

КАРДИОАНГИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.137-005.4:616.151

Динамика показателей гемореологии у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей в результате стимуляции ангиогенеза

Л.А. Бокерия, М.В. Еремеева, Н.Н. Самсонова, В.С. Аракелян, О.А. Демидова

ФГБУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» (директор – академик РАН и РАМН Л.А. Бокерия) РАМН; Рублевское шоссе, 135, Москва, 121552, Российская Федерация

Бокерия Лео Антонович;

Еремеева Марина Викторовна;

Самсонова Наталья Николаевна;

Аракелян Валерий Сергеевич;

Демидова Ольга Александровна, e-mail: demidova197@rambler.ru

Цель. Анализ показателей гемореологии у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей после введения стимуляторов ангиогенеза.

Материал и методы. Исследование проводится открыто, в одном Центре, без рандомизации. Всего в исследовании участвует 66 больных в возрасте от 30 до 77 лет ($58,2 \pm 12,1$ года): 61 – с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей, 5 – с облитерирующим тромбангиитом. Всем пациентам однократно вводили стимулятор ангиогенеза. Пациентам 1-й группы (17 человек) – аутологичные клетки-предшественники эндотелиобластов CD 133⁺, пациентам 2-й группы (49 человек) – генный препарат сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF 165. В течение всего периода наблюдения больные получали базовую антиагрегантную терапию. Препараты и их дозировка были подобраны исходно и не менялись с момента включения в исследование.

Результаты. У всех больных, обследованных через 1, 3 и 6 мес было получено улучшение клиническое и по данным инструментальных методов исследования. Улучшение гемореологических показателей отмечено уже через 1 мес, показателей микроциркуляции – через 3 мес после введения стимулятора ангиогенеза.

Заключение. Изменения реологических показателей являются предвестниками микроциркуляторных изменений.

Ключевые слова: хроническая ишемия нижних конечностей; стимулятор ангиогенеза; гемореология; микроциркуляция.

Dynamics of hemorheology indicators in patients with chronic limb ischemia as a result of angiogenesis stimulation

L.A. Bockeria, M.V. Ereemeeva, N.N. Samsonova, V.S. Arakelyan, O.A. Demidova

A.N. Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery of Russian Academy of Medical Sciences; Roublevskoe shosse, 135, Moscow, 121552, Russian Federation

Bockeria Leo Antonovich;

Ereemeeva Marina Viktorovna;

Samsonova Natal'ya Nikolaevna;

Arakelyan Valeriy Sergeevich;

Demidova Ol'ga Aleksandrovna, e-mail: demidova197@rambler.ru

Objective. To analyse the hemorheology indicators in patients with chronic limb ischemia after administration of angiogenesis stimulants.

Material and methods. The research was open, non-randomized, in one center. 66 patients were included in the study, patients aged 30 to 77 years (mean age 58.2 ± 12.1 years). 61 patients were presented with atherosclerotic

lesion of arteries of lower extremities, 5 patients with thromboangiitis obliterans. Angiogenesis stimulant bolus was administered for all patients. Autologous cells i.e. precursors of endothelioblasts CD 133⁺ were injected to patients of the 1st group (17 patients), genetic medicament of the vascular endothelial growth factor VEGF165 was injected in the 2nd group (49 patients). During the whole follow-up period the patients received basic antiplatelet therapy. Medicaments and their dosage were selected initially and remained unchanged since the trial commencement.

Results. All patients examined 1, 3 and 6 months after have reported the clinical improvement as well as according to the instrumental diagnostic methods. The improvement of hemorheologic indicators was recorded already 1 month later, microcirculation indicators 3 months after angiogenesis stimulant injection.

Conclusion. Changes of hemorheology indicators have represented the microcirculation changes.

Key words: chronic lower limb ischemia; angiogenesis stimulant; hemorheology; microcirculation.

Введение

Лечение хронической ишемии нижних конечностей остается одной из центральных проблем в ангиохирургии вследствие широкой распространенности данной патологии, неуклонно прогрессирующего течения, высокого процента инвалидизации и значительного удельного веса в структуре летальности [1]. Ежегодно в развитых странах мира выполняется 1,2–22 ампутации на 100 тыс. населения по поводу сосудистой патологии, летальность после ампутации бедра составляет 11,2–47,8 % [2]. Затраты здравоохранения на лечение данной категории пациентов огромны, но экономический ущерб от утраты конечности и получения инвалидности еще выше [3]. Неудовлетворительные результаты лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей диктуют необходимость совершенствования методов лечения этой патологии. Улучшение гемодинамики в пораженной конечности хирургическим путем возможно лишь в 70 % случаев, поэтому радикальный хирургический подход перестал быть категорически доминирующим, хотя остается приоритетным [1, 3].

