

**П. М. Ларионов<sup>1,3</sup>, А. М. Чернявский<sup>1</sup>, В. В. Асташов<sup>2,3</sup>,  
Р. Б. Новрузов<sup>1</sup>, О. В. Казаков<sup>2</sup>, Д. В. Субботин<sup>1,3</sup>, Д. С. Сергеевичев<sup>1</sup>,  
Г. С. Зайцев<sup>1</sup>, Я. Л. Русакова<sup>1</sup>, О. А. Субботина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. Академика Е. Н. Мешалкина  
ул. Речкуновская, 15, Новосибирск, 630055, Россия

<sup>2</sup> НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН  
ул. Академика Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: nruslan1979@mail.ru

## **СТИМУЛЯЦИЯ НЕОВАСКУЛОГЕНЕЗА ПРИ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

В эксперименте проведена сравнительная морфофункциональная оценка направленного ангиогенеза с использованием сепарированной мононуклеарной фракции клеток костного мозга в сочетании с лазерным туннелированием мышц при ишемии нижних конечностей. Работа выполнена на серии крыс линии Wistar, которым осуществлялось моделирование ишемии нижних конечностей с последующим использованием методик непрямого реваскуляризации: изолированная имплантация сепарированной фракции аутологичных мононуклеарных клеток костно-мозгового происхождения в сочетании с лазерным туннелированием мышц нижних конечностей. Методика оказалась эффективной, она может быть использована для стимуляции процессов ангиогенеза при нереконструктабельном дистальном поражении сосудов нижних конечностей.

*Ключевые слова:* нижние конечности, ишемия, неоваскулогенез, лазерная реваскуляризация.

Опубликованные сведения мультицентрового исследования демонстрируют, что около 8 миллионов человек в возрасте от 40 лет и старше страдают окклюзионными поражениями периферических артерий. Широкое распространение и неуклонный рост этой группы заболеваний определяют неутешительный прогноз [1]. Среди общего числа пациентов с заболеваниями периферических артерий только 10 % имеют классический симптом перемежающейся хромоты и около 40 % больных не предъявляют жалоб на боли в ногах, в то время как 50 % имеют различные варианты классического симптома [2; 3].

По результатам национального исследования, проведенного Vascular Society of Great Britain [4], количество пациентов,

страдающих ишемией нижних конечностей, составляет 400 на 1 000 000 населения в год. Около 90 % всех ампутаций выполняются по поводу выраженной ишемии нижних конечностей, и у 25 % пациентов с критической ишемией требуется ампутация голени или бедра [5]. По данным Л. А. Бокерия и соавт. [6], потребность в реконструктивных операциях на артериальной системе в нашей стране составляла 930 на 1 000 000 населения, однако ежегодно выполнялось не более 22 % от необходимого количества.

Предложены методы по улучшению кровотока в нижних конечностях при нереконструктабельном поражении дистального русла. В последние 30 лет целью многих исследований было изучение возможности улучшения кровообращения нижних конеч-

---

ностей методами стимуляции ангиогенеза. Изучение биологии стволовых клеток привело к определению многих фундаментальных принципов лечения с использованием клеточных технологий. Многочисленные исследования – как экспериментальные, так и клинические, проводимые в этом направлении, позволили по-новому взглянуть на процессы ангиоваскулогенеза, направленные на стимуляцию коллатерального кровотока [7].

**Цель** нашего исследования – экспериментальная сравнительная морфофункциональная оценка направленного ангиогенеза с использованием сепарированной моноклеарной фракции клеток костного мозга в сочетании с лазерным туннелированием мышц при ишемии нижних конечностей у крыс.

### Материал и методы

Для сравнения различных вариантов неангиогенеза была выполнена серия экспериментальных исследований на лабораторных крысах линии Wistar. С целью создания модели ишемии задней конечности под эфирным наркозом выполнялась перевязка правой бедренной артерии с коллатеральными [8]. Все животные были разделены на три группы. На 25-е сутки после перевязки бедренной артерии в ишемизированную конечность животным 1-й группы (7 крыс) инъекционно вводилась сепарированная моноклеарная фракция стволовых клеток, во 2-й группе (8 крыс) производилась имплантация стволовых клеток с предшествующим лазерным туннелированием мышц ишемизированной конечности по отработанной методике [9], в 3-й группе животных (6 крыс) после наложения лигатуры на бедренную артерию никаких манипуляций не осуществлялось.

Имплантация моноклеарной фракции стволовых клеток выполнялась в общем объеме 0,4 мл, по две инъекции с латеральной (Lat) и медиальной (Med) сторон (0,1 мл на инъекцию). В качестве контроля (Control) использовалась контрлатеральная конечность.

