

**Б.С. СУКОВАТЫХ, А.Ю. ОРЛОВА, Е.Б. АРТЮШКОВА,  
М.Ю. ГОРДОВ, К. Ю. ВЕДЕНЬЕВ**

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИИ АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ**

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет»,  
Российская Федерация

**Цель.** Разработать экспериментальную модель критической ишемии конечности с последующим ее использованием для изучения эффективности применения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга в лечении критической ишемии конечности.

**Материал и методы.** Проведен анализ результатов применения моноклеарной фракции аутологичного костного мозга на крысах породы Вистар, которые были разделены на четыре группы: интактную, контрольную, сравнения и опытную. В интактную группу вошло 10 крыс, а в остальные по 30 животных в каждой. Всем крысам, за исключением интактных, критическая ишемия конечности создавалась путем иссечения магистрального сосуда, включающего бедренную артерию, подколенную артерию и начальные отделы артерий голени. Моноклеарную фракцию аутологичного костного мозга из бедренной кости контралатеральной конечности животного в объеме 200 мкл вводили в ишемизированную конечность в опытной группе из двух точек по 100 мкл: 1) непосредственно под паховую связку паравазально в зону анатомического расположения коллатералей внутренней подвздошной артерии; 2) интрамурально в икроножную мышцу передне-латеральной поверхности средней трети голени. В группе сравнения фракцию вводили в ишемизированную конечность инфильтрационно из шести различных точек. В контрольной группе животные лечения не получали. Эффективность лечения оценивали по динамике уровня микроциркуляции на 10, 21 и 28 сутки методом лазерной доплеровской флоуметрии.

**Результаты.** Оценка уровня микроциркуляции у животных с экспериментальной ишемией конечности после лечения по оригинальному способу в опытной группе при сопоставлении с группой сравнения показала возрастание кровотока на 10 сутки на уровне бедра в 1,5 раза, голени в 1,1 раза, на 21 сутки на уровне бедра и голени в 1,4 раза и на 28 сутки на уровне бедра и голени в 1,2 раза.

**Заключение.** Предложенный способ лечения патогенетически обоснован и эффективен.

*Ключевые слова:* заболевание периферических артерий, модель ишемии, оценка уровня микроциркуляции, модель ишемии задней конечности, терапевтический ангиогенез, костный мозг, моноклеарные клетки

**Objectives.** To develop an experimental model of critical limb ischemia for the further study of the effectiveness of the mononuclear fraction of autologous bone marrow in the treatment of critical limb ischemia.

**Methods.** The results of the application of the mononuclear fraction of autologous bone marrow in rats (Wistar) divided into four groups: intact, control, comparison and experimental have been analyzed. The intact group included 10 rats, the other groups – 30 animals in each. In all rats, except for the intact one, critical limb ischemia was created by excision of the main vessel, including the femoral artery, the popliteal artery and the initial segments of the leg arteries. Mononuclear fraction of autologous bone marrow from the femur contralateral limb of the rat in a volume of 200  $\mu$ L was injected into the ischemic limb in the experimental group (every animal was given a 100  $\mu$ L injection at two different injection sites: 1) directly below the inguinal ligament of the tissue in the area of the anatomical location of collaterals of the internal iliac artery; 2) intramuscularly in the gastrocnemius muscle of the anterior-lateral surface of the middle third of the tibia. In the control group the fraction was injected into the ischemic limb by infiltration at six different sites. In the control group the animals received no treatment. The treatment effectiveness was assessed by the dynamics of the microcirculation level by the 10<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> days by laser Doppler flowmetry.

**Results.** Assessment of the microcirculation in animals with experimental limb ischemia after treatment according to the original method in the experimental group with the compared group showed the increase in blood flow by the 10<sup>th</sup> days at the hip level by 1,5 folds, at leg – by 1,1 folds, by the 21<sup>st</sup> days at the level of the femur and tibia – by 1,4 folds and by the 28<sup>th</sup> days at the femur and tibia – by 1,2 folds.

