

На правах рукописи

Новрузов Руслан Байрам оглы

**НАПРАВЛЕННЫЙ АНГИОГЕНЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ В СОЧЕТАНИИ С ЛАЗЕРНЫМ ТУННЕЛИРОВАНИЕМ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТЕЙ
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Ларионов Петр Михайлович
доктор медицинских наук, профессор
Чернявский Александр Михайлович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Мичурина Светлана Викторовна
(НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН,
г. Новосибирск, главный научный сотрудник Лаборатории
функциональной морфологии лимфатической системы)
доктор медицинских наук
Сафонов Виталий Алексеевич
(НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Новосибирск-
Главный» ОАО «Российские железные дороги», заведующий
отделением хирургического лечения сложных нарушений
сердечного ритма кардиологического центра)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (г. Барнаул)

Защита состоится 29 мая 2012 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д.208.062.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; тел.: 383-229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52).

Автореферат разослан «_____» апреля 2012 года

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Идея клеточной трансплантации для лечения хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК) (прежде всего атеросклеротического и диабетического генеза) успешно реализуется последние 5 лет (Cho H-J et al., 2003). Эти исследования стали предпосылкой для продолжения работ по изучению неоваскуляризации с использованием «клеточных технологий». Разработке этой лечебной тактики способствовало развитие современных представлений о молекулярных и клеточных механизмах регуляции роста и ремоделирования кровеносных сосудов. Большое внимание в этом аспекте уделяется теоретическим и практическим разработкам использования клеток моноклеарной фракции костного мозга (МНФ КМ). Это объясняется их уникальным свойством – пластичностью, т.е. способностью дифференцироваться в клетки практически всех мезенхимальных тканей. Проведен ряд исследований, в которых доказана возможность клеток костного мозга и других источников дифференцироваться в клетки других типов (нейроны головного и спинного мозга, гепатоциты, клеточные популяции поджелудочной железы, в том числе продуцирующие инсулин, эндотелиоциты, миобласты, остециты, хондроциты, эпителиоциты и др.), (Деев Р.В. и др., 2005; Волков А.В. и др., 2005; Chen J. et al., 2001; Arvidsson A. et al., 2002; Riess P. et al., 2002; Aliotta J. M. et al., 2007).

Существует значительная группа больных, для которых выбор традиционных методов прямой реваскуляризации ограничен. Невозможность выполнения прямой реваскуляризации обусловлена не только возрастом и общим состоянием больных, сопутствующей патологией, но и многоэтажностью атеросклеротического поражения артерий, дистальными окклюзиями.

Несмотря на мощный арсенал современных фармакологических средств и хирургических методик, проблема лечения вышеуказанного контингента больных далека от решения. Хотя прямая реваскуляризация была, есть и будет в ближайшем будущем приоритетным методом лечения хронической ишемии нижних конечностей, наряду с ней одним из альтернативных путей лечения является использование непрямых методик стимуляции неоангиогенеза в поражённых конечностях, позволяющих избежать ампутации. Эти методы

направлены на улучшение трофики конечности, и как следствие этого – увеличение объёма микроциркуляторного русла.

Таким образом, методы, направленные на стимуляцию ангиогенеза и васкуляризации и улучшающие трофику поражённых конечностей, в итоге могут стать методом выбора в лечении пациентов с дистальными неоперабельными поражениями сосудистого русла нижних конечностей. Решение перечисленных вопросов определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования. Изучить структурно-клеточные и функциональные изменения при клеточно-опосредованном и лазерно-индуцированном ангиогенезе в условиях хронической ишемии конечностей крыс.

Задачи исследования

1. Дать морфо-функциональную оценку клеточно-опосредованного неоангиогенеза тканей бедра при имплантации моноклеарной фракции клеток костного мозга.

2. Оценить морфо-функциональные изменения мышечных тканей в местах имплантации моноклеарных клеток костного мозга в лазерные каналы.

3. Выявить особенности распределения моноклеарных клеток при их имплантации в лазерные каналы и при инъекционном методе их введения в следующие постимплантационные периоды (6, 12 и 24 часа).

