

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ХІРУРГІЇ
ТА ТРАНСПЛАНТОЛОГІЇ імені О. О. ШАЛІМОВА»**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

САВІН ВОЛОДИМИР ВАСИЛЬОВИЧ

УДК: 616.13:617.58)-005.4-089:591.41:576.7

ДИСЕРТАЦІЯ

**КЛІТИННА СТИМУЛЯЦІЯ АНГІОГЕНЕЗУ В КОМПЛЕКСНОМУ
ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ІШЕМІЮ КІНЦІВОК**

14.01.03 «Хірургія»
(медичні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело В. В. Савін

Науковий керівник:
Домбровський Дмитро Борисович,
доктор медичних наук, професор

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Савін В. В. Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.03 «Хірургія». – Буковинський державний медичний університет МОЗ України, Державна установа «Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова» НАМН України, Київ, 2021.

У дисертації вивчено та обґрунтовано проблему лікування хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок з оклюзійно-стенотичним ураженням артерій гомілок (так званого дистального русла).

Ціль нашої роботи покращити результати лікування хворих із дистальним ураженням артерій, проблематичним для проведення прямої реваскуляризації, шляхом клінічного застосування трансплантації клітин кордової крові.

Згідно законодавчої бази, яка існує на сьогоднішній день, проводити клінічні дослідження, з використанням клітинної трансплантації, можливо лише після проведення доклінічних досліджень.

Наше дисертаційне дослідження містить дві частини: експериментальну та клінічну. Метою експериментального дослідження було вивчення впливу трансплантації клітин кордової крові на процеси ангиогенезу у тварин із змодельованою ішемією кінцівки за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів дослідження, а також проведенні проб з фізичним навантаженням.

В якості дослідних тварин використали 30 білих нелінійних щурів. Тварини були поділені на 2 групи: I – тварини, у яких була змодельована ішемія кінцівки, II – тварини, яким на тлі ішемії кінцівки введено клітини кордової крові. Моделювання ішемії задньої кінцівки щура проводилось під

кетаміновим знечуленням за методом Т. А. Князевої у модифікації О. М. Горбатюка.

Позитивні результати після проведеного експериментального дослідження дозволили перейти на наступний етап – вивчення процесів ангиогенезу після трансплантації клітин кордової крові в ішемізовану кінцівку в клінічних умовах, за допомогою гістологічних дослідженням за методом Н. З. Слінченко та імуногістохімічних досліджень з визначенням експресії віментину та фактору Віллебранда, даних ультразвукової доплерографії, лабораторних методів дослідження, лазерної доплерівської флоуметрії, рентгенконтрастної ангиографії та оцінки якості життя.

Для проведення клінічної частини дослідження брали участь 46 пацієнтів з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу. Після обстеження у 22 пацієнтів на основі аналізу результатів ультразвукової доплерографії та рентгенконтрастної ангиографії констатовано наявність локальних ділянок оклюзії артерій нижніх кінцівок та задовільне дистальне русло. Даним хворим виконано прямі реконструктивні операції. У подальшому клінічному дослідженні брали участь 24 пацієнта з облітеруючим атеросклерозом та дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок, яким неможливе проведення прямої.

Основну клінічну групу склали 13 пацієнтів з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу, яким проводили трансплантацію клітин кордової крові, з них 10 чоловіків (76,9±11,7 %) та 3 жінки (23,1±11,7 %). До групи контролю увійшли 11 пацієнтів (9 чоловіків та 2 жінки) з облітеруючим атеросклерозом та дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок, яким не проводили трансплантацію клітин кордової крові. Критеріями виключення з основної групи були пацієнти які мали покази до прямих реконструктивних операцій. Також виключались пацієнти з поширеними некрозами нижніх кінцівок – категорія 6 по Rutherford (IV ступінь по Fontaine), хворі з цукровим діабетом, з обтяженим онкологічним анамнезом.

В основній групі в якості трансплатату використовували кріоконсервовану суспензію клітин кордової крові, отриману з банку пуповинної крові ТОВ «Інститут клітинної терапії».

Після спинномозкового (або епідурального) знеболення, клітинний трансплантат вводили в ішемізовану м'язову тканину у верхній третині гомілки по медіальній та латеральній поверхні (Пат. UA 131176).