**Conclusion.** The proposed method of treatment proven to be pathogenetically justified and effective.

*Keywords:* peripheral arterial disease, ischemia model, microcirculation level, model of the hind limb ischemia, therapeutic angiogenesis, bone marrow, mononuclear cells

**Novosti Khirurgii. 2015 Jul-Aug; Vol 23 (4): 365-371**

**The Effectiveness of Mononuclear Fraction of Autologous Bone Marrow in Treatment of Experimental Critical Limb Ischemia**

**B.S. Sukovatykh, A.Y. Orlova, E.B. Artyushkova, M.Y. Gordov, K.Y. Vedenev**

## Введение

Среди людей, страдающих облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, в последнее время наметилась четкая тенденция к увеличению числа пациентов с поражениями «путей оттока» и с конечной стадией развития атеросклероза — кальцинозом артериального русла. При этом в 15-20% случаев прямая реваскуляризация, наиболее привлекательная для хирурга, теряет шансы на успех, ишемия прогрессирует, возникает опасность потери конечности [1]. Отсутствие возможности выполнения реконструктивной операции диктует необходимость разработки, внедрения и тщательного анализа новых путей паллиативной реваскуляризации. Серьезное внимание стало уделяться разработке способов улучшения микроциркуляции в ишемизированных тканях посредством стимуляции неоангиогенеза [2].

Идея клеточной трансплантации для лечения ишемии нижних конечностей, прежде всего атеросклеротического генеза, успешно реализуется последние 5 лет — в эксперименте и 2 года — в клинике [3]. Это стало возможным в связи с интенсивным изучением клеточных механизмов ангиогенеза и выделением клеток — предшественников сосудистого эндотелия и ангиобластов. В эксперименте на модели локальной ишемии конечности (лигирование ветвей бедренной артерии) было предложено использовать различные клетки-кандидаты для неоангиогенеза в ишемизированной зоне — мононуклеары костного мозга и периферической крови, тромбоциты периферической крови совместно с мононуклеарами, эндотелиальные прогениторные клетки, мобилизованные в периферический кровоток, гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) CD34+ и CD133+, эндотелиальные прогениторы пуповинной крови человека, стромальные клетки костного мозга и «костномозговые фибробласты» после культивирования [4].

Наибольшее применение в регенерационной клеточной терапии получили стволовые клетки костного мозга в силу их плюрипотентности. Стволовые клетки (гемопоэтические и мезенхимальные) содержатся в мононуклеарной фракции клеток костного мозга. Обладая мультипотентными свойствами, эти клетки могут способствовать замещению дефектов тканей и неоангиогенезу. Кроме того, лимфоидные клетки фракции в силу своих морфогенетических способностей могут принимать участие в процессах восстановительной регенерации поврежденных органов и тканей [5].

Стимуляция неоангиогенеза во всех иссле-

дованиях производилась путем множественной внутримышечной трансплантации клеток костного мозга в ишемизированные ткани [6]. Однако основным недостатком при таком способе введения клеток костного мозга является отсутствие стимуляции развития коллатерального кровотока из зоны с достаточным кровоснабжением в дистальные ишемизированные участки. Развитие только неоваскулогенеза в ишемизированных тканях без достаточно развитого коллатерального кровотока из проксимальных отделов конечности в дистальные не позволяет нивелировать экспериментальную критическую ишемию. Нерешенным вопросом является выбор модели ишемии конечности крысы, так как у животного, несмотря на схожесть в строении артериального русла с таковыми у человека, имеются некоторые отличия. Для создания ишемии тканей большинство авторов выполняли перевязку бедренной артерии непосредственно перед отхождением от нее а. saphena, которая является аналогом глубокой бедренной артерии у человека. Анализ анатомического строения задней конечности крысы показал, что ввиду особенностей ветвления артерий нижних конечностей, у них имеются достаточно выраженные компенсаторные механизмы, в связи с этим лишь перевязка бедренной артерии не позволяет получить клиническую картину критической ишемии конечности, аналогичную таковой у человека при облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей [7].

**Целью** исследования является разработка экспериментальной модели критической ишемии конечности с последующим ее использованием для изучения эффективности применения мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга в лечении критической ишемии конечности.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Моделирование критической ишемии конечности у крыс.
2. Выделение аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга из бедренной кости животного.
3. Оценка уровня микроциркуляции у крыс с экспериментальной ишемией конечности на фоне лечения мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга на разных сроках исследования.

## Материал и методы

Опыты проводились на 100 белых крысах-самцах линии “Wistar” массой 300-350 г без внешних признаков заболевания, находящих-

ся в виварии Курского государственного медицинского университета в одинаковых условиях на стандартном пищевом режиме. Операции и все манипуляции с крысами проводились в условиях общего обезболивания. Эвтаназию осуществляли при помощи передозировки средств для наркоза в соответствии с «Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Советом Европы (Strasbourg, Франция, 1986) и Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях».