В последнее время всеобщий интерес вызывают процедуры, направленные на стимуляцию роста коллатеральных сосудов, – терапевтический ангиогенез [4]. У пациентов с окклюзионно-стенотическим поражением артерий нижних конечностей под воздействием ишемических стимулов развивается коллатеральная сеть. Однако не всегда коллатеральный кровоток способен скомпенсировать сосудистую недостаточность, что обусловлено наличи-

ем эндогенных ингибиторов ангиогенеза, недостаточной продукцией проангиогенных факторов, повреждением эндотелиальных клеток основным заболеванием, гипергликемией у пациентов с сахарным диабетом, гиперхолестеринемией [5].

В последние 20 лет активно изучают факторы, влияющие на ангиогенез, с целью использования их в качестве терапевтических агентов при лечении ишемии нижних конечностей и миокарда. Многочисленные доклинические исследования по применению гена фактора роста эндотелиоцитов [6–9] и аутологичных клеток костного мозга (исследования показали, что клетки секретируют проангиогенные факторы) [10–12] продемонстрировали их проангиогенную эффективность и безопасность. Успешные доклинические исследования позволили начать применение стимуляторов ангиогенеза у пациентов с неоперабельной декомпенсированной ишемией нижних конечностей [13–15]. Первые исследования показали хорошие результаты: у большей части пациентов регрессировала боль покоя, произошло заживление трофических язв, увеличились индекс лодыжечного давления, транскутанное напряжение кислорода на стопе, длительность безболезненной ходьбы, количество коллатеральных сосудов по данным ангиографии. Однако ни в одной из публикаций не обсуждаются результаты обследования реологических свойств крови. Целью нашей работы является анализ результатов инструментальных методов обследования, реологических свойств крови и их сопоставление.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 66 пациентов, проходивших лечение в отделении хирургии артериальной патологии НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. При включении в исследование средний возраст пациентов составил $58,2 \pm 12,1$ года (30–77 лет). Этиологией хронической ишемии в 92 % являлся атеросклероз, в 8 % – облитерирующий тромбангиит. У 16 % больных течение основного заболевания усугублялось сахарным диабетом. Давность анамнеза заболевания в 60 % случаев превышает 3 года. У 16 % пациентов установлена 2Б степень хронической ишемии, у 84 % – критическая ишемия. Более чем за 3 мес (в среднем за 17,8 мес) до включения в исследование 92 % пациентов выполнялось хирургическое лечение, направленное на устранение проксимального блока. При полной эффективности операции клинически значимое улучшение отмечено только у 76 % пациентов, в лучшем случае до 2Б степени, в 24 % случаев динамики не наблюдалось, что обусловлено протяженным поражением дистального артериального русла (предоперационный показатель сопротивления дистального русла по Рутерфорду составил в среднем 8,1 балла), анатомо-функциональной недостаточностью коллатерального бассейна глубокой бедренной артерии. Дистальную реконструкцию выполнить не представлялось возможным, поэтому данных пациентов включили в исследование: им вводили стимулятор ангиогенеза с целью стимуляции роста коллатеральных сосудов.

В нашей работе использованы аутологичные клетки-предшественники эндотелиобластов CD 133⁺ (1-я группа пациентов, $n=17$) и генный препарат сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF 165 (2-я группа пациентов, $n=49$). Клетки-предшественники эндотелиобластов получали методом магнитной сепарации из пунктата собственного костного мозга. Среднее количество вводимых клеток составило 750 тыс. (от 300 тыс. до 1 млн 200 тыс.).

Клетки выделяли из стандартного объема костного мозга (40 мл), получаемого во время пункции подвздошной кости пациента за 1–2 дня до введения. Культивирования с целью наращивания клеточной массы не производилось.

В НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН совместно с институтом биологии гена РАН был разработан и получен генный препарат ангиостимулин на основе плазмидной конструкции, содержащей ген VEGF 165 человека. Препарат прошел токсикологическое доклиническое исследование и был рекомендован для клинического использования. Первое введение пациенту с хронической ишемией нижних конечностей произведено в октябре 2003 г. Введение стимулятора ангиогенеза производилось однократно внутриаартериально или внутримышечно путем обкалывания икроножной мышцы.

В течение 3 мес до включения в исследование и в течение всего периода наблюдения пациентам не проводили инфузионную терапию, подобранная базовая антиагрегантная терапия оставалась неизменной в течение всего периода наблюдения. Контрольное обследование пациенты проходили через 1, 3 и 6 мес после введения стимулятора ангиогенеза.

Методы оценки эффективности терапии:

1) транскутанное мониторирующее напряжение кислорода в 1-м межпальцевом промежутке на тыльной стороне стопы;

2) ультразвуковая доплерография артерий нижних конечностей с определением индекса лодыжечного давления (ИЛД) в покое;

3) тредмил-тест – длительность безболевой ходьбы и максимальная длительность ходьбы по ровной дорожке (угол 0°) со скоростью движения дорожки 1 км/ч (у пациентов с перемежающейся хромотой);

4) лазерная доплеровская флоуметрия в 1-м межпальцевом промежутке на тыльной стороне стопы;

5) ангиографическое исследование артерий нижней конечности в стандартном

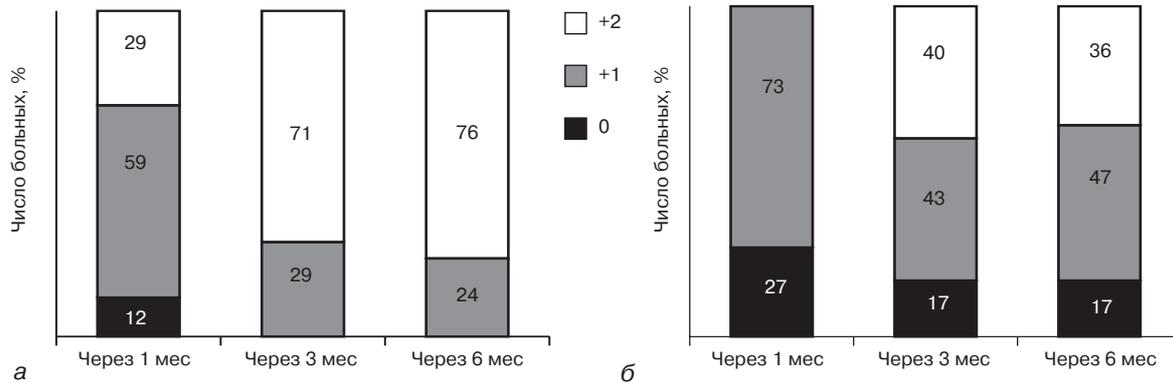


Рис. 1. Динамика клинического состояния конечности в результате проведения терапии: а – клеточной (1-я группа); б – генной (2-я группа)

режиме исходно и через 3 мес после введения стимулятора;

б) опросник качества жизни SF 36 (1-я версия);

7) свертывающие свойства крови (коагулограмма, агрегация тромбоцитов).

Изменения в клиническом статусе оценивали по шкале Рутерфорда: 0 – без изменений (нет изменения в степени ишемии и нет увеличения ИЛД), +1 – минимальное улучшение (увеличение ИЛД более чем на 0,1, но нет клинического улучшения, или, наоборот, клиническое улучшение без прироста ИЛД более чем на 0,1), +2 – умеренное улучшение (улучшение как минимум на 1 степень ишемии, ИЛД не нормализовался, но вырос более чем на 0,1), +3 – значительное улучшение, –1 – незначительное ухудшение, –2 – умеренное ухудшение, –3 – значительное ухудшение.

Статистический анализ проводили по программе Statistica 6.0. Данные представлены медианой, 25 и 75 % перцентильными отклонениями. Сравнение между зависимыми и независимыми группами выполняли с помощью непараметрического анализа по Уилкоксоу и Манну–Уитни соответственно.