4. Сопоставить структурно-клеточные и функциональные изменения, полученные при использовании лазерного туннелирования в сочетании с инъекцией костномозговых клеток и изолированной имплантации моноклеарных клеток.

Научная новизна исследования. Впервые разработана в экспериментальных условиях методика имплантации костномозговых моноклеарных клеток в лазерные каналы. Проведен анализ непосредственных результатов и дана комплексная морфо-функциональная оценка неоангиогенеза после комбинированного лазерно-индуцированного и клеточно-опосредованного неоангиогенеза на модели хронической ишемии конечностей крыс. Оценены отдаленные результаты комбинированного применения имплантации костномозговых моноклеарных клеток в сочетании с лазерным туннелированием мышц конечностей. Проанализирована динамика изменения

тканевого кровотока и степени ишемии конечностей при сочетанном применении лазерно-индуцированного и клеточно-опосредованного неоангиогенеза. Впервые при комплексной морфо-функциональной оценке проведен анализ ангиогенного потенциала методики лазерного туннелирования и имплантации костномозговых клеток и обоснована значимость данной методики в сердечно-сосудистой хирургии.

Практическая значимость. Разработана в эксперименте методика имплантации костномозговых моноклеарных клеточных культур и использовании полупроводникового лазера. Результаты работы позволяют сделать новый шаг по освоению метода лечения пациентов с хронической ишемией конечностей. Полученные в процессе экспериментального исследования результаты вносят существенный вклад в понимание роли эндотелиальных клеток-предшественников костномозгового происхождения в процессах васкуляризации ишемизированных областей скелетной мускулатуры, позволяют усовершенствовать метод непрямой ревазуляризации конечностей.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Комбинация клеточно-опосредованного и лазер-индуцированного ангиогенеза обладает более выраженным ангиогенным потенциалом против изолированной имплантации моноклеарных клеток костного мозга на модели ишемии конечностей.

2. Комбинированная морфо-функциональная оценка с использованием методов иммуногистохимического определения капиллярной сети на основе окрашивания CD31+ и лазерной доплеровской флуометрии адекватно отражает состояние микроциркуляторного русла.

Апробация материалов диссертации. Основные материалы исследования доложены на VI научных чтениях, посвященных памяти академика РАМН Е.Н.Мешалкина, с международным участием (Новосибирск, 2008), на VII Международной конференции “Гемореология и микроциркуляция” (Ярославль, 2009), на заседании ученого совета Новосибирского научно-исследовательского института патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, 2009), на заседании Ученого совета Новосибирского государственного медицинского университета (Новосибирск, 2012).

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных научных работ, из них 3 статьи – в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендуемых для публикаций результатов диссертационных исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста и содержит 4 таблицы и 17 рисунков, работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, главы результатов собственного исследования, заключения и обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список использованной литературы содержит перечень 177 работ отечественных и зарубежных авторов.

Личный вклад автора. Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 84 крысах, инбредных самцах линии Wistar, одного возраста, массой 250-300 г. При проведении экспериментов руководствовались рекомендациями, изложенными в Приказе № 755 МЗ СССР от 12.08.1977 г. Все экспериментальные работы выполнены с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей. Для отработки модели ишемии и изучения топографоанатомического строения структур задней конечности у крыс проведено исследование на 5-ти животных.

Методика забора и получения мононуклеарных костномозговых клеток и разделение её на фракции производили в условиях операционной. У крыс выполнялась диссекция конечностей, выделялись бедренные кости, срезались эпифизы. При помощи иглы промывали содержимое костномозгового канала 0,9 % раствором NaCl в объеме 50 мл. Аспират костного мозга помещали в стерильную пробирку с двумя объемами физиологического раствора (ФР) и гепарином, из расчета 20 ед. гепарина на 1 мл аспирата. Разведенный ФР костный мозг наслаивался на раствор фиколл-урографина с плотностью 1,077 г/мл и центрифугировался при 400 g в течение 40 мин при температуре 22 °С. Далее собиралось интерфазное кольцо. После двукратной отмывки питательным

раствором RPMI-1640 определялась жизнеспособность клеток полученной МНФ. При окрашивании трипановым синим жизнеспособность суспензии превышала 96 %.