Животные были разделены на четыре группы: интактную, контрольную, сравнения и опытную. В интактную группу вошло 10 крыс, у которых оценен нормальный уровень микроциркуляции. В остальные группы вошло по 30 животных в каждой, у которых моделировали критическую ишемию правой задней конечности. В контрольной группе лечение не проводилось. В группе сравнения лечение выполнялось по традиционному способу с введением мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга только в ишемизированные мышцы бедра и голени пораженной конечности инфльтрационно из шести различных точек без трансплантации клеток в зону анатомического расположения коллатералей внутренней подвздошной артерии [8], а в опытной группе – из двух точек по оригинальному способу (заявка № 2014113802 на выдачу патента).

Моделирование критической ишемии задней конечности осуществляли следующим образом (патент РФ на изобретение № 2392948) [9]. Под наркозом хлоралгидратом в дозе 250-300 мг/кг животных фиксировали на спине, затем после соответствующей подготовки операционного поля (сбривание шерсти и обработка 70% раствором спирта) выполняли разрез кожи по внутренней поверхности бедра на всю длину области. Выделяли элементы сосудисто-нервного пучка бедра. Артерию отделяли от вены и нерва, мобилизовали (пересекали отходящие от нее ветви первого порядка). Накладывали лигатуры на артерию у места ее начала (под паховой связкой) и пересекали. Перевязывали и пересекали а. saphena. Выделяли подколенную артерию и начальные отделы артерий голени (бифуркация подколенной артерии), которые пересекали. Участок магистрального сосуда, включающий бедренную, подколенную артерию и начальные отделы артерий голени удаляли. Значимого ретроградного кровотока из

артерий голени не наблюдалось, поэтому лигатуры не накладывались. Рану на бедре ушивали непрерывным швом.

Мононуклеарную фракцию аутологичного костного мозга готовили непосредственно перед введением по следующей методике: у крысы, перенесшей операцию моделирования ишемии правой задней конечности, на противоположной конечности пальпировали бедренно-большеберцовый сустав, образованный латеральными и медиальными мышцами бедренной и большеберцовой костей, фиксировали его одной рукой в положении флексии, а другой брали иглу диаметром 20G, соединенной со шприцем, содержащим 2500 Ед гепарина, разбавленного с 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:1 в объеме 1мл, и после санации 70% этиловым спиртом перкутанно через хрящевые суставные мениски под надколеником осуществляли пункцию костномозговой полости. Костный мозг аспирировался в шприц путем поступательных движений иглы в полости вперед и назад в объеме от 1 до 1,5 мл. Затем мононуклеарную фракцию аутологичного костного мозга выделяли по методу Youm [10], принцип которого основан на различии в плавучей плотности форменных элементов. Смесь полисахарида фикола и рентгеноконтрастного вещества верографин создает градиент с такой плотностью, которая позволяет при центрифугировании разделить клетки костного мозга на мононуклеарную фракцию (МФ), в которую входят лимфоциты, субпопуляция моноцитов и бластные гемопоэтические клетки, и фракцию, содержащую гранулоциты и эритроциты. Мононуклеарная фракция обладает меньшей, чем градиент, плотностью и располагаются над градиентом. Плотность гранулоцитов и эритроцитов больше, чем плотность градиента, они проходят через градиент, опускаясь на дно пробирки.

Методика выделения мононуклеарной фракции из гепаринизированного костного мозга заключалась в следующем: костный мозг разводили физиологическим раствором (рН 7,2) в соотношении 1:5; центрифугировали в градиенте плотности фикола-верографин при 400g в течение 30 мин. Полученную мононуклеарную фракцию трижды отмывали в ЗФФР (физиологический раствор, забуференный с помощью фосфатно-солевого буфера) и ресуспендировали в среде RPMI-1640 в концентрации 106 клеток в мл. Жизнеспособность клеток, определяемая по методу окрашивания с трипановым синим, превышала 96%.

В опытной группе мононуклеарную фракцию аутологичного костного мозга  $4 \times 10^6$  клеток

в объеме 200 мкл вводили в ишемизированную конечность животного из двух точек, в каждую из которых по 100 мкл: 1) непосредственно под паховую связку в зону анатомического расположения коллатералей внутренней подвздошной артерии и ее ветвей; 2) интрамулярно в икроножную мышцу передне-латеральной поверхности средней трети голени. В группе сравнения мононуклеарную фракцию аутологичного костного мозга в аналогичном объеме вводили в мышцы бедра и голени ишемизированной конечности инфильтрационно из шести различных точек по известному способу [8].