В эксперименте применялся полупроводниковый лазер «ИРЭ-Полнос» в непрерывном режиме с длиной волны 1,56 мкм с ис-

пользованием кварцевого световода диаметром 600 мкм.

На 60-е сутки после моделирования ишемии нижних конечностей проводили лазерную доплеровскую флоуметрию с применением лазерного анализатора капиллярного кровотока (ЛАКК-01, НПП «Лазма», Россия) с последующим забором образцов мышечной ткани для гистологического исследования.

Измерение кровотока производили в голени правой конечности. На месте проведения измерения выбривали шерсть, фиксировали накожный зонд анализатора. Измерения проводили на длинах волн излучения 0,63 мкм, время записи ЛДФ-граммы составляло 3 мин. Вычисление амплитудно-частотного спектра колебаний перфузии осуществляли с помощью прилагаемого к анализатору ЛАКК-01 программного обеспечения. При анализе доплерограмм оценивали динамику среднего значения показателя микроциркуляции (M), среднеквадратического отклонения ( $\delta$ ), коэффициента вариации ( $K_v$ ). Рассматривались три частотных диапазона, в которых осуществлялась модуляция стенки сосуда [10].

Медленные колебания (зона LF-ритма) определяются активностью собственных компонентов микроциркуляторного русла. Быстрые колебания (зона HF-ритма) совпадают с дыхательными ритмами и зависят от колебаний венозного кровотока в связи с изменением давления в грудной клетке в фазы вдоха и выдоха. Кардиоритмы (зона CF-ритма) совпадают с пульсовыми колебаниями кровотока.

Так как на практике не всегда удобно использовать абсолютные величины амплитуд колебаний в выделяемом спектре частот, в нашем исследовании нами оценивалось соотношение  $A_{\max HF}$  и  $A_{\max CF}$  к  $A_{\max LF}$ , а также индекс эффективности микроциркуляции (ИЭМ) [11].

По окончании исследования животных выводили из опыта путем передозировки эфира в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных». Для гистологических исследований производился забор материала с медиальной и латеральной областей бедра и голени животных с последующей фиксацией в

10 % растворе нейтрального формалина. Серийные гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином, а также осуществлялась флюоресцентная окраска первичными моноклональными антителами anti-CD31 в рабочем разведении 1 : 100 с последующим вторичным окрашиванием Cy 5-конъюгированными Goat anti-mouse антителами (разведение 1 : 100). Флюоресценция регистрировалась при длине волны поглощения в диапазоне 578–591 нм и длине волны возбуждения 520 нм. Проводили подсчет суммарного количества капилляров на единицу площади (1 мм<sup>2</sup>). Анализ результатов проводился с использованием специализированных программ AxioVision 4.1, Excel 2007 и Origin 7.5 Pro.

### Результаты исследования и обсуждение

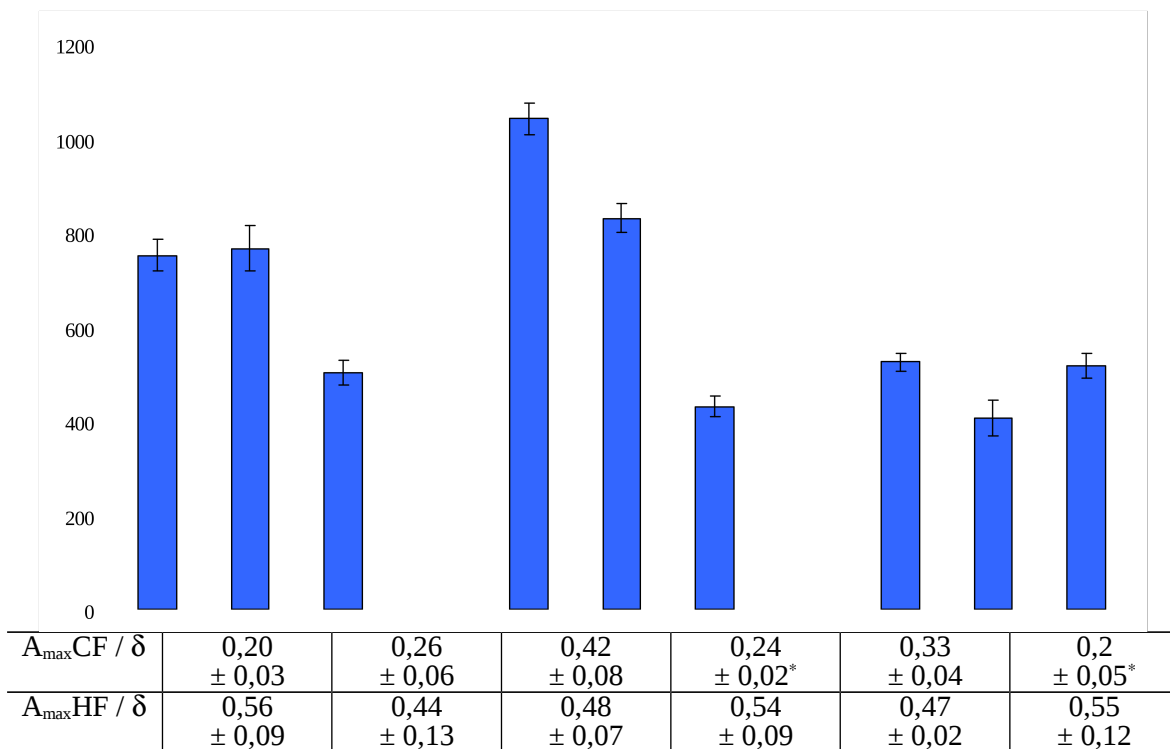
Исследование микроциркуляции в голени правой конечности через 60 суток экспериментальной ишемии правой конечности выявило приближение показателя к значению в левой, не ишемизированной конечности. В голени правой конечности, по сравнению с левой, отмечалось увеличение (на 56,1 %) показателя, характеризующего модуляцию кровотока в микроциркуляторном русле и индекса эффективности микроциркуляции (на 31,5 %). Увеличение значения  $K_V$  отражало улучшение микроцир-

