ОЦК. Очевидно, что перераспределение фракций воды в цельной крови возникает за счет развития гипергидратации форменных элементов крови, более выраженной у пациентов с ПИКС. Данное предположение документируется статистически значимым увеличением фракции связанной воды в эритроцитах – на 61,1% ($p < 0,05$). Такие изменения свидетельствуют о том, что увеличивается объем эритроцитов и нарушаются их реологические свойства, сопровождающиеся нарушением функциональной активности красных клеток крови. Следовательно, увеличение доли связанной воды в эритроцитах является неблагоприятным прогностическим признаком развития ПИКС, так как свидетельствует о повышении проницаемости клеточных мембран или нарушении функционирования ионных каналов. С другой стороны, такая реакция красных клеток крови свидетельствует об их значительной роли в регуляции водного баланса организма в условиях развития данного патологического процесса, и перестройка водного обмена имеет приспособительный характер. Что касается содержания связанной воды эритроцитов у пациентов с ОИМ, то нами не было зарегистрировано значимых отличий относительно группы сравнения. Очевидно, что данный приспособительный механизм регуляции водного баланса в острый период развития инфаркта миокарда оказывается невостребованным.

Таким образом, нами установлены разнонаправленные изменения водного гомеостаза у пациентов с ОИМ и ПИКС. В частности, в острый период коронарной катастрофы отмечается увеличение связанной воды в цельной крови и плазме, что является компенсаторно-приспособительным механизмом, обеспечивающим клеточную дегидратацию. У пациентов с ПИКС выявлено, напротив, выраженное увеличение свободной фракции воды, что может быть ведущей причиной развития гипергидратации форменных элементов крови и документирует патологический ход адаптивных процессов. Можно полагать, что у пациентов с ПИКС увеличиваются общий объем циркулирующей крови, пред- и постнагрузка на сердце. Такие изменения способствуют гипергидра-

тации эритроцитов, более выраженной у пациентов с ПИКС, и могут служить диагностическим критерием тяжести основного заболевания. В этой связи возникает необходимость с осторожностью назначать инфузионную терапию таким группам пациентам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аникин В. В. Периферическое кровообращение и прогноз у больных со стенокардией // Кардиология. – 1988. – № 8. – С. 102–103.
2. Калюта Т. Ю., Любезнов Р. Е., Орликова О. В. Сердечная недостаточность и анемия у больных острым инфарктом миокарда // Российский кардиологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 16–19.
3. Кулайчев А. П. Методы и средства анализа данных в среде Windows Stadia 6.0. – М., 1996. – С. 147–203.
4. Сакс В. А., Конорев Е. А., Григорьянц Р. А. Биохимия нормального и ишемизированного кардиомиоцита: современное состояние исследований // Кардиология. – 1992. – № 3. – С. 82–91.
5. Саханова Р. А. Методика определения свободной и связанной воды в крови и тканях // Лабораторное дело. – 1974. – № 11. – С. 677–680.
6. Сахарчук И. И., Сисецкий А. П., Артюх В. П. Функциональная активность эритроцитов у больных с сердечной недостаточностью и возможные пути ее коррекции // Терапевтический архив. – 1992. – № 9. – С. 88–90.
7. Цапаев В. Г., Полтавцева Н. Е. Взаимосвязь между тканевыми и внутрисосудистыми характеристиками микроциркуляции у больных с острыми нарушениями коронарного кровообращения // Кардиология. – 1989. – № 2. – С. 102–104.
8. Чазов Е. И. // Терапевтический архив. – 1991. – № 9. – С. 4–7.
9. Шепотиновский В. И., Микашинович З. И., Терентьев В. П. Инструментальные и лабораторные методы в кардиологии. – Ростов-на-Дону, 1992. – С. 128.
10. Khalife K., Danchin N., Neiman J. Facteurs pronostiques de infarctus du myocarde // Inform cardial. – 1985. – Vol. 9. – P. 201–208.
11. Rasanen J. Acute myocardial infarction complicated by respiratory failure // Chest. – 1984. – Vol. 85. – P. 21.