Животные выводились из эксперимента путем передозировки наркоза хлоралгидрата на 10, 21 и 28 сутки. Перед выведением из эксперимента у крыс была оценена динамика клинических и флоуметрических показателей при моделировании ишемии конечности на разных сроках.

Оценка уровня микроциркуляции в мышцах бедра и голени крыс выполнялась методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Исследование осуществляли при помощи аппарата — лазер-доплеровского флоуметра “Biopac-systems MP-100” и датчика “TSD-144”. Запись и обработка данных производилась при помощи программы AcqKnowledge 38. Исследование выполняли под наркозом хлоралгидратом в дозе 250-300 мг/кг, который вводили внутривенно в виде водного раствора. После наступления наркотического сна иссекали участок кожи на передне-латеральной поверхности правого бедра и голени задней конечности. Животное укладывали на противоположную сторону. Датчик вплотную приставляли к мышце бедра, затем голени и проводили флоуметрию. Уровень микроциркуляции регистрировали в пяти точках: 1) середина длины мышцы; точки на 3-4 мм 2) выше, 3) ниже, 4) латеральнее и 5) медиальнее от первой. Запись кривой уровня микроциркуляции проводили в течение 30 сек в каждой точке. Из полученных пяти значений выводили среднее, которое вносили в протокол и принимали за уровень микроциркуляции в мышцах бедра и голени у данного животного.

У крыс опытной группы и группы сравнения лечение мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга начато на седьмые сутки после операции. Согласно результатам предшествующего исследования морфологические механизмы компенсации ишемии конечности — неоангиогенез — включаются в среднем на 7 сутки после операции моделирования. За этот срок мобилизуются все предсуществующие компенсаторные резервы организма животного; дальнейшие изменения в состоянии кровообра-

щения в конечности могут происходить только благодаря вмешательству извне [11].

Достоверность полученных при действии мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга изменений параметров, как абсолютных, так и в приростах от исходного уровня, определяли разностным методом описательной статистики с нахождением средних значений сдвигов (M), средней ошибки средней арифметической ( $\pm m$ ) и вероятности возможной ошибки (p), рассчитанной с использованием критерия Стьюдента для групп с различной дисперсией. Различия оценивали как достоверные при  $p < 0,05$ . Статистические расчеты проводились с использованием программы Microsoft Excel 2007.

## Результаты

Несмотря на достаточную агрессивность модели экспериментальной патологии и развития выраженной острой ишемии конечности, по прошествии 3-4 суток наблюдалась относительная компенсация артериальной недостаточности: конечность включалась в акт передвижения, исчезал или уменьшался ишемический отек. Параллельно с течением времени появлялись признаки формирующейся критической ишемии конечности, что характеризовалось наличием таких патогномоничных симптомов, как перемежающаяся хромота (при передвижении животного на расстояние 3-5 м, оно останавливалось и подворачивало оперированную конечность), трофические расстройства в дистальных участках конечности — артериальные трофические язвы. В некоторых случаях наблюдалась сухая гангрена пальцев стопы, характерная для синдрома хронической артериальной недостаточности. В отдельных случаях мы наблюдали самоампутацию конечности (очевидно, что развилась сухая гангрена с четкой демаркацией и последующим отторжением некротизированных участков). Т.е. у крыс на фоне экспериментальной патологии сформировались те же самые патогномоничные признаки критической ишемии конечности, которые наблюдаются у пациентов с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей (ХОЗАНК), представленные в таблице 1.

Из таблицы видно, что при обследовании у 65-98% животных зарегистрировано наличие болевого синдрома, гиперемия кожи голени и стопы, симптом «перемежающей хромоты», ограниченное участие конечности в передвижении, ишемический отек, трофические язвы, некрозы.