При разделении прилипающей и неприлипающей МНФ использовалось физиологическое свойство клеток адгезироваться к той или иной поверхности. Для этого полученная суспензия клеток МНФ КМ ресуспендировалась в питательной среде RPMI-1640 без добавок и высаживалась в культуральные флаконы площадью 25 см² из расчета 10⁵ клеток на 1 см². Далее следовала 30-минутная инкубация в СО₂-инкубаторе в атмосфере 5 % углекислоты при 37 °С. Затем жидкую фазу переносили в новые пробирки и оставшиеся в суспензии клетки отмывались от питательной среды ФР, ресуспендировались в концентрации 5x10⁶ кл/мл в ФР и переносились в шприцы для имплантации.

Диагностика клеточного материала. Перед имплантацией клеточного материала проводилась его качественная и количественная оценка. Клетки подсчитывались в 100 больших квадратах. Результаты подсчета в больших квадратах суммировались и производились вычисления кол-ва клеток в 1 мкл. МФ по формуле $x = (a \times 4000 \times b) / 1600$, где x – кол-во клеток в 1 мкл. МФ, a – кол-во клеток в 100 больших квадратах, b – разведение МФ, 1600 – кол-во малых квадратов, 4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл, исходя из объема малого квадрата (1/4000).

Для определения клеточного состава использовался метод иммунофлюоресцентной микроскопии. В суспензии клеток, конъюгированных с флюоресцентно-мечеными антителами, подсчитывался процент позитивных клеток в 100 больших квадратах.

Методика создания модели хронической ишемии конечностей. Под эфирным наркозом осуществлялся доступ к бедренной артерии. Учитывая особенности кровоснабжения задних конечностей крыс, выполнялась перевязка бедренной артерии, артерии сафена, подколенной артерии, краниальных и каудальных большеберцовых артерий.

С целью оценки пролиферативных свойств имплантируемых клеток была создана серия экспериментальных животных, которым вводилась суспензия моноклеарной фракции костномозговых клеток меченных

5-бромдезоксисуридином (BrDU). BrDU является аналогом тимидина способным включаться в ДНК в процессе репликации. Животные выводились из эксперимента через 6, 12 и 24 часа. По 5 животных на каждый исследуемый часовой промежуток.

Согласно поставленным задачам, все животные были разделены на 3 группы, в качестве внутреннего контроля в каждой группе использовалась контрлатеральная (неоперированная) конечность (табл. 1).

Таблица 1

Распределение животных по экспериментальным группам

	1-я группа – изолированная внутримышечная имплантация моноклеарных костномозговых клеток (n = 21)	2-я группа – имплантация клеточной культуры с лазерным туннелированием (n = 22)	3-я группа (контроль) – перевязка артерий без последующих манипуляций (n = 21)
	Моделирование ишемии задней конечности с последующей стимуляцией ангиогенеза на 28-е сутки		
5-е сутки после стимуляции ангиогенеза	5 животных	5 животных	5 животных
15-е сутки после стимуляции ангиогенеза	5 животных	5 животных	5 животных
25-е сутки после стимуляции ангиогенеза	5 животных	6 животных	5 животных
35-е сутки после стимуляции ангиогенеза	6 животных	6 животных	6 животных
Наблюдение, кожная термометрия, ЛД флуометрия, морфологические и морфометрические методы			

На 28 сутки после создания “модели” ишемии конечностей – животным первой группы внутримышечно инъекционно вводили культуру костномозговых сепарированных моноклеарных клеток в объеме 0,1 мл на 1 вкол, по 2 инъекции с медиальной и латеральной сторон. Животным второй группы введению клеток

предшествовала лазерная туннелизация мышц ишемизированной конечности. В эксперименте использовался полупроводниковый лазер: Модель ЛС-1,56 мкм-«ИРЭ-Полус» в непрерывном режиме с длиной волны 1,56 мкм и мощностью в 8 Вт, использование этих показателей сопровождается наименьшей глубиной повреждения, отсутствием явления обжига на тканях при сохранении достаточной производительности. Через кварцевый световод диаметром 600 мкм перпендикулярно поверхности ткани подводилось лазерное туннелирование.