Результаты и обсуждение

При обследовании пациентов через 1, 3 и 6 мес отмечено клинически значимое улучшение со стороны лечимой нижней

конечности, более выраженное в 1-й группе (рис. 1). Динамика в лучшем случае ограничивалась умеренным улучшением (+2 по классификации Рутерфорда), однако и ухудшения по причинам, связанным с исследованием, не выявлено. Положительная динамика наблюдалась уже через 1–1,5 мес после введения стимулятора (в большей степени в 1-й группе). Максимальный эффект наступил к 3-му месяцу в обеих группах. К 6-му месяцу эффект сохранялся у всех пациентов 1-й группы и у 82 % – 2-й группы.

Динамика показателей инструментальных исследований подтвердила клиническую эффективность лечения. Интегральным неинвазивным методом, отражающим клиническое улучшение с наибольшей достоверностью, является транскутанное мониторирование напряжения кислорода. Средний прирост напряжения кислорода к 6-му месяцу при клеточной терапии составил 16,0 мм рт. ст., при генной – 13,0 мм рт. ст. ($p < 0,05$). Результаты ультразвуковой доплерографии также демонстрируют положительную динамику: средний прирост ИЛД к 6-му месяцу в 1-й группе составил 0,18, во 2-й – 0,11 ($p < 0,05$). Длительность ходьбы по данным тредмил-теста достоверно увеличивалась в течение 6 мес, в меньшей степени за 1-й месяц, в большей – за последующие месяцы. По данным опросников SF-36, заполняемых пациентами на каждом этапе

наблюдения, к 6-му месяцу повышается физическая активность на 22 %, социальная активность – на 14 %, а также улучшаются другие показатели. Два пациента вышли на работу после длительной инвалидности, 8 – продолжили работать, несмотря на пенсионный возраст.

Наиболее чувствительным методом оценки состояния микроциркуляции является лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ). При анализе средних значений показателей ЛДФ в динамике определяются следующие закономерности: через 1 мес в обеих группах отмечается увеличение активности эндотелия (АЭ),

к 3-му месяцу – повышается средний показатель перфузии (М), индекс эффективности микроциркуляции (ИЭМ) (рис. 2). Активизация эндотелия сопровождается улучшением реологических показателей через 1 мес после введения стимулятора в обеих группах: увеличивается международное нормализованное отношение (МНО), снижается агрегация тромбоцитов, повышается протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ) (рис. 3, 4). В 1-й группе к 6-му месяцу отмечается вторая волна улучшения реологических показате-

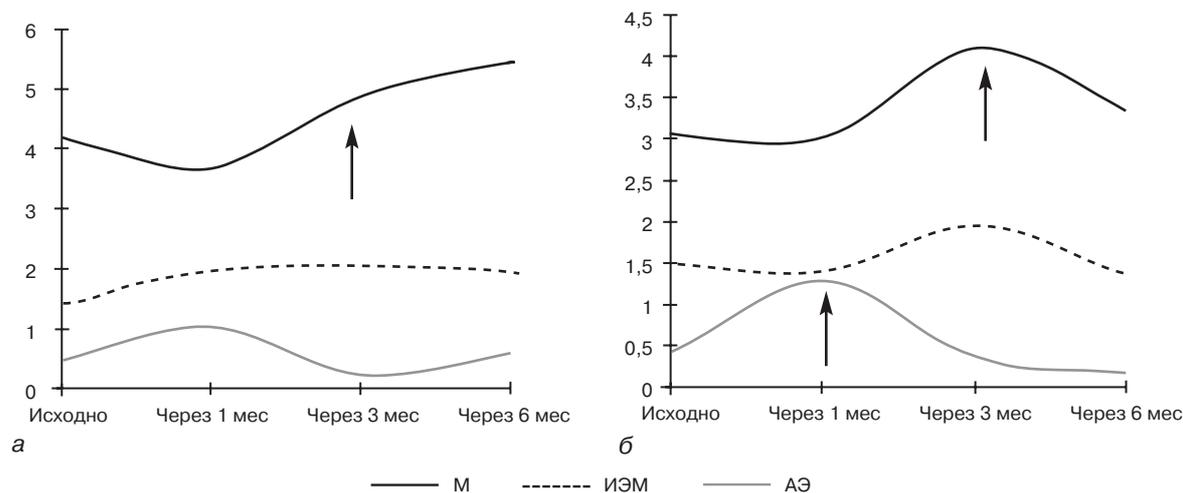


Рис. 2. Динамика показателей микроциркуляции в результате проведения терапии: а – клеточной (1-я группа); б – генной (2-я группа)