Для определения нормальных показателей у интактных животных оценивали уровень

**Частота симптомов экспериментальной критической ишемии конечности на 5-7 сутки после операции**

Симптомы экспериментальной ишемии конечности	Абсолютное количество	В процентах (%)
Боль (по косвенным признакам)	59	98
Ограниченное участие конечности в передвижении	54	90
«Переменяющаяся хромота»	53	88
Гиперемия кожи конечности	39	65
Сухая гангрена пальцев, части стопы	3	5
Артериальные трофические язвы	2	3,3
Ишемический отек	2	3,3
Сухая гангрена голени, самоампутация	4	6,6

микроциркуляции в мышцах бедра и голени правой задней конечности методом ЛДФ. Полученные средние значения уровня микроциркуляции в этой группе животных были приняты за «норму» и составили:  $588,74 \pm 19,28$  п.е. (перфузионных единиц) в мышце бедра и  $535,22 \pm 17,53$  п.е. в мышце голени.

Результаты оценки уровня микроциркуляции у интактных крыс, в контрольной, опытной группе и группе сравнения с моделированием ишемии правой задней конечности представлены в таблице 2.

Как видно из данных таблицы 2, после операции уровень микроциркуляции у животных контрольной группы резко и быстро снижается, а затем медленно восстанавливается, однако до 28 суток включительно остается достоверно ниже нормального значения, зафиксированного в группе интактных крыс. Прежних значений уровень микроциркуляции достигает только через 3 месяца после операции.

По сравнению с контрольной группой в группе сравнения уровень микроциркуляции на уровне бедра был выше на 10 сутки – в 1,6 раза, на 21 сутки – в 1,4 раза, на 28 сутки – в 1,7 раза; на уровне голени уровень микроциркуляции возрастает в 1,5 раза, в 1,3 раза и в 1,7 раза соответственно на тех же сроках.

При сопоставлении данных показателей между группой сравнения и опытной отмечено возрастание кровотока на 10 сутки на уровне

бедра в 1,5 раза, голени – в 1,1 раза, на 21 сутки на уровне бедра и голени – в 1,4 раза и на 28 сутки на уровне бедра и голени – в 1,2 раза. Это свидетельствует о том, что введение мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга из двух точек по предлагаемому способу оказывает более позитивное влияние на микроциркуляцию в ишемизированных мышцах.

### Обсуждение

В литературе описаны способы моделирования хронической ишемии конечности, которые включают в себя перевязку бедренной артерии у места отхождения, у места деления, а также перевязку всех ее ветвей на бедре. Нами в дополнение к указанному способу предпринято удаление участка магистрального сосуда конечности с перевязкой и пересечением а. saphena (аналог глубокой бедренной артерии человека) для предотвращения образования прямых анастомозов по “vasa vasorum”. Данная модификация модели приводит к развитию ишемии более тяжелой степени и позволяет получить схожую патогномичную картину хронической критической ишемии конечности, соответствующую третьей-четвертой стадии ишемии по классификации Покровского-Фонтейна у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

Одним из пусковых механизмов ангиоге-

Таблица 2

**Динамика уровня микроциркуляции в группах экспериментальных животных ( $M \pm m$  в абсолютных значениях перфузионных единиц,  $n=10$ )**

Группы животных	10 сутки		21 сутки		28 сутки	
	бедро	голень	бедро	голень	бедро	голень
Интактная	$588,74 \pm 19,28$	$535,22 \pm 17,53$	$588,74 \pm 19,28$	$535,22 \pm 17,53$	$588,74 \pm 19,28$	$535,22 \pm 17,53$
Контрольная	$234,30 \pm 7,22^*$	$209,20 \pm 6,45^*$	$349,53 \pm 15,71^*$	$312,08 \pm 14,03^*$	$413,91 \pm 16,4^*$	$369,56 \pm 14,64^*$
Группа сравнения	$366,86 \pm 17,7\#$	$310,31 \pm 15,39\#$	$496,92 \pm 26,93\#$	$423,41 \pm 23,42\#$	$717,46 \pm 37,11\#$	$615,18 \pm 32,27\#$
Опытная группа	$420,28 \pm 21,44^{**}$	$350,23 \pm 19,05^{**}$	$695,47 \pm 46,6^{**}$	$579,56 \pm 38,83^{**}$	$873,98 \pm 43,72^{**}$	$728,32 \pm 29,11^{**}$

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в интактной группе; # –  $p < 0,05$  в сравнении с показателями в контрольной группе, \*\* –  $p < 0,05$  в сравнении с показателями группы сравнения