Методика оценки хоуминга мононуклеарной клеточной фракции.

Экспериментальной группе внутримышечно инъецировали 5-бромдеоксиуридин (BrdU) для мечения пролиферирующих клеток. В данном методе аналог тимидина BrdU встраивается во вновь синтезированную ДНК клеток на S-стадии клеточного цикла (стадии синтеза ДНК). Встроившийся BrdU окрашивается анти-BrdU антителами, меченными флюорохромами. Инкубация с BrdU позволяет анализировать активно пролиферирующие (в противоположность не-пролиферирующим) клеточные фракции.

Для иммуногистохимического анализа делали поперечные срезы мышечной ткани толщиной 10 мкм при -20°C в криостате фирмы Leica. Иммуногистохимическое окрашивание включало следующие этапы: фиксация срезов и блокирование в нормальной сыворотке для предотвращения неспецифического связывания антител, инкубация с первичными антителами к исследуемому белку, инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой.

Методика морфологической оценки зон непрямой реваскуляризации.

После выведения животных из эксперимента, для исследования плотности микроциркуляции в области воздействия лазерного излучения и инъекции костномозговых клеток, препарировались участки мышечной ткани области бедра и голени. Материал фиксировался в 10 % растворе нейтрального формалина (не менее 24 часов), далее следовала отмывка в проточной воде 4 часа, образцы проводились через криопротекторную смесь, состоящую из раствора сахарозы восходящей концентрации 5 %, 10 %, 15 %, 20 %. Готовились криостатные срезы толщиной 10 мкм, выполняемые перпендикулярно оси лазерного канала и хода инъекционной иглы, далее следовала иммуногистохимическая окраска

первичными *анти CD 31 антителами с вторичной флюоресцентной меткой*. Производился подсчет количества сосудов на выделяемой площади мышечной ткани в месте воздействия. Для морфологического анализа использовался программно-аппаратный комплекс для анализа изображений на базе микроскопа «Axioskop FL-40», камера «AxioCam MRc», программный пакет «AxioVision 3.1».

Исследование микроциркуляторного кровотока конечностей методом лазерной доплеровской флоуметрии проводили на наркотизированных животных. Первоначально исследование микроциркуляции проводилось через 4 недели после моделирования ишемии. Повторное определение микроциркуляторного кровотока проводилось на 25-е и 35-е сутки после непрямой реваскуляризации. Применяли лазерный анализатор капиллярного кровотока (ЛАКК-01, НПП «Лазма», Россия). Измерение кровотока проводили на голени правой и левой конечностей. Измерения проводили на длинах волн излучения 0,63 мкм, время записи ЛДФ-граммы составляло 3 минуты. 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 – δ , коэффициента вариации – K_v . В работе рассматривались три частотных диапазона, в которых осуществляется модуляция стенки сосуда (Kvernmo H.D. et al., 1999). Медленные колебания (зона LF-ритма) определялись активностью собственных компонентов микроциркуляторного русла. Быстрые колебания (зона HF-ритма) совпадали с дыхательными ритмами и зависели 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 исследованиях оценивалось соотношение $A_{\max HF}$ и $A_{\max CF}$ к $A_{\max LF}$, а также индекс эффективности микроциркуляции (ИЭМ) (Козлов В.И., 2000).

Статистические методы исследования проводилась средствами интегрированной статистической системы Origin 7.0. for Windows, аппаратное обеспечение Pentium 4, 2500 Мгц, используемое программное обеспечение: ОС Microsoft Windows XP, Microsoft Office XP Pro. Для статистической обработки

результатов исследования использовали альтернативный анализ, метод вариационной статистики: вычисление средней арифметической (M) и ее ошибки (m), метод оценки достоверности различий между группами по критерию Стьюдента (t) с определением показателя статистической достоверности ($p < 0,05$) и в программе Origin по критерию ANOVA (при $p < 0,05$ различия рассматривались как статистически достоверные).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первые сутки после операции животные были адинамичны. Визуально отмечался цианоз кожных покровов. Двигательная функция оперированной конечности восстанавливалась на 3-4 сутки. Кожная температура на 3 сутки в симметричных точках бедра была достоверно ниже ($p < 0,05$) контрольной конечности и составляла $23,61 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,76 \text{ }^\circ\text{C}$ и $32,78 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,31 \text{ }^\circ\text{C}$. В норме кожная температура у крыс составляет $32,8 - 33,4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Диверт В.Э., 2003). В трех случаях наблюдалась гангрена дистальных фаланг конечностей у 1 животного первой группы и 2-х животных второй группы.