Поступила 17.03.2009

А. Ю. ОРЛОВА², М. В. ПОКРОВСКИЙ^{1,3},
Е. Б. АРТЮШКОВА³, Б. С. СУКОВАТЫХ², Д. В. ПАШКОВ³

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ ПЛАЗМОЙ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹Кафедра фармакологии,

²кафедра общей хирургии,

³НИИ ЭМ Курского государственного медицинского университета,

Россия, 305041, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3. E-mail: anzhelika_orlova@bk.ru

В результате проведенных исследований выявлено, что плазма, обогащенная тромбоцитами, оказывает влияние на повышение микроциркуляции за счет содержания в ней полипептидных факторов роста и позволяет активизировать коррекцию хронической ишемии конечности у животных опытной серии. Прослеживается явная позитивная тенденция к отличиям на сроках 10, 21 и 28 суток, что выражается в достоверном увеличении уровня микроциркуляции в опытной серии по сравнению с контролем и регистрируется при помощи лазерной доплеровской флоуметрии. Это свидетельствует о том, что предложенный метод достаточно эффективный и позволяет применять его для дальнейшего доклинического и клинического изучения.

Ключевые слова: плазма, обогащенная тромбоцитами, хроническая ишемия конечности, микроциркуляция.

THE WAY OF THE TREATMENT OF THE CHRONIC ISCHEMIA LIMBS BY PLASMA, ENRICHED TROMBOCITIES, IN EXPERIMENT

¹The department of pharmacology,

²the department of general surgery, ³scientific research institute of ecological medicine, Kursk State Medical University, Russia, 305041, Kursk. E-mail: anzhelika_orlova@bk.ru

As a result called on studies is revealed that plasma, enriched of the trombocytes, influences on increasing of the microcirculation to account of the contents in her polypeptid factors growing and allows to actuate correction chronic ischemia limbs beside animal of the experienced series. The evident positive trend is tracked to difference for period 10, 21 and 28 day that is expressed in reliable increase level of the microcirculation in experienced series in contrast with checking and is registered with the help of lazer doppler floumetria. This is indicative of that that offered method it is enough efficient and allows to use it for wide clinical studying.

Key words: plasma, enriched of the trombocytes, the chronic ischemia of the limb, microcirculation.

Введение

Во всем мире хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) до настоящего времени являются актуальной проблемой и возникают в среднем у 2–3% населения, причем с возрастом частота их увеличивается, достигая на седьмом десятилетии жизни 5–7% [7]. Заболевание неуклонно прогрессирует, ухудшая результаты консервативного и хирургического лечения, приводя к ранней инвалидизации. Частота выполнения ампутаций при ХОЗАНК, обусловленных ишемией, колеблется в пределах 16–46 на 100 000 населения в год [3]. Лечение ХОЗАНК на сегодняшний день является одной из наиболее сложных проблем ангиологии [6, 10]. По данным отечественных и зарубежных авторов, 40% больных, страдающих заболеванием сосудов, имеет периферическую форму поражения магистральных артерий [3, 7]. В современное время у больных ХОЗАНК предпочтение отдается прямым методам реваскуляризации. К ним относятся различные виды шунтирования или протезирования периферических артерий. В то же время одновременно с совершенствованием методов реконструктивных операций на артериях серьезное внимание стало уделяться разработке способов улучшения микроциркуляции в ишемизированных тканях посредством стимуляции неоваскулогенеза. Клеточная трансплантация для этих целей используется в клинической практике только в последние годы [5, 13].

Целью работы является экспериментальное обоснование эффективности использования плазмы, обогащенной тромбоцитами, которая содержит полипептидные факторы роста, стимулирующие неоваскулогенез, для лечения хронической ишемии конечности.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

моделирование хронической ишемии конечности у крыс;

оценка уровня микроциркуляции у животных с экспериментальной ишемией конечности на фоне лечения плазмой на разных сроках исследования.

Методика исследования

Опыты проводились на белых крысах-самках линии Wistar массой 250–300 г.