куляции. Этот факт мог быть обусловлен повышением вазомоторной активности микрососудов, о чем свидетельствовало увеличение соотношения  $A_{\max}LF / M$  на 85,7 и  $A_{\max}LF$  на 88,7 %, а также нарастанием вклада пассивного (дыхательного) механизма регуляции капиллярного кровотока, зависящего от колебаний венозного кровотока, в связи с изменением давления в грудной клетке в фазы вдоха и выдоха (увеличение  $A_{\max}HF$  на 84,9 %). Все эти изменения в микроциркуляции происходили на фоне уменьшения вклада кардиального механизма регуляции капиллярного кровотока: снижалось соотношение  $A_{\max}CF / A_{\max}LF$  на 42,3,  $A_{\max}CF / \delta$  на 39,4 % (табл.).

При исследовании гемодинамики в голени правой конечности через 60 суток экспериментальной ишемии правой конечности в условиях введения на 25-й день эксперимента стволовых клеток (СК), как и в группе без коррекции, выявлено приближение показателя микроциркуляции к значению в левой, не ишемизированной конечности. При этом основной вклад в микроциркуляцию исследуемой конечности, в отличие от группы без коррекции, выполнял пассивный (кардиальный) механизм регуляции капиллярного кровотока: по сравнению с левой конечностью увеличивалось  $A_{\max}CF / A_{\max}LF$  в 2,7 раза и  $A_{\max}CF$  на 88,2 %. По сравнению с группой без коррек-

Показатели микроциркуляции правой конечности на 60-е сутки до и после коррекции ( $M \pm \Delta m$ )

Показатель	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	левая конечность	правая конечность	левая конечность	правая конечность	левая конечность	правая конечность
M	14,72 ± 2,01	17,10 ± 3,23	22,92 ± 2,46	20,48 ± 1,35 <sup>#</sup>	14,75 ± 0,88	14,92 ± 1,86
$\delta$	0,86 ± 0,23	1,24 ± 0,41	1,0 ± 0,21	1,16 ± 0,09 <sup>#</sup>	1,14 ± 0,08	1,78 ± 0,45
$K_V$	5,38 ± 0,97	6,41 ± 0,76 <sup>#</sup>	4,53 ± 1,03	5,79 ± 0,61 <sup>#</sup>	7,64 ± 1,73	11,87 ± 2,87
ИЭМ	1,49 ± 0,14	1,22 ± 0,21	0,95 ± 0,10	1,58 ± 0,15 <sup>*</sup>	1,08 ± 0,06	1,42 ± 0,26
$A_{\max}CF / A_{\max}LF$	0,20 ± 0,04	0,54 ± 0,15 <sup>*#</sup>	0,51 ± 0,13	0,2 ± 0,03 <sup>*</sup>	0,45 ± 0,05	0,26 ± 0,06 <sup>*</sup>
$A_{\max}HF / A_{\max}LF$	0,52 ± 0,06	0,53 ± 0,05	0,62 ± 0,10	0,44 ± 0,04 <sup>*</sup>	0,60 ± 0,12	0,56 ± 0,09
$A_{\max}LF / M$	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02 <sup>#</sup>	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01 <sup>#</sup>	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,03 <sup>*</sup>
$\delta / A_{\max}LF$	0,83 ± 0,13	0,99 ± 0,33	1,18 ± 0,23	0,80 ± 0,10	1,07 ± 0,11	0,89 ± 0,24



Примечание: \* – отличия достоверны по сравнению с показателями левой конечности данной группы ( $p < 0,05$ ); # – отличия достоверны по сравнению с показателями правой конечности крыс 3-й группы ( $p < 0,05$ ).