Эффективность созданной ишемии оценивали спустя 28 суток. Морфометрическое исследование гистологических препаратов показало оживленную реакцию со стороны соединительнотканых элементов мышц, снижение удельной площади мышечной ткани с одновременным увеличением удельной площади эндомизия и перимизия, разрастание плотных коллагеновых волокон на фоне рыхлой соединительной ткани. Выявлены участки фрагментации миофибрилл. Наряду с неизменными мышечными волокнами обнаруживаются в разной степени атрофированные участки, отмечаются очаговые нарушения четкости поперечной исчерченности сегментарного характера.

Оценка хоуминга МНФ КМ методом включения BrDU в ядра. Выведение животных производилось через 6 часов, 12 и 24 часа, с последующей окраской и морфометрией. Процентное соотношение BrDU-позитивных клеток от их общего количества до введения составил 9,8 % *in vitro*. Что характеризует количество клеток, находящихся в S-фазе.

По данным гистологии, на всех образцах на протяжении всего эксперимента наблюдались крупные клеточные скопления в зонах инъекции. Отмечено, что уже на препаратах 6-ти часового забора отмечена локализация BrDU-позитивных

клеток в капиллярах мышечной ткани. При рассмотрении образцов препарата 24 часового забора выявлено наличие позитивных клеток на удалении от непосредственной зоны введения в интерстициальном пространстве мышечной ткани. При оценке результатов флуоресцентной микроскопии выявлено снижение процентного соотношения позитивных клеток с 9,4 % (материал 6-и часового забора) до 8,8 % и 7,1 % соответственно. По нашему мнению, снижение процентного соотношения объясняется миграцией имплантируемых клеток по лимфатической и кровеносной системам. Полученные результаты указывают на сохранение общей массы имплантируемых клеток в зоне ишемии.

При гистологическом исследовании препаратов на 5-е сутки после введения сепарированной мононуклеарной фракции определена сохранная жизнеспособность имплантируемых клеток. Отмечены скопления клеточных конгломератов в зоне инъекции, сгруппированные вдоль раневого канала, образованного вколлом иглы, состоящих из имплантируемых клеток. Наряду с этим на единичных препаратах отмечены зоны асептического воспаления, состоящие из элементов детрита, скопления нейтрофилов и наличия полинуклеарных клеток. Уже на 15-е сутки на препаратах в группе с использованием изолированной имплантации костномозговых клеток, так и в группе с комбинированной реваскуляризацией отмечено появление прекапилляров различного диаметра, определялись разрозненные скопления “сосудистых почек”. Отмечалось образование капиллярных трубочек. При анализе результатов морфометрии на 15-е сутки после проведения непрямо́й реваскуляриза́ции в исследуемых группах отмечается положительная динамика в увеличении плотности капиллярного русла. Показатели удельной плотности микроциркуляторного русла при использовании изолированной имплантации МНФ КМК и при использовании комбинированной методики достоверно не различаются при $537,03 \pm 39,31$ капилляров/ед.пл. и $536,51 \pm 29,32$ капилляров/ед.пл. соответственно.

