критической ишемии конечности уденафилом и симвастатином. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

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

Гистологическая картина в группе уденафила+пентоксифиллина была подобна предыдущей группы, однако следует отметить сравнительно меньшее количество новообразованных кровеносных сосудов (рис. 17).

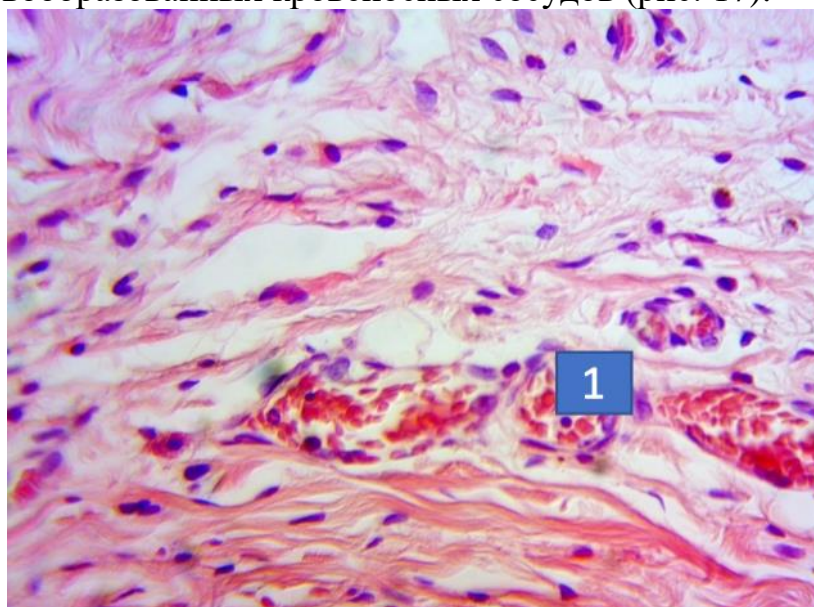


Рисунок 17. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с коррекцией критической

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

Где: (1) новообразованные кровеносные сосуды.

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

В группе с монокоррекцией аутологичной моноклеарной фракции костного мозга уровень регионарного кровотока приближался к уровню интактных животных, но не достигал целевых значений (таб. 12-13)

Таблица 12

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

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

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

Таблица 13

Динамика показателей некроза в группах животных с различными типами лечения

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

Вокруг некротических участков формировалась новая капиллярная сеть, сами они уменьшались в количестве и в размере, однако сохранялась круглоклеточная инфильтрация соединительной ткани. Мелкие кровеносные сосуды расширены, выявляются признаки тромбоза. Продолжали выявляться локальные участки с недостаточно прокрашенной саркоплазмой и отсутствием поперечной исчерченности. Клетки фибробластического ряда преобладали, визуализировались единичные лимфоциты. В прослойках между симпластами гипертрофированных тучных клеток, находящихся в стадии накопления секрета и дегрануляции (рис. 18).