Med – латеральная область бедра; Lat – медиальная область бедра; Control – фрагмент мышечной ткани контрлатеральной конечности

Рис. 1. Суммарная плотность капилляров на 1 мм<sup>2</sup>.

Lat – латеральная область бедра; Med – медиальная область бедра;  
Control – фрагмент мышечной ткани контрлатеральной конечности

ции, во 2-й группе животных установлено снижение миогенной активности вазомоторов (уменьшалось соотношение  $A_{\max}LF / M$  на 46,2 %), увеличение вклада кардиального механизма регуляции капиллярного кровотока (увеличивалось  $A_{\max}CF / A_{\max}LF$  в 2,1 раза).

При исследовании гемодинамики в голени правой конечности через 60 суток экспериментальной ишемии правой конечности при условии введения на 25 сутки СК и воздействия лазерным излучением показатель микроциркуляции не имел достоверных отличий от значений левой конечности. По сравнению с контрлатеральной конечностью выявлено уменьшение вклада кардиального и дыхательного механизмов регуляции капиллярного кровотока: уменьшались соотношения  $A_{\max}CF / A_{\max}LF$  на 60,8,  $A_{\max}CF / \delta$  на 42,9 и  $A_{\max}HF / A_{\max}LF$  на 29,0 %. При этом по сравнению с 3-й группой крыс у животных с коррекцией СК и лазерным излучением определено увеличение значения микроциркуляции, происходящее на фоне снижения миогенной актив-

ности вазомоторов: уменьшалось соотношение  $A_{\max}LF / M$  на 46,2 %.

Морфометрические показатели капиллярного кровотока в рассматриваемые сроки также практически совпадали с данными лазерной доплеровской флоуметрии. Выявлено, что суммарное количество капилляров на 35-е сутки после непрямой реваскуляризации в 1-й (765,12) и во 2-й группе животных (1 041,01) было достоверно выше по сравнению с контрольной 3-й группой крыс (524,76). Суммарное количество капилляров поперечно-полосатой мускулатуры задней группы мышц бедра интактного животного составило 364,5–543,9 мм<sup>2</sup>. Приведенные показатели указывают на выраженный ангиогенный эффект со стороны микроциркуляторного русла в ответ на варианты непрямой реваскуляризации.

Следует отметить, что численное значение суммарного количества капилляров в группе с использованием лазерного туннелирования и имплантации стволовых клеток превысило аналогичный показатель группы

---

---

крыс с изолированным использованием стволовых клеток на 36 % (рис. 1).

При проведении обзорной микроскопии мест проведения лазерной реваскуляризации в сочетании с имплантацией стволовых клеток определялись участки склеротической и рубцовой ткани с различной степенью неоваскуляризации на границе с рубцовой зоной, а также непосредственно в зоне рубца. Выявлено присутствие как тонкостенных, так и толстостенных капилляров различного

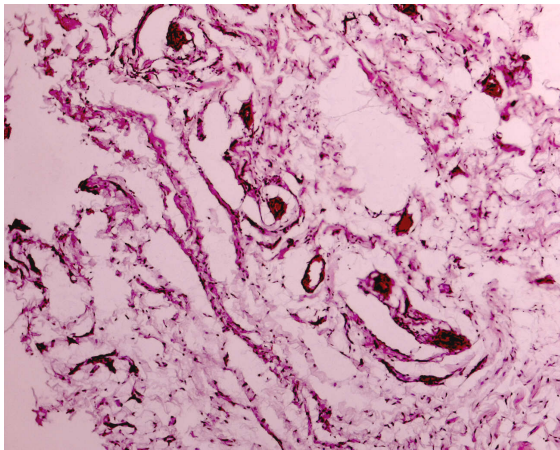


Рис. 2. Толстостенные и тонкостенные полнокровные сосуды среднего и малого калибров непосредственно в зоне рубца. Зона имплантации клеток в лазерные каналы. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 260$ .

диаметра, определялись разрозненные скопления «сосудистых почек» (рис. 2). Отмечено образование капиллярных трубочек с последующей трансформацией их в кровеносные сосуды капиллярного типа.