Однако уже на 25-е сутки проведения вариантов непрямо́й реваскуляриза́ции морфометрический анализ показал значительное увеличение микроциркуляторного русла в этих исследуемых группах. Проведенный анализ морфометрических показаний удельной плотности капиллярной сети на 25-е

сутки показал достоверное ($p < 0,05$) значительное увеличение плотности капиллярной сети в мышечной ткани животных I и II групп по сравнению с контрольной группой. Плотность капиллярной сети составила соответственно $726,55 \pm 24,62$ капилляров/ед. пл. и $887,99 \pm 31,4$ капилляров/ед. пл., в то время как у животных контрольной группы этот показатель составил $495,47 \pm 18,09$ капилляров/ед. пл. При проведении обзорной микроскопии на поздних сроках (через 35 суток) после проведения лазерной ревазуляризации 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 толстостенных капилляров синусоидного типа различного диаметра, заполненных эритроцитами, также наряду с этим определялись разрозненные скопления “сосудистых почек”. Плотность капиллярной сети на 35-е сутки после непрямой ревазуляризации в группе с изолированным использованием клеток составило $758,33 \pm 40,84$ капилляров/ед. пл. и в группе лазерного туннелирования в сочетании с клеточной имплантацией $935,79 \pm 32,19$ капилляров/ед. пл., что достоверно выше ($p < 0,05$) в сравнении с контрольной группой животных $465,74 \pm 28,15$ капилляров/ед. пл. (рис.1).

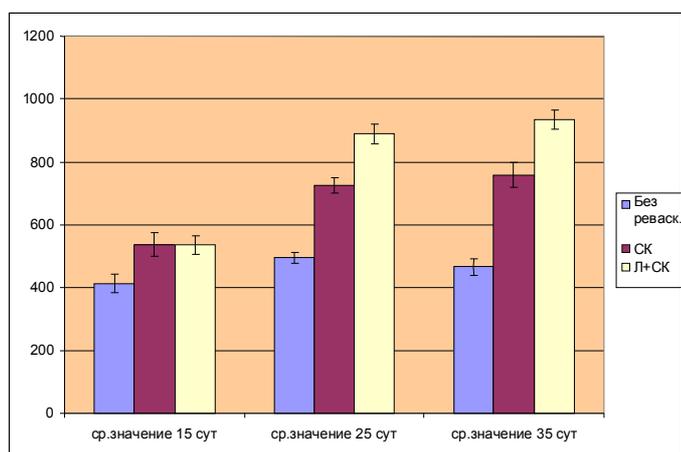


Рис. 1. Сравнение удельной плотности капилляров

Для сравнения суммарное количество капилляров поперечно-полосатой мускулатуры задней группы мышц бедра интактного животного составило $543,9 \pm 16,12$ капилляров/ед. пл. Сходные морфологические признаки были обнаружены после использования высокоинтенсивного лазерного излучения на миокард собак (Евдокимов С.В. 1996) и ишемизированные мышцы бедра

крыс. Где к 30-м суткам наряду с капиллярами регистрировалось появление артериол и венул малого калибра, с увеличением мелких сосудов в миокарде и бедренных мышцах в 1,8 и 1,6 раз соответственно (Голованева Е.С., Попов Г.К.,

2003). Следует отметить, что численное значение суммарного количества капилляров, в нашем исследовании, в группе с лазерным туннелированием и имплантацией стволовых клеток превысил аналогичный показатель группы с изолированным использованием стволовых клеток на 23 %. Приведенная динамика роста удельной плотности капилляров показывает, что, уже начиная с 15 суток, происходит резкое увеличение удельной плотности капиллярной сети, однако достоверных различий в изолированной имплантации МНФ и применения сочетанной методики не выявлено. Начиная с 25 и на 35-е сутки, отслеживается тенденция увеличения плотности капилляров в обеих исследуемых группах, однако при использовании методики с комбинированной реваскуляризацией отмечается достоверно значимое отличие по удельной плотности микроциркуляторного русла в сравнении с использованием изолированной имплантации костномозговых моноклеарных клеток.

Исследование микроциркуляции в голени правой конечности контрольной группы на 35-е сутки выявило приближение показателя микроциркуляции к значению у левой, не ишемизированной конечности. В голени правой конечности, по сравнению с левой, отмечается увеличение (на 56,1 %) показателя, характеризующего модуляцию кровотока в микроциркуляторном русле и индекса эффективности микроциркуляции (на 31,5 %). Это повышение обусловлено повышением вазомоторной активности микрососудов, о чем свидетельствует увеличение соотношения $A_{\max}LF/M$ – на 85,7 % и $A_{\max}LF$ – на 88,7 %, а также увеличение 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 (увеличивается $A_{\max}HF$ – на 84,9%). Все эти изменения в микроциркуляции происходят на фоне уменьшения вклада кардиального механизма регуляции капиллярного кровотока: уменьшено соотношение $A_{\max}CF/A_{\max}LF$ – на 42,3 %, $A_{\max}CF/\delta$ – на 39,4 %.