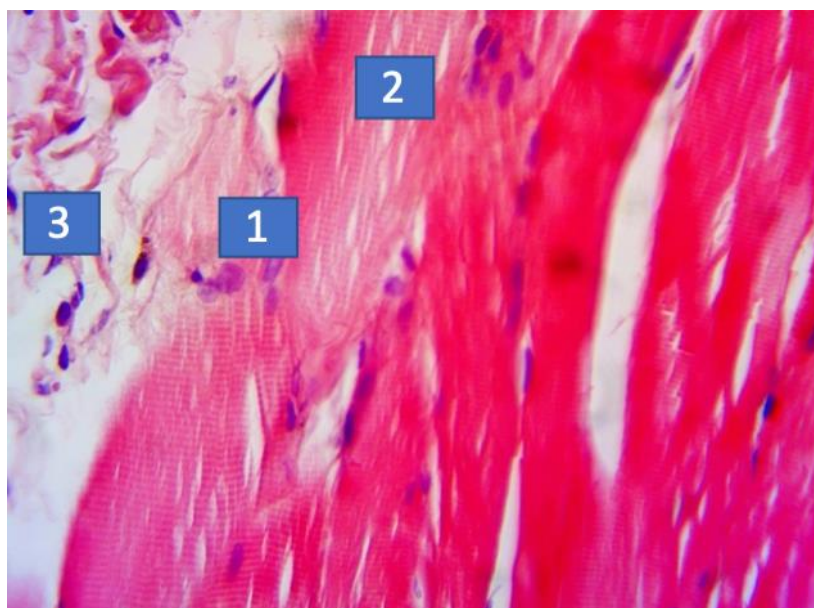


Рисунок 18. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных в группе с однократной инъекцией МНФ собственного костного мозга. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

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

В группе с комбинированной коррекцией уденафилом, симвастатином и однократной инъекции МНФ собственного костного мозга уровень кровоснабжения ишемизированной мышцы почти догонял таковой у интактный животных на 21 день, а на 28-е сутки достигал его (рис. 19).

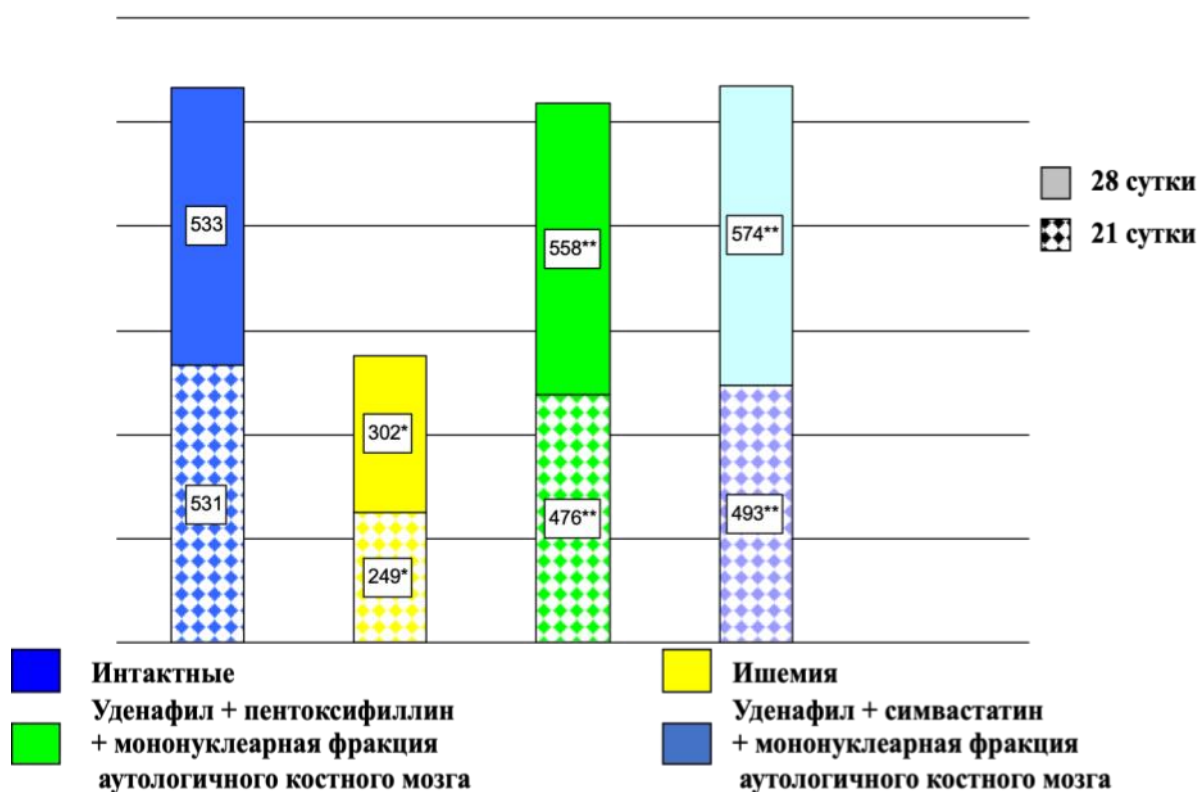


Рисунок 19. Уровень перфузии мышц голени у крыс в 1,4,11,12 экспериментальных группах выраженный в перфузионных единицах.