Хроническую ишемию конечности моделировали под наркозом (хлоралгидрат 50 мг/кг) путем перевязки бедренной артерии у места ее начала (под паховой связкой) с удалением участка магистрального сосуда, включа-

ющего бедренную, подколенную артерии и начальные отделы артерий голени [15, 16]. У животных оценивали уровень микроциркуляции в мышцах голени правой задней конечности при помощи лазер-доплеровского флоуметра Biopac-systems MP-100 и датчика TSD-144 (США), а также динамику данных показателей на разных сроках после выполнения операции моделирования хронической ишемии конечности. Для этого иссекали участок кожи в передне-боковой области голени правой задней конечности. Запись уровня микроциркуляции осуществляли в пяти точках (середина длины мышцы, точки на 3–5 мм выше и ниже, латеральнее и медиальнее первой). Регистрацию уровня микроциркуляции проводили в группах с моделированием ишемии конечности и в группах на фоне лечения ишемии конечности плазмой, обогащенной тромбоцитами. Последнюю готовили непосредственно перед введением по следующей методике: у одной крысы брали кровь из правого желудочка в объеме 5–7 мл в пробирку с гепарином, центрифугировали ее при скорости 2,5 тысячи оборотов в минуту в течение 15 минут. Затем полученную плазму, обогащенную тромбоцитами, набирали в стерильный одноразовый шприц и однократно вводили в объеме по 0,15 мл в мышцы бедра и голени правой задней конечности крысы.

При статистической обработке данных рассчитывали среднее значение, величину стандартного отклонения. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Статистические расчеты проводились с использованием программы Microsoft Excel 2003.

Результаты исследования

Животные были разделены на две серии: контрольную и опытную. В контрольную серию включено 10 интактных крыс, остальным 30 моделировали ишемию конечности. В опытную серию вошло 30 животных, которым проводилась плазмотерапия.

У животных контрольной серии первой группы – интактных крыс оценен уровень микроциркуляции в мышцах голени правой задней конечности методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Полученное среднее значение уровня микроциркуляции в этой группе животных было принято за норму и составило $535,22 \pm 17,53$ перфузионных единиц (п. е.).

Животные контрольной серии лечения не получали. У крыс опытной серии лечение плазмой начато на седьмые сутки после операции. По данным F. Judah (1998), морфологические механизмы компенсации ишемии

Влияние плазмы на показатели микроциркуляции у крыс на фоне ишемии конечности ($M \pm m$ в абсолютных значениях перфузионных единиц, $n=10$)

Группа	10-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
Хроническая ишемия конечности	209,20±6,45	312,08±14,03	369,56±14,64
Хроническая ишемия конечности + плазма	480,34±25,39*	594,42±21,73*	885,08±42,17*

Примечание: * – при $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

конечности – неоангиогенез – включаются в среднем на 7-е сутки после операции моделирования. За этот срок мобилизуются все предсуществующие компенсаторные резервы организма животного; дальнейшие изменения в состоянии кровообращения в конечности могут происходить только благодаря вмешательству извне [10].

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

Несмотря на достаточную агрессивность модели экспериментальной патологии и развитие 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 хронической ишемии конечности, что характеризовалось наличием таких патогномических симптомов, как перемежающаяся хромота, 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 патогномические признаки хронической ишемии конечности, которые наблюдаются у пациентов с ХОЗАНК.

Таким образом, при клиническом обследовании у большинства животных зарегистрированы наличие болевого синдрома, гиперемия кожи голени и стопы, симптом «перемежающей хромоты», ограниченное участие конечности в передвижении.

Результаты оценки уровня микроциркуляции у крыс контрольной и опытной серий с моделированием ишемии правой задней конечности представлены в таблице.

Прослеживается явная позитивная тенденция к отличиям на всех сроках по сравнению с контролем. Как видно из таблицы, на фоне плазмотерапии отличия между опытными и контрольными группами появляются уже на 10-е сутки, а на 21-е и 28-е сутки становятся выше, чем даже у интактной группы крыс, что свидетельствует о скорейшем раскрытии ранее не функционирующих коллатералей под влиянием полипептидных факторов роста, содержащихся в плазме, и усилении

притока крови по ним из проксимальных отделов конечности в дистальные.

Таким образом, результаты экспериментального исследования свидетельствуют о том, что предложенный метод достаточно эффективный и позволяет активизировать коррекцию хронической ишемии конечности, что регистрируется при помощи лазерной доплеровской флоуметрии.