При исследовании гемоциркуляции в голени правой конечности через 35 суток в условиях изолированного введения моноклеарной фракции костномозговых клеток, как и в группе без коррекции, выявлено приближение показателя микроциркуляции к значению у левой, не ишемизированной конечности. При этом основной вклад в микроциркуляцию ишемизированной

конечности делает пассивный (кардиальный) механизм регуляции капиллярного кровотока: по сравнению с левой конечностью увеличивается $A_{\max}CF/A_{\max}LF$ – в 2,7 раза и $A_{\max}CF$ – на 88,2 %. По сравнению с группой без коррекции, в группе с коррекцией МНФ КМК выявлено снижение миогенной активности вазомоторов (уменьшается соотношение $A_{\max}LF/M$ – на 46,2 %), увеличение вклада кардиального механизма регуляции капиллярного кровотока: увеличивается $A_{\max}CF/A_{\max}LF$ – в 2,1 раза.

При исследовании гемоциркуляции в голени правой конечности на 35-е сутки эксперимента в условиях комбинированного использования моноклеарных клеток костномозгового происхождения и воздействия лазерным излучением показатель микроциркуляции не имеет достоверных отличий от значений у левой конечности. По сравнению с контрлатеральной конечностью выявлено уменьшение вклада кардиального и дыхательного механизмов регуляции капиллярного кровотока: уменьшены 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 %. При этом по сравнению с группой без коррекции, в группе с коррекцией МНФ КМК и лазерным излучением выявлено увеличение значения микроциркуляции, происходящее на фоне снижения миогенной активности вазомоторов (уменьшается соотношение $A_{\max}LF/M$ – на 46,2 %).

ВЫВОДЫ

1. Морфо-функциональный анализ ишемизированных конечностей, показал: запустевание сосудов микроциркуляторного русла, развитие периваскулярного и межмышечного склероза, уменьшение численной плотности CD31 позитивных сосудов, а так же уменьшение показателей кровотока: снижение индекса эффективности микроциркуляции и снижение показателей перфузии тканей.

2. Для клеточно-опосредованного ангиогенеза при имплантации моноклеарной фракции костного мозга было характерным формирование сосудов микроциркуляторного русла с гиперхромным эндотелием, присутствием умеренного количества моноклеарных клеток в местах имплантации, увеличение численной плотности CD31 позитивных сосудов, а так же умеренным увеличением показателей кровотока по результатам лазерной доплеровской

флоуметрии.

3. Комбинированный клеточно-опосредованный и лазерно-индуцированный ангиогенез морфологически проявляется формированием значительного количества хаотично ориентированных сосудов с гиперхромным эндотелием и элементами ангиоматоза, формированием сосудов синусоидного типа, присутствием значительного количества моноклеарных клеток, достоверным увеличением численной плотности CD31 позитивных сосудов, а также увеличением индекса эффективности микроциркуляции и показателей перфузии ткани.

4. Процентное соотношение имплантируемых BrdU-позитивных и негативных моноклеарных клеток костного мозга остается неизменным в зонах инъекции как при имплантации клеток иглой, так и при введении клеток в лазерные каналы в изучаемые сроки – 6, 12 и 24 часа.

5. Сопоставление результатов комбинированного лазерно-индуцированного и клеточно-опосредованного ангиогенеза против изолированной инъекции моноклеарных клеток костного мозга проявляется достоверно значимым увеличением сосудов CD 31+ микроциркуляторно русла, а также функциональных показателей лазерной доплеровской флоуметрии, выявлен эффект улучшения микроциркуляции, наиболее выраженный функционированием активного механизма модуляции тканевого кровотока.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Для улучшения перфузии конечностей следует применять комбинированный метод имплантации костномозговых моноклеарных клеток костного мозга в сформированные лазерные каналы, так как при этом способе наблюдается наибольшая степень неоваскуляризации.