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

Степень выраженности морфологических изменений в данной группе была минимальной, среди всех групп наблюдения. В прослойках соединительной ткани плотность клеток низкая, в поле зрения преобладают

клетки фибробластического дифферона. Тучные клетки мелкие, преимущественно в стадии накопления секрета, лимфоциты единичные. Мелкие кровеносные сосуды кровенаполнены, без признаков структурных нарушений. В широких прослойках соединительной ткани визуализируется большое количество новообразованных кровеносных сосудов с признаками тромбоза. Визуализируемые крупные кровеносные сосуды без выраженных структурных изменений. (рис. 30).

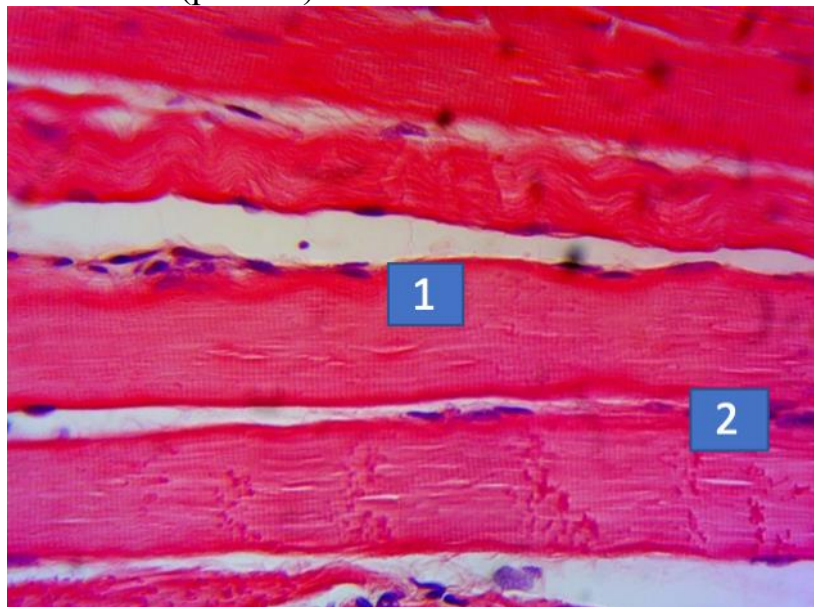


Рисунок 20. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с комбинированной коррекцией уденафилом, симвастатином и однократной инъекцией МНФ собственного костного мозга. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