Эффект плазмы, учитывая теоретические предположения и данные других научных исследований, можно связать с наличием в ней полипептидных факторов роста, содержащихся в тромбоцитах, которые оказывают непосредственное влияние на неоваскулогенез путем стимуляции развития эндотелия сосудов, что в конечном итоге приводит к купированию экспериментальной хронической ишемии конечности.

Обсуждение

Ангиогенез имеет большое значение для поддержания функциональной и структурной целостности организма на протяжении всей жизни. Такой ангиогенез называют физиологическим (при заживлении ран, воспалении, возникновении ишемии). Выделяют также патологический ангиогенез, который сопровождает многие патологические состояния (ревматоидный артрит, ретинопатии, псориаз, онкологические заболевания) [8].

Новые сосуды сначала возникают как капилляры, которые ответвляются от уже имеющихся мелких сосудов. Процесс ангиогенеза представляет собой реакцию на специфические сигналы. Эндотелиальные клетки, которые в будущем сформируют новый капилляр, отрастают от стенки существующего капилляра или небольшой вены, выпуская сначала тонкие длинные псевдоподии, затем образуется массивный отросток, который позже становится полым и превращается в трубку. Этот отросток продолжает удлиняться до тех пор, пока не встретит другой капилляр, с которым он соединяется, создавая путь для циркуляции крови [11]. Как показали опыты на тканевых культурах, в среде, содержащей факторы роста, эндотелиальные клетки спонтанно образуют капиллярные трубочки даже в условиях изоляции от клеток каких-либо других типов. Первый признак образования такой трубочки в культуре – появление в клетке удлиненной вакуоли, которая вначале полностью окружена цитоплазмой. Такие же вакуоли возникают в соседних клетках и выстраиваются концом к концу так, что сливаются в один капиллярный канал. Капилляры, образующиеся в чистой культуре эндотелиальных клеток, не содержат крови, и по ним не протекает никакая жидкость. Очевидно, ток и давление крови не нужны для формирования капиллярной сети [12].

Одним из пусковых механизмов ангиогенеза является ишемия тканей [2]. Процесс образования новых кровеносных сосудов регулируется многочисленными факторами. Диапазон их простирается от простых ионов (меди, магния, калия и др.) до сложных ангиогенных пептидов, которые содержатся в плазме, а именно в альфа-гранулах тромбоцитов. 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 – α -фактор некроза опухоли, TGF – трансформирующий фактор роста, VPF – сосудистый фактор проницаемости, EDGF – эпидермальный фактор роста [14]. При ишемическом поражении тканей необходимы стимуляция образования новых кровеносных микрососудов и формирование коллатералей для восстановления нормального кровоснабжения зоны ишемии [1].

Доказано, что истощение потенциала сосудистого роста происходит в процессе старения организма, тем самым играя существенную роль в патогенезе такого заболевания, как облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей. Введение ангиогенных ростовых факторов в зону ишемии приводит к развитию коллатерального кровообращения и улучшению микроциркуляции в пораженном органе [4].

В настоящее время в нашей стране и за рубежом проводится целый ряд исследований по изучению возможности использования культур эндотелиальных клеток и ростовых факторов для стимуляции образования и роста кровеносных сосудов в условиях ишемии тканей. Накопленный клинико-экспериментальный опыт демонстрирует первые успешные шаги на пути к созданию принципиально новых подходов в комплексном лечении заболеваний, связанных с нарушением кровоснабжения.

Современная ангиохирургия предлагает обширный выбор методов лечения заболеваний, патогенез которых связан с развитием ишемии тканей. Однако, несмотря на специфические преимущества и теоретически неограниченные возможности каждого из этих методов, диапазон их практического применения имеет достаточно жесткие рамки и не в состоянии охватить всего разнообразия атеросклеротических поражений сосудистого русла. Это является мощным стимулом к совершенствованию существующих и поиску принципиально новых подходов в лечении заболеваний, связанных с нарушением кровообращения.

Несмотря на широкое распространение различных видов реконструктивных операций и прогресс в разработке и создании многочисленных моделей имплантатов, не всегда удается избежать осложнений после хирургического вмешательства у больных ХОЗАНК. Особое место занимают тромботические осложнения. Частота раннего и позднего тромбоза остается на высоком уровне (17,4% в раннем и 15,2% в позднем периоде при операциях на бедренно-подколенном сегменте) [9].