У ході клінічного дослідження при гістологічному обстеженні біоптатів м'язової тканини у пацієнтів з хронічною ішемією нижніх кінцівок основної групи через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові, відмічено мозаїчні зміни структури тканин. На фоні набряку в біоптатах м'язової тканини мають місце скупчення молодих ендотеліоцитів та фібробластів, поодинокі новоутворені капіляри з ознаками функціонування – заповнені форменими елементами крові. На 3 місяць після клітинної трансплантації процеси регенерації м'язової тканини та формування новоутворених капілярів яскравіше виражені, ніж в попередній термін дослідження. Крім того, відмічено значне збільшення зон регенерації та новоутворених капілярів, які утворювали добре виражену і розгалужену судинну мережу, де здійснюється кровотік. У зразках м'язової тканини на шостий місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової крові, виявляли багаточисельні вогнища регенерації, появу поперечної посмугованості м'язових волокон та зменшення ознак дистрофії. Через 12 місяців після клітинної трансплантації відмічено триваючу регенерацію міосимпласту та процеси васкуло–ангіогенезу, однак ступінь їх проявів дещо менша в порівнянні з попередніми термінами, тобто, має місце поступова стабілізація регенераторної реакції та процесу компенсаторного ангіогенезу. У міосимпласті зустрічались лише поодинокі нерівномірно розташовані набряково–дистрофічні вогнища, а новоутворені капіляри формували активно функціонуючу судинну мережу.

Імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, особливо була виражена вже через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові в ендомізії та перимізії.

Наявність репаративно-відновного процесу та ангиогенезу в ендомізії через 6 місяців після трансплантації підтверджується експресією мезенхімального фактору віментину, а в перимізії – активною експресією фактору Віллебранда. Через 12 місяців після клітинної трансплантації імуногістохімічний аналіз вказував на зниження експресії мезенхімального фактору віментину (проявлялось у вигляді нерівномірної експресії) та фактору Віллебранда, порівняно з 6 місяцем після трансплантації.

При порівнянні параметрів ЛДФ в динаміці лікування через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові відмічається достовірне ($p < 0,01$) зменшення Мф на 56 %. При цьому значення резерву капілярного кровотоку нітрогліцеринової проби (РККн) достовірно ($p < 0,01$) збільшувалось на 39,0 %. Відмічена тенденція до збільшення значень показника мікроциркуляції до $10,84 \pm 0,8$ пф.од. ($p < 0,01$). Через 3 місяці після трансплантації можна відмітити нормалізацію Мф до $4,06 \pm 0,79$ пф.од. Було виявлена тенденція до зниження показника шунтування тканинного кровотоку на пальцях нижніх кінцівок до $1,87 \pm 0,12$ у.о. ($p < 0,01$). При цьому значення РККо достовірно ($p < 0,01$) збільшувалось на 62,5%, у порівнянні з вихідними даними. За даними вейвлет-аналізу мала місце тенденція до збільшення значення максимальної амплітуди ендотеліальних та респіраторних флаксмоцій до $1,12 \pm 0,03$ пф.од. та $0,39 \pm 0,04$ пф.од відповідно ($p < 0,01$). Через 12 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові, відмітили нормалізацію Мф до $4,51 \pm 0,75$ пф.од. Відмічається покращення рівня РККо та РККн, до $232,4 \pm 21,6$ % ($p < 0,01$) та $352,0 \pm 29,0$ % ($p < 0,01$) Відмічена стійка тенденція до зростання показника мікроциркуляції I-го пальця стопи до $13,09 \pm 2,19$ у.о. ($p < 0,01$) через 12 місяців після трансплантації.

Нами також проведена оцінка якості життя протягом року. Вона включала в себе визначення індексу якості життя, дистанції безболісної ходьби та можливої швидкості ходьби.