неза является ишемия тканей. Процесс образования новых кровеносных сосудов регулируется многочисленными факторами. Среди них выделяют факторы, стимулирующие рост и образование новых сосудов-факторы роста: VEGF-сосудистый эндотелиальный фактор роста, FGF-фактор роста фибробластов, PDGF-тромбоцитарный фактор роста, HGF-фактор роста гепатоцитов, TNF- $\alpha$ -фактор некроза опухоли, TGF-трансформирующий фактор роста, VPF-сосудистый фактор проницаемости, EDGF-эпидермальный фактор роста. Однако монотерапия ангиогенными факторами оказалась малоэффективной. Результаты рандомизированных плацебоконтролируемых исследований пациентов с критической ишемией нижних конечностей после инъекции сосудистого фактора роста VEGF свидетельствуют об отсутствии достоверного улучшения заживления язв и переносимости физической нагрузки, уменьшения частоты проведения ампутаций, хотя по данным ангиографии отмечено усиление васкуляризации пораженной конечности. Главная причина неудачи применения метода в том, что в организме эти молекулы быстро разрушаются, а повторное их введение вызывает ряд побочных эффектов, к примеру, выраженную вазодилатацию с развитием системной гипотензии и возникновение сосудистых новообразований – гемангиом [12].

Изучение механизмов проангиогенного действия стволовых клеток костного мозга было расширено после открытия гемопоэтических клеток мононуклеарной фракции костного мозга относительно небольшой популяции эндотелиальных клеток-предшественников. Полагают, что при структурной перестройке сосудистой сети в поврежденной ткани, в основе которой лежит развитие коллатеральных артериол и ветвление капилляров, возможно формирование микрососудов *de novo* с участием эндотелиальных клеток-предшественников, мигрирующих из костного мозга в периферический кровоток и далее в зоны ишемии. Показано, что в ответ на ишемию увеличивается число циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников. Имеются доказательства возможности встраивания этих клеток в стенку капилляра с последующей дифференцировкой в зрелые эндотелиоциты [11].

Идея терапевтического ангиогенеза базируется на представлениях о том, что в тканях конечности, ишемизированной вследствие окклюзии просвета магистральных артерий, число функционирующих кровеносных капилляров уменьшается, и постулируется необходимость его увеличения. Трактовка такого механизма

саногенеза весьма затруднительна с физической точки зрения. Согласно закону Пуазейля, увеличение площади сечения за счет сосудов меньшего диаметра приводит к росту сопротивления тока жидкости в системе и не вызывает увеличения объемной скорости кровотока, т.е. не усиливает кровоснабжения конечности [13]. Следовательно, для возрастания уровня микроциркуляции необходимо не только развитие новых сосудов в ишемизированных тканях, но и возрастание притока крови к ним по развитым коллатералям.

Данные, полученные в ходе экспериментального исследования на крысах, показали, что введение мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга как в группе сравнения, так и в опытной способствует возрастанию уровня микроциркуляции уже на 21 и на 28 сутки соответственно при сопоставлении с интактными крысами. Это можно объяснить тем, что стимуляция ангиогенеза позволяет воздействовать на уровне микроциркуляторного русла, увеличивая плотность и общую площадь капиллярной сети, тем самым способствуя росту компенсаторных возможностей периферического сосудистого русла [14]. В опытной группе животных при введении мононуклеарной фракции аутологичного костного мозга из двух точек, первая из которых расположена в зоне достаточного кровоснабжения, а вторая – в зоне ишемизированных тканей, по сравнению с известным способом имплантации их инфильтрационным путем из шести различных точек в ишемизированные мышцы, удалось статистически достоверно улучшить микроциркуляцию на уровне бедра и голени. Это свидетельствует о том, что оригинальная техника введения клеток, кроме неангиогенеза в ишемизированных тканях, способствует скорейшему раскрытию ранее не функционирующих коллатералей и усилению притока крови по ним из проксимальных отделов конечности в дистальные, что регистрируется при лазерной доплеровской флоуметрии.

Данные, полученные в ходе экспериментального исследования, позволяют надеяться на то, что способ стимуляции коллатерального кровообращения мононуклеарной фракцией аутологичного костного мозга в перспективе займет свое прочное место в комплексном лечении ангиохирургических пациентов.

## Выводы

1. Разработанная модель создания критической ишемии конечности в эксперименте путем иссечения магистрального сосуда, включающего бедренную артерию, подколенную

артерию и начальные отделы артерий голени, позволяет получить схожую патогномичную картину ишемии конечности, соответствующую третьей-четвертой стадии ишемии по классификации Покровского-Фонтейна у пациентов, страдающих хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.