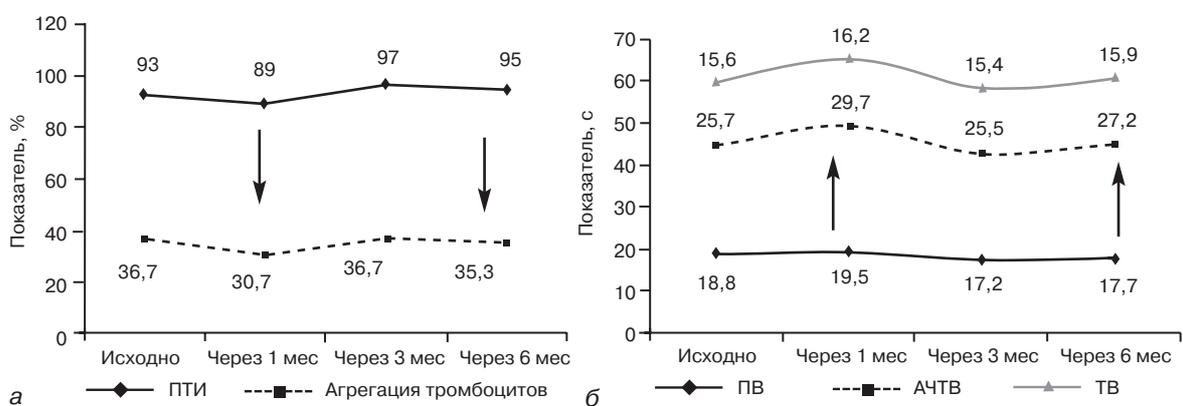


Рис. 3. Показатели гемореологии у пациентов 1-й группы: а – протромбиновый индекс (ПТИ), агрегация тромбоцитов; б – ТВ, АЧТВ, ПВ

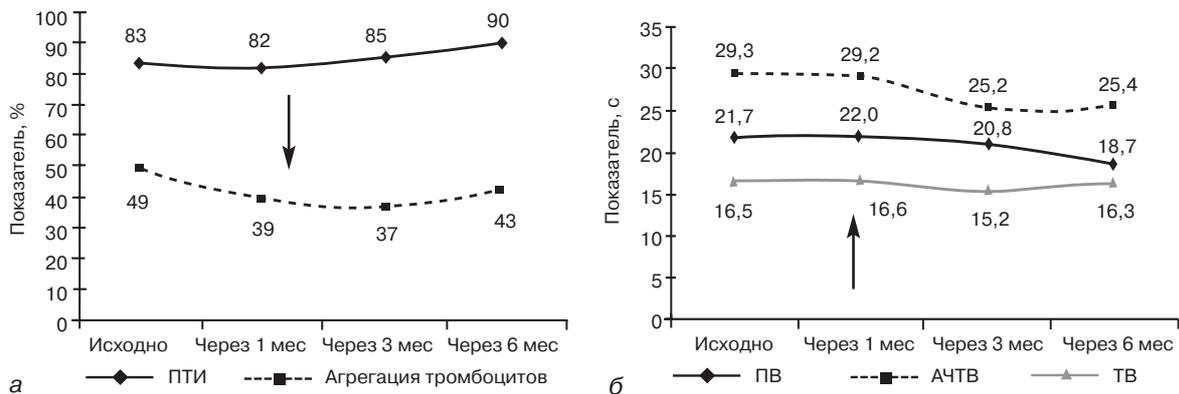


Рис. 4. Показатели гемореологии у пациентов 2-й группы:
 а – протромбиновый индекс (ПТИ), агрегация тромбоцитов; б – ПВ, АЧТВ, ТВ

телей. При сопоставлении данных ЛДФ и показателей гемореологии в динамике установлена прямая связь последних с АЭ, в то время как увеличение М и ИЭМ происходит отсроченно. Улучшение показателей гемореологии и микроциркуляции позволяет предположить появление вновь возникшего эндотелия, вырабатывающего целый комплекс естественных антикоагулянтов и веществ, обеспечивающих его атромбогенность [1], что в итоге приводит к улучшению реологических показателей крови.

Данные неинвазивных методов обследования получили подтверждение при анализе ангиографической картины исходно и через 3 мес: увеличивается коллатеральная сеть в зоне окклюзии магистральных артерий (рис. 5, 6).