Анализ полученных морфологических данных, а также динамика некоторых показателей микроциркуляции, подтвердила эффективность проведенной непрямої реваскуляризации с использованием лазерного туннелирования и клеточных технологий. Аналогичные данные были получены ранее группой ученых под руководством Т. Мурогана, которая производила внутримышечные инъекции гемопоэтических стволовых клеток крысам с моделью ишемии конечностей. Оказалось, что это приводит к значительному улучшению кровотока и увеличению плотности капилляров [12].

### Заключение

В результате проведенных экспериментальных исследований выявлено, что внутримышечная имплантация сепарированной фракции аутологичных мононуклеарных клеток костно-мозгового происхождения в сочетании с лазерным туннелированием мышц безопасна, эффективна и может использоваться в качестве методики для стимуляции процессов ангиогенеза при нереконструктабельном дистальном поражении сосудов нижних конечностей.

Результаты проведенного исследования, демонстрирующие состоятельность и эффективность предложенной методики направленного ангиогенеза, позволяют продолжить и расширить научные изыскания в этом направлении.

### Список литературы

1. Selvin E., Erlinger T. P. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000 // *Circulation*. 2004. Vol. 110. P. 738–743.
2. Criqui M. H., Fronek A., Klauber M. R., Barrett-Connor E., Gabriel S. The sensitivity, specificity, and predictive value of traditional clinical evaluation of peripheral arterial disease: results from noninvasive testing in a defined population // *Circulation*. 1985. Vol. 71. P. 516–522.
3. Hirsch A. T., Criqui M. H., Treat-Jacobson D., Regensteiner J. G., Creager M. A., Olin J. W., Krook S. H., Hunninghake D. B., Comerota A. J., Walsh M. E., McDermott M. M., Hiatt W. R. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care // *JAMA*. 2001. Vol. 286. P. 1317–1324.
4. Vascular Society of Great Britain and Ireland // *B. J. Surg*. 2007. Vol. 94. P. 1–13.
5. Baumgartner I., Schainfeld R., Graziani L. Management of peripheral vascular disease // *An. Rev. Med*. 2005. Vol. 56. P. 249–272.
6. Бокерия Л. А., Гудкова Р. Г. Хирургия сердца и сосудов в Российской Федерации. М., 1998.
7. Yancopoulos G. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation // *Nature*. 2000. Vol. 407. P. 242–248.
8. Шевченко Ю. Л., Матвеев С. А. Клеточные технологии в сердечно-сосудистой хирургии. М., 2005.
9. Чернявский А. М., Ларионов П. М., Фомичев А. В., Субботин Д. В., Сергеевичев Д. С., Чернявский М. А. Морфофункциональная оценка различных методов непрямої реваскуляризации миокарда в эксперименте // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*. 2007. № 6. С. 30–36.
10. Kvernmo H. D., Stefanovska A., Kirkeboen K. A., Kvernebo K. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified

by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators // *Microvasc. Res.* 1999. Vol. 57, № 3. P. 298–309.

11. Козлов В. И. Механизм модуляции кровотока в системе микроциркуляции и его расстройство при гипертонической болезни // *Применение лазерной доплеровской флоуметрии в медицинской практике: Материалы II Всерос. симп. М., 2000, С. 5–15.*

12. Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki K., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K., Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization // *J. Clin. Invest.* 2000. Vol. 105, № 11. P. 1527–1536.

*Материал поступил в редколлегию 11.02.2009*

**P. M. Larionov, A. M. Chernyavskiy, V. V. Astashov,  
R. B. Novruzov, O. V. Kazakov, D. V. Subbotin, D. S. Sergeyevichev,  
G. S. Zaitsev, Ya. L. Rusakova, O. A. Subbotina**

**Stimulation of the Neovasculogenesis  
in Patients with Chronic Ischemia of Lower Extremities**

At the present moment the problem of irreconstructable distal vascular bed lesions is paid on much attention. The introduction of the new methods of treatment of this pathology is of big value. The study is done on an experimental series of the Wistar rats. The model of the chronic ischemia of the lower extremities was created, then several methods of indirect revascularization were used- implantation of separated fraction of autologous mononuclear bone marrow cells, isolated and with creation of laser tunnels in the muscles of lower extremities. The method of intramuscular implantation of the autologous mononuclear bone marrow cells combined with laser tunneling of muscles is effective and may be used as a method of angiogenesis stimulation in patient with irreconstructable distal vascular bed lesions.

*Keywords:* bottom extremities, neovasculogenesis, laser revascularization.