2. Мы рекомендуем методику непрямой комбинированной реваскуляризации конечностей с использованием моноклеарной фракции костномозговых клеток и лазерного туннелирования для дальнейшего изучения эффективности методов непрямой реваскуляризации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ларионов П.М., Чернявский А.М., Асташов В.В., **Новрузов Р.Б.**, Казаков О.В., Субботин Д.В., Сергеевичев Д.С., Зайцев Г.С., Русакова Я.Л.,

Субботина О.А. Стимуляция неоваскулогенеза при ишемии нижних конечностей // **Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология и клиническая медицина.**– 2009. –Том 7. –Выпуск 3. – С. 72–77.

2. Ларионов П.М., Чернявский А.М., **Новрузов Р.Б.**, Лушникова Е.Л., Субботин Д.В., Сергеевичев Д.С., Кузнецова И.В., Караськов А.М., Непомнящих Л.М. Стимуляция ангиогенеза внутримышечной имплантацией клеток моноклеарной фракции аутологичного костного мозга при ишемии конечностей крысы // **Клеточные технологии в биологии и медицине.** – 2010. – № 4. – С. 211–216.

3. P. M. Larionov, A. M. Chernyavskii, **R.B. Novruzov**, E. L. Lushnikova, D. V. Subbotin, D. S. Sergeevichev, I. V. Kuznetsova, A.M. Karas'kov, L. M. Nepomnyashchikh. Stimulation of angiogenesis in rat ischemic limbby intramuscular implantation of mononuclear fraction cells from autologous bone marrow // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** –2011. –Vol. 150. –N.4. –P.530-534.

4. Ларионов П.М., Чернявский А.М., Асташов В.В., **Новрузов Р.Б.**, Казаков О.В., Субботин Д.В., Сергеевичев Д.С., Русакова Я.Л. Морфофункциональная оценка направленного ангиогенеза с использованием сепарированной моноклеарной фракции костного мозга при ишемии нижних конечностей // **Актуальные вопросы современной патологии : сборник научных трудов Всероссийской Юбилейной научно-практической конф. патологоанатомов с международным участием к 100летию проф. П.Г. Подзолкова.** Красноярск. – 2008. – С. 240–243.

5. **Новрузов Р.Б.**, Ларионов П.М., Казаков О.В., Асташов В.В. Исследование перфузии в условиях направленного ангиогенеза. // **Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику) : материалы IV Международной научной конференции.** Ярославль, 2008. – С. 37.

6. Ларионов П.М., **Новрузов Р.Б.**, Субботин Д.В., Сергеевичев Д.С., Казаков О.В., Асташов В.В. Стимуляция ангиогенеза при хронической ишемии нижних конечностей // **Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику) : материалы IV Международной научной конференции.** Ярославль, 2008. – С. 38.

7. Сергеевичев Д.С., Субботин Д.В., **Новрузов Р.Б.**, Субботина О.А., Ларионов П.М. Исследование различных фракций костного мозга для стимуляции неоангиогенеза // Новые технологии в сердечно-сосудистой хирургии и интервенционной кардиологии : Шестые научные чтения, посвященные памяти акад. РАМН ЕН. Мешалкина. Новосибирск, 2008. – С. 152.

8. Ларионов П.М., Чернявский А.М., **Новрузов Р.Б.**, Субботин Д.В., Сергеевичев Д.С., Субботина О.А., Казаков О.В. Изучение хоуминга клеток, имплантируемых в зону ишемии нижних конечностей // Новые технологии в сердечно-сосудистой хирургии и интервенционной кардиологии : Шестые научные чтения, посвященные памяти акад. РАМН ЕН. Мешалкина. Новосибирск. – 2008. – С. 153.

9. **Новрузов Р.Б.**, Сергеевичев Д.С., Чернявский А.М., Ларионов П.М., Субботин Д.В., Караськов А.М., Русакова Я.Л., Казаков О.В. Морфологическая оценка непрямой реваскулялизации нижних конечностей в эксперименте // Семнадцатый Всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов. Москва. – 2011. –Том 12. –№ 6. – С.261.