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

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

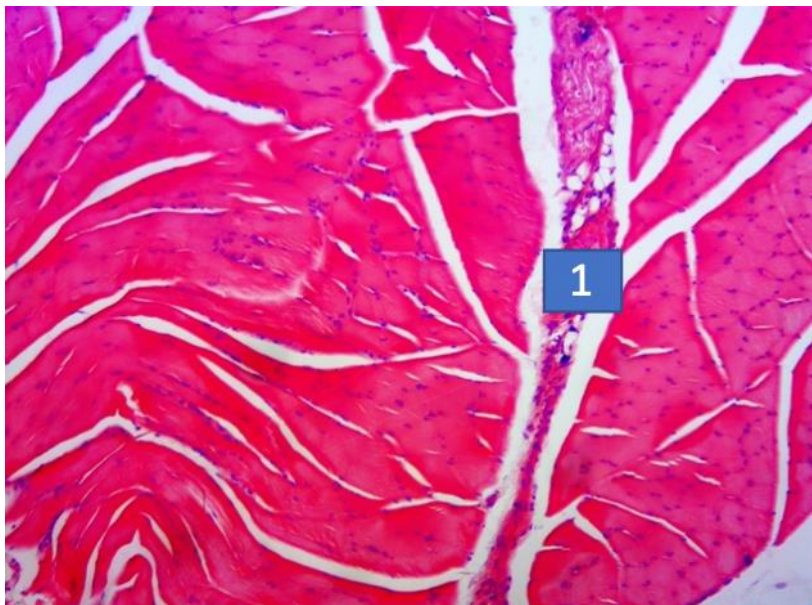


Рисунок 21. Микрофотография среза в области средней трети бедра экспериментальных животных – крыс, в группе с с комбинированной коррекцией уденафилом, пентоксифиллином и однократным параэнтеральным введением моноклеарной фракцией собственного костного мозга. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. х400.

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

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

Выводы

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

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

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

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

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

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

Практические рекомендации

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

2. Моделирование экспериментальной критической ишемии конечности заключается в следующем. Перед началом эксперимента все животные погружались в наркоз. В брюшной полость вводился раствор хлоралгидрата в

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

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

4. Выделять моноклеарную фракцию из гепаринизированного собственного костного мозга рекомендуется следующим образом: после разведения костного мозга в физ.растворе (1 к 5), полученный раствор центрифугировали с добавлением 400 г фиколл-верографина в течение 30 мин. Полученную моноклеарную фракцию клеток трижды отмывали в забуференном с помощью фосфатно-солевого буфера физиологическом растворе. Далее их ресуспендировали и культивировали в среде RPMI-1640 в концентрации 10⁶ клеток в мл. Жизнеспособность клеток определялась по методу окрашивания трипановым синим.

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

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

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

8. Лечение критической ишемии с использованием комбинации уденафила, пентоксифиллина и симвастатина (доза 0,86 мг/кг, 0,86 мг/кг и 30

мг/кг соответственно) с применением дополнительного введения мононуклеарной фракцией собственного костного мозга следует проводить с введением препаратов интрагастрально в течение 7 дней с дополнительной однократной инъекцией мононуклеарной фракции собственного костного мозга в ишемизированную конечность по 50 мкл в 4 точки на седьмые сутки после начала эксперимента.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективные итоги данной работы дают возможность дальнейшего изучения использования в медицинской практике генов для коррекции ишемической болезни сердца и хронической ишемии нижних конечностей.

Анализ современной литературы в частности разделов, посвященных стимуляции неоваскулогенеза при ишемии тканей путем применения различных клеточных субстанций, ингибиторов ФДЭ-5, статинами и пентоксифиллином, дало возможность разработать новый способ лечения уденафилом, симвастатином и пентоксифиллином в комбинации с введением мононуклеарных клеток собственного костного мозга, а также разработать новый способ их введения.

Учитывая полученные экспериментальные данные доклинического исследования комбинированного исследования уденафила, симвастатина, пентоксифиллина и введения мононуклеарной фракции собственного костного мозга, а также клинического исследования консервативной терапии критической ишемии нижних конечностей в сочетании ревазуляризирующей остеотрпанацией и дополнительным приемом симвастатина, можно сделать вывод о необходимости применения исследуемых комбинаций у пациентов с критической ишемией нижних конечностей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Суковатых, Б.С. Влияние коронавирусной инфекции на коронарный кровоток при эндоваскулярном лечении пациентов с острым инфарктом миокарда / Назаренко П.М., Суковатых М.Б., Болوماتов Н.В., Середицкий А.В., Сидоров Д.В., Середицкий И.А., Фейзиев Э.Э. // Вестн. нац. медико-хирург. центра им. Н.И. Пирогова. – 2022. – Т. 17, № 4. – С. 30-33.