Збільшення дистанції та швидкості безболісної ходи активніше відбувалося у пацієнтів основної групи, яким проводилась трансплантація

клітин кордової крові, що через 6 місяців були більшими на 9,1 % за результати групи контролю, а через 12 місяців перевищували аналогічні показники в 1,4 рази. У пацієнтів контрольної групи через 1 місяць відмічено (невірогідне) покращення індексу якості життя на 3,4 %, порівняно з пацієнтами, котрим виконано трансплантацію клітин кордової крові. Однак, вже через 3 місяці і надалі, спостерігали зниження динаміки росту індексу якості життя у пацієнтів групи контролю. Через 12 місяців після консервативного лікування даний показник відрізнявся у 1,3 рази від початкових результатів.

Аналізуючи дані рентгенконтрастної ангіографії через 12 місяців після трансплантації дані рентгеноконтрастної ангіографії свідчили про значне покращення дистального кровотоку, завдяки більш збагаченій колатеральній мережі. Через 12 місяців після трансплантації визначається зменшення ступеню ішемії по класифікації Фонтейна: у 4 пацієнтів зменшився ступінь ішемії з IV на III, у 9 пацієнтів – з III на II.

Підсумовуючи вищесказане, варто зазначити, що завдяки застосуванню методу непрямой реваскуляризації шляхом трансплантації клітин кордової крові та стимуляції ангіогенезу, був отриманий тривалий позитивний клінічний ефект, що проявляється у вигляді зниження ступеня ішемії, збільшення дистанції та швидкості безбольової ходьби, покращення працездатності, поліпшення особистого благополуччя пацієнтів у фізичній, психологічній та соціально-економічній сфері, та, як наслідок, покращення взаємовідносин у сім'ї.

Клінічно доведено, що використання методу трансплантації клітин кордової крові пацієнтам, яким не можливо виконати прямі реконструктивні втручання, розширює можливості успішного лікування хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу та може стати останнім порятунком для хворих, які знаходяться на межі ампутації.

Ключові слова: хронічна ішемія, клітини кордової крові, дистальне ураження, ангіогенез.

Savin V. V. Cellular stimulation of angiogenesis in the complex treatment of patients with chronic ischemia of the extremities. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for a PhD degree in medical sciences in specialty 14.01.03 «Surgery». – Bukovynian state medical university, State Institution «O. O. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology» National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation studies and substantiates the problem of treatment of patients with chronic ischemia of the lower extremities with occlusive-stenotic lesions of the tibial arteries (the so-called distal bed).

The aim of our work is to improve the results of treatment of patients with distal arterial lesions, problematic for direct revascularization, through the clinical application of cord blood cell transplantation.

According to the current legal framework, it is possible to conduct clinical trials using cell transplantation only after conducting preclinical studies.

Our dissertation research contains two parts: experimental and clinical.

The aim of the experimental study was to study the effect of cord blood cell transplantation on angiogenesis in animals with simulated limb ischemia using histological and immunohistochemical methods, as well as exercise tests.

Thirty white nonlinear rats were used as experimental animals. The animals were divided into 2 groups: I – animals in which limb ischemia was simulated, II – animals in which cord blood cells were injected against the background of limb ischemia.

Simulation of ischemia of the hind limb of rats was performed under ketamine anesthesia by the method of T. A. Knyazeva in the modification of OM Gorbatyuk.

Positive results after the experimental study allowed to move to the next stage – the study of angiogenesis after transplantation of cord blood cells into the ischemic limb in a clinical setting, using histological studies by the method of N. Z. Slinchenko and immunohistochemical studies to determine the expression of

vimentin and Willebrand factor, Doppler ultrasound, laboratory tests, laser Doppler flowmetry, X-ray contrast angiography and quality of life assessment.

For the clinical part of the study involved 46 patients with manifestations of chronic ischemia of the lower extremities on the background of obliterating atherosclerosis.

After examination in 22 patients based on the analysis of the results of ultrasound Doppler and X-ray contrast angiography, the presence of local areas of occlusion of the arteries of the lower extremities and a satisfactory distal bed was found. These patients underwent direct reconstructive surgery. A further clinical study included 24 patients with obliterating atherosclerosis and distal lower extremity artery disease who could not have a straight line.

The main clinical group consisted of 13 patients with manifestations of chronic ischemia of the lower extremities on the background of obliterating atherosclerosis, who underwent transplantation of cord blood cells, including 10 men (76,9±11,7 %) and 3 women (23,1±11,7 %). The control group included 11 patients (9 men and 2 women) with obliterating atherosclerosis and distal lesions of the arteries of the lower extremities, who did not undergo transplantation of cord blood cells.