Одной из причин развития раннего тромбоза является несостоятельность периферического сосудистого русла при резко увеличивающемся притоке крови после ангиореconstructивной операции. Реконструкция сосудистого русла позволяет восстановить магистральный кровоток, в то время как стимуляция ангиогенеза позволяет воздействовать на уровне микроциркуляторного русла, увеличивая плотность и общую площадь капиллярной сети,

тем самым способствуя росту компенсаторных возможностей периферического сосудистого русла [3].

Таким образом, данные, полученные в ходе экспериментального исследования на крысах, позволяют надеяться на то, что способ стимуляции ангиогенеза плазмой, обогащенной тромбоцитами, в перспективе займет прочное место в комплексном лечении ангиохирургических больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бокерия Л. А., Еремеева М. В. Современное состояние и перспективы использования ангиогенеза в лечении ишемической болезни сердца // Грудная и сердечно-сосуд. хирургия. – 2000. – Т. 1. № 2. – С. 57–61.
2. Бузиашвили Ю. И. Ангиогенез как антиишемический механизм // Кардиология. – 2000. – Т. 40. № 12. – С. 82–86.
3. Вишневецкий А. А., Краковский Н. Н., Золотаревский В. Я. Облитерирующие заболевания артерий конечностей. М.: Медицина, 1998. – 208 с.
4. Давыденко В. В., Мачс В. М. Стимулированный ангиогенез – новое направление в лечении при ишемических состояниях // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. – 2000. – Т. 159. № 4. – С. 117–120.
5. Драгунов А. Г., Александров Ю. В., Поляков С. В., Григорьев В. М., Порфирьева М. В., Масленникова Е. А. Применение внутритканевого введения препарата крови, обогащенной тромбоцитами, при лечении ишемии нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т. 14. № 3. – С. 64.
6. Ратнер Г. Л., Слуцкер Г. Е., Вачев А. Н. Хроническая ишемия нижних конечностей при атеросклерозе. Обоснование лечебной тактики // Ангиология и сосудистая хирургия. – 1998. – Т. 5. № 1. – С. 13–21.
7. Савельев В. С., Кошкин В. М., Барманова Е. Ю. Облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей: Пособие для врачей и больных. – М., 1998. – 74 с.
8. Шевченко Ю. Л., Матвеев С. А., Соловьев И. А. Роль ангиогенеза в норме и патологии // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. – 2001. – Т. 5, № 1. – С. 92–97.
9. Шевченко Ю. Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. – СПб: Наука, 2006. – 287 с.
10. Folkman J. Therapeutic Angiogenesis in Ischemic Limbs // Circulation. – 1998. – Vol. 97. – P. 1108–1110.
11. Hansen-Smith F. M., Hudlicka O., Egginton S. In vivo angiogenesis in adult rat skeletal muscle: early changes in capillary network architecture and ultrastructure // Cell Tissue Res. 1996. – Vol. 286. – № 1. – P. 123–136.
12. Nicosia R. F., Belsler P., Bonanno E. et al. Regulation of angiogenesis in vitro by collagen metabolism // In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. – 1991. – Vol. 27. – P. 961–966.
13. Roncon-Albuquerque B. R., Serrao B. P., Vale-Pereira B. R., Costa-Lima B. J., Roncon-Albuquerque B. R. Plasma catecholamines in Buerger disease: effects of cigarette smoking and surgical sympathectomy // Eur J Vasc Endovasc Surg. – 2002. – № 24. – P. 338–343.
14. Sandberg T. et al. Paracrine stimulation of capillary cell migration tissue involves epidermal growth factor and is mediated via urokinase plasminogen activator receptor // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 86. – № 4. – P. 1724–1730.
15. Sugano C. Intramuscular gene transfer of soluble tumor necrosis factor- α activates vascular endothelial growth factor receptor and accelerates angiogenesis in a rat model hindlimb ischemia // Circulation. – 2004. – Vol. 109. – P. 797–802.
16. Takeshita A. Endothelium dependent relaxation of collateral microvessels after intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rat model of hindlimb ischemia // Circulation. – 1998. – Vol. 98. – P. 1261–1263.