2. Разработанный способ введения полученной моноклеарной фракции аутологичного костного мозга  $4 \times 10^6$  клеток в объеме 200 мкл в ишемизированную конечность из двух точек, в каждую из которых по 100 мкл: непосредственно под паховую связку в зону анатомического расположения коллатералей внутренней подвздошной артерии и ее ветвей и интрамукулярно в икроножную мышцу передне-латеральной поверхности средней трети голени позволяет активизировать коллатеральное кровообращение за счет резерва функционально незадействованных коллатеральных артерий и усиления притока крови из проксимальных отделов конечности в дистальные, что регистрируется при помощи лазерной доплеровской флоуметрии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов М. Р. Ранние реокклюзии у больных облитерирующим атеросклерозом / М. Р. Кузнецов, В. М. Кошкин, А. В. Каралкин. — Ярославль : Медицина, 2007. — 176 с.
2. Барсенев А. В. Аутогенная трансплантация клеток при ишемии конечностей в клинике / А. В. Барсенев // Клеточ. трансплантология и тканевая инженерия. — 2005. — № 1. — С. 40–43.
3. Lawall H. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal / H. Lawall, P. Bramlage, B. Amann // *Thromb Haemost.* — 2010 Apr. — Vol. 103, N 4. — P. 696–709. doi: 10.1160/TH09-10-0688.
4. Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years / L. Armstrong [et al.] // *Stem Cells.* — 2012 Jan. — Vol. 30, N 1. — P. 2–9. doi: 10.1002/stem.1007.
5. Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROV-ASA) / D. H. Walter [et al.] // *Circ Cardiovasc Interv.* — 2011 Feb 1. — Vol. 4, N 1. — P. 26–37. doi: 10.1161/circinterventions.110.95348.
6. Interim analysis results from the RESTORECLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia / R. J. Powell [et al.] // *J Vasc Surg.* — 2011 Oct. — Vol. 54, N 4. — P. 1032–41. doi: 10.1016/j.jvs.2011.04.006.
7. Ноздрачев А. Д. Анатомия крысы (Лабораторные животные) / А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков ; под ред. А. Д. Ноздрачева. — СПб. : Лань, 2001. — 464 с.
8. Treating chronic pain with mesenchymal stem cells: A therapeutic approach worthy of continued investigation / R. S. Waterman, A. M. Betancourt // *J Stem Cell Res Ther.* — 2011. — Vol. S2. — P. 001. doi: 10.4172/2157-7633.S2-001.
9. Способ лечения хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей : пат. 2392948 РФ : А61К 35/14, А61Р 9/10, А61М 5/00 / Б. С. Суковатых, А. Ю. Орлова, М. В. Покровский, Е. Б. Артющкова ; дата публ. 27.06.2010.
10. Bøyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow / A. Bøyum // *Scand J Clin Lab Investig.* — 1998. — Vol. 21. — Suppl. 97. — P. 1–9.
11. Tidball J. G. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration / J. G. Tidball, S. A. Villalta // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* — 2010 May. — Vol. 298, N 5. — P. R1173–87. doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009.
12. Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia / J. Belch [et al.] // *Lancet.* — 2011 Jun 4. — Vol. 377, N 9781. — P. 1929–37. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60394-2.
13. Шевченко Ю. Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии / Ю. Л. Шевченко. — СПб. : Наука, 2006. — 288 с.
14. Fadini G. P. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature / G. P. Fadini, C. Agostini, A. Avogaro // *Atherosclerosis.* — 2010 Mar. — Vol. 209, N 1. — P. 10–17. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.033.

#### Адрес для корреспонденции

305041, Российская Федерация,  
г. Курск, ул. К.Маркса, д. 3,  
ГБОУ ВПО «Курский государственный  
медицинский университет»,  
кафедра общей хирургии,  
тел. раб. 8 4712 52-98-62,  
e-mail: SukovatykhBS@kursksmu.net,  
Суковатых Борис Семенович

#### Сведения об авторах

Суковатых Б.С., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет».  
Орлова А.Ю., к.м.н., ассистент кафедры общей хирургии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет».  
Артющкова Е.Б., д.б.н., директор НИИ экологической медицины ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет»  
Гордов М.Ю., соискатель кафедры общей хирургии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет».  
Веденьев К.Ю., студент 3 курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет».

Поступила 7.05.2015 г.