Выводы

При использовании стимуляторов ангиогенеза через 1 мес происходит улучшение показателей гемореологии, несмотря на отсутствие инфузионной терапии и коррекцию антиагрегантной терапии в теч-

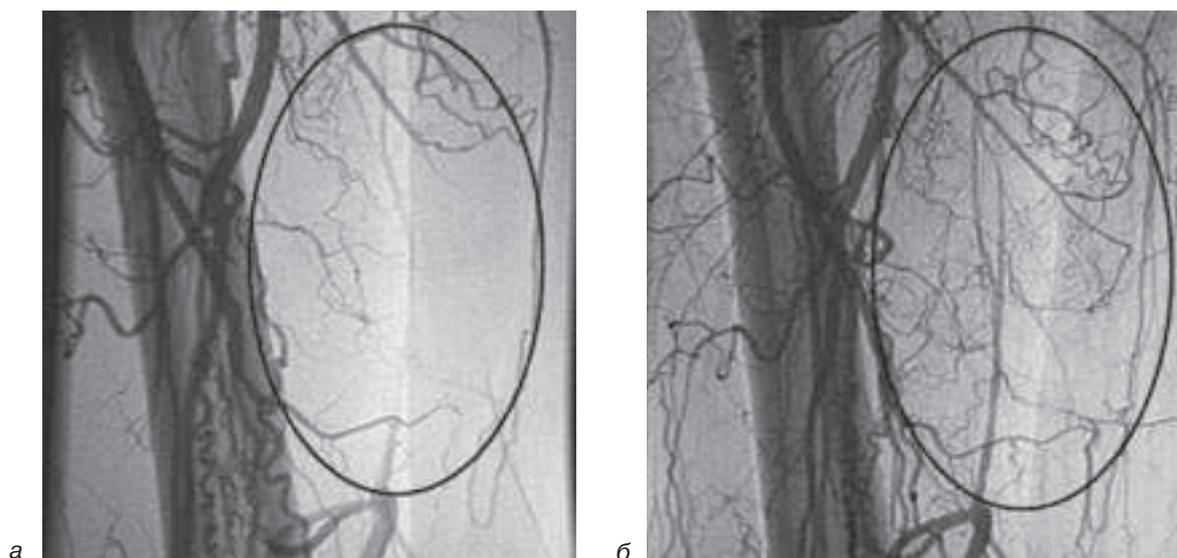


Рис. 5. Ангиограмма пациента 1-й группы:
 а – исходная; б – через 3 мес

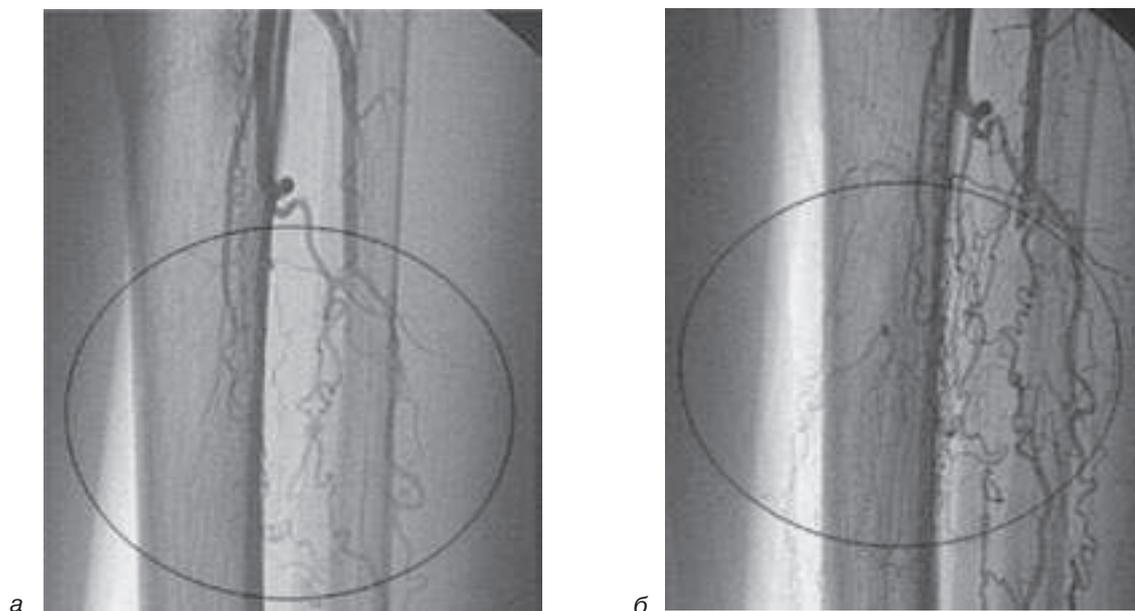


Рис. 6. Ангиограмма пациента 2-й группы:
а – исходная; б – через 3 мес

ние всего периода наблюдения. Наличие подобных изменений в системе гемостаза и реологии позволяет косвенно подтвердить появление молодого эндотелия (ангиогенеза).