2. Суковатых, Б.С., Фейзиев Э.Э., Затолокина М.А., Белоус А.С., Трубникова Е.В., Суковатых М.Б. Оптимизация терапевтического ангиогенеза при экспериментальной язвенно-некротической стадии критической ишемии нижних конечностей. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2022; 15: 1: 58-63. DOI: 10.18499/2070-478X-2022-15-1-58-63.

3. Суковатых, Б.С., Фейзиев Э.Э., Суковатых М.Б. Влияние аутологичной фракции костного мозга и симвастатина на микроциркуляцию мышц голени при экспериментальной критической ишемии нижних конечностей //

Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021. Т. 20. № 2 (78). – С. 65-69.

4. Суковатых, Б.С., Фейзиев Э.Э., Белоус А.С., Трубникова Е.В., Суковатых М.Б., Орлова А.Ю. Экспериментальное моделирование язвенно-некротической стадии критической ишемии нижних конечностей. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2021; 14: 2: 107-111. DOI: 10.18499/2070-478X-2021-14-2-107-111.

5. Фейзиев, Э.Э., Суковатых Б.С., Затолокина М.А., Белоус А.С., Трубникова Е.В. Влияние уденафила на течение экспериментальной критической ишемии нижних конечностей // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2021. № 1 (77). – С. 56-60.

6. Фейзиев, Э.Э., Суковатых Б.С., Затолокина М.А., Белоус А.С., Трубникова Е.В. Исследование эффективности симвастатина при моделировании критической ишемии нижних конечностей у крыс // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. 2021. Т. 16. № 1. – С. 24-28.

7. Feyziev EE, Sukovatykh BS, Belous AS, Zatolokina MA, Trubnikova EV, Mishina ES. Combined Correction of Experimental Critical Ischemia of the Lower Extremities in a Rat Model. International Journal of Biomedicine. 2021;11(3):372-375. doi:10.21103/Article11(3) OA16.

Патенты на изобретения:

1. Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы симвастатином: пат. 2726076 Рос. Федерация: МПК G09B 23/28, A61K 31/351 / Э.Э.-О. Фейзиев, А.С. Белоус, Б.С. Суковатых, Е.В. Трубникова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации. - № 2020111368; заявл. 19.03.2020; опубл.08.07.2020, Бюл. № 19. – 5 с.

2. Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина имононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга: пат. 2735838 Рос. Федерация: МПК G09B 23/28, A61K 31/22, A61K 35/28, A61P 9/10 / Э.Э.-О. Фейзиев, А.С. Белоус, Б.С. Суковатых, Е.В. Трубникова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации. - № 2020111726, заявл. 21.03.2020; опубл. 09.11.2020, Бюл. № 31 – 7 с.

3. Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина и уденафила: пат. 2727891 Рос. Федерация: МПК G09B 23/28, A61K 31/351, A61K 31/519 / Э.Э.-О. Фейзиев, А.С. Белоус, Б.С. Суковатых, Е.В. Трубникова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации. - № 2020111675, заявл. 20.03.2020; опубл. 24.07.2020, Бюл. № 21 – 5 с.

4. Способ моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных-крыс: пат. 2734158 Рос. Федерация: МПК G09B 23/28 / Э.Э.-О. Фейзиев, А.С. Белоус, Б.С. Суковатых, Е.В. Трубникова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации. - № 2020111315, заявл. 18.03.2020; опубл. 13.10.2020, Бюл. № 29 – 6 с.

5. Способ фармакологической коррекции экспериментальной критической ишемии скелетной мышцы комбинацией симвастатина имононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга: пат. 2735838 Рос. Федерация: МПК G09B 23/28, A61K 31/22, A61K 35/28, A61P 9/10 / Э.Э.-О. Фейзиев, А.С. Белоус, Б.С. Суковатых, Е.В. Трубникова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации. - № 2020111726, заявл. 21.03.2020; опубл. 09.11.2020, Бюл. № 31 – 7 с.