Изменения показателей гемореологии являются предикторами микроциркуляторных изменений.

Литература

1. Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей. М.: Медицина; 1997: 160.
2. Лазаренко В.Л., Симоненков А.Б., Лазарев Е.В. Лечение критической ишемии нижних конечностей с использованием серотонина. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2003; 2: 26–30.
3. Бурлева Е.П. Критическая ишемия нижних конечностей: современные клинические и управленческие подходы: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2003.
4. Бокерия Л.А., Еремеева М.В. Современное состояние и перспективы использования ангиогенеза в лечении ишемической болезни сердца. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 2000; 2: 57–61.
5. Duan J., Murohara T. Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation*. 2000; 102: III-370–6.
6. Bauters C., Asahara T., Zheng L.P. et al. Physiological assessment of augment vascularity induce by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am. J. Physiol.* 1994; 267 (4, part 2): H1263–71.
7. Bauters C., Asahara T. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J. Vasc. Surg.* 1995; 21: 314–24.
8. Takeshita S., Zheng L.P., Brogi E. et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 662–70.
9. Takeshita S., Pu L.Q., Stein L.A. et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induced dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of persistent limb ischemia. *Circulation*. 1994; 90 (5, suppl. 2): II228–34.
10. Fuchs S., Baffour R., Zhou Y.F. et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pig with chronic experimental myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37: 1726–32.
11. Hamano K., Li T.-Sh., Kobayashi T. et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery*. 2001; 130: 44–54.
12. Satoshi S., Murohara T., Ikeda H. et al. Augmentation of postnatal bone marrow transplantation. *Circulation*. 2001; 103: 897–903.

13. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O. et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998; 97: 1114–23.
14. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limb. *Circulation*. 1998; 97: 1108–10.
15. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T. et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*. 2002; 360: 427–35.
8. Takeshita S., Zheng L.P., Brogi E. et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 662–70.
9. Takeshita S., Pu L.Q., Stein L.A. et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induced dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of persistent limb ischemia. *Circulation*. 1994; 90 (5, suppl. 2): II228–34.
10. Fuchs S., Baffour R., Zhou Y.F. et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pig with chronic experimental myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37: 1726–32.
11. Hamano K., Li T.-Sh., Kobayashi T. et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery*. 2001; 130: 44–54.
12. Satoshi S., Murohara T., Ikeda H. et al. Augmentation of postnatal bone marrow transplantation. *Circulation*. 2001; 103: 897–903.
13. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O. et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998; 97: 1114–23.
14. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limb. *Circulation*. 1998; 97: 1108–10.
15. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T. et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*. 2002; 360: 427–35.

References

1. Save'ev V.S., Koshkin V.M. Critical lower limb ischemia. Moscow: Meditsina; 1997: 160 (in Russian).
2. Lazarenko V.L., Simonenkov A.B., Lazarev E.V. Treatment of critical lower limb ischemia with the use of serotonin. *Angiologiya i Sosudistaya Khirurgiya*. 2003; 2: 26–30 (in Russian).
3. Burleva E.P. Critical lower limb ischemia: recent clinical and management approaches. Dr. med. sci. Diss. Moscow; 2003 (in Russian).
4. Bockeria L.A., Ereemeeva M.V. Recent state and outlook for angiogenesis use in treatment of ischemic heart disease. *Grudnaya i Serdechno-Sosudistaya Khirurgiya*. 2000; 2: 57–61 (in Russian).
5. Duan J., Murohara T. Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation*. 2000; 102: III-370–6.
6. Bauters C., Asahara T., Zheng L.P. et al. Physiological assessment of augment vascularity induce by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am. J. Physiol.* 1994; 267 (4, part 2): H1263–71.
7. Bauters C., Asahara T. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor.

Поступила 09.07.2013