The exclusion criteria from the main group were patients who had indications for direct reconstructive surgery. Also excluded were patients with common necrosis of the lower extremities – category 6 according to Rutherford (IV degree according to Fontaine), patients with diabetes mellitus, with a burdensome history of cancer.

In the main group as a transplant used cryopreserved suspension of cord blood cells obtained from the umbilical cord blood bank LLC "Institute of Cell Therapy".

After spinal (or epidural) anesthesia, the cell graft was inserted into the ischemic muscle tissue in the upper third of the leg on the medial and lateral surface (US Pat. No. 131176).

In a clinical study on histological examination of muscle biopsies in patients

with chronic ischemia of the lower extremities of the main group 1 month after transplantation of cord blood cells, mosaic changes in tissue structure were observed. Against the background of edema in the biopsies of muscle tissue there are clusters of young endothelial cells and fibroblasts, single newly formed capillaries with signs of functioning – filled with formed elements of blood. At 3 months after cell transplantation, the processes of muscle tissue regeneration and the formation of newly formed capillaries are more pronounced than in the previous period of the study. In addition, there was a significant increase in regeneration zones and newly formed capillaries, which formed a well-defined and branched vascular network, where blood flow. Numerous foci of regeneration, transverse striation of muscle fibers, and a reduction in signs of dystrophy were detected in muscle tissue samples at the sixth month after cord blood stem cell transplantation. 12 months after cell transplantation, ongoing myosymplast regeneration and vasculo-angiogenesis processes were observed, but the degree of their manifestations is slightly lower than in previous terms, ie, there is a gradual stabilization of the regenerative response and the process of compensatory angiogenesis. Only isolated, unevenly located edematous-dystrophic foci were found in the myosymplast, and the newly formed capillaries formed an actively functioning vascular network.

Immunohistochemical reaction to Willebrand factor, which was expressed in the endothelial structures of blood vessels, was especially pronounced 1 month after transplantation of cord blood cells in endomysia and perimysia.

The presence of the reparative-restorative process and angiogenesis in endomysia 6 months after transplantation is confirmed by the expression of mesenchymal factor vimentin, and in perimysia - by the active expression of Willebrand factor. Twelve months after cell transplantation, immunohistochemical analysis showed a decrease in the expression of mesenchymal factor vimentin (manifested as uneven expression) and Willebrand factor, compared with 6 months after transplantation.

When comparing the parameters of LDF in the dynamics of treatment 1

month after transplantation of cord blood cells, a significant ($p < 0,01$) decrease in MF by 56 %. At the same time, the value of the capillary blood flow reserve of the nitroglycerin sample (RKKn) significantly ($p < 0,01$) increased by 39,0 %. There is a tendency to increase the values of the microcirculation to $10,84 \pm 0,8$ pf.od. ($p < 0,01$). In 3 months after transplantation it is possible to note normalization of MF to $4,06 \pm 0,79$ pf.od. There was a tendency to reduce the rate of shunting of tissue blood flow on the fingers of the lower extremities to $1,87 \pm 0,12$ USD ($p < 0,01$). The value of RCC significantly ($p < 0,01$) increased by 62,5 %, compared with baseline. According to wavelet analysis, there was a tendency to increase the value of the maximum amplitude of endothelial and respiratory flaxmotions to $1,12 \pm 0,03$ pf.od. and $0,39 \pm 0,04$ pf.od, respectively ($p < 0,01$). 12 months after transplantation of cord blood stem cells, normalization of MF to $4,51 \pm 0,75$ pf.od. There is an improvement in the level of RKKo and RKKn, up to $232,4 \pm 21,6$ % ($p < 0,01$) and $352,0 \pm 29,0$ % ($p < 0,01$). There is a steady tendency to increase the rate of microcirculation of the first finger feet to $13,09 \pm 2,19$ USD ($p < 0,01$) 12 months after transplantation.

We also assessed the quality of life during the year. It included determining the quality of life index, painless walking distance and possible walking speed.

The increase in distance and speed of painless gait was more active in patients of the main group who underwent transplantation of cord blood cells, which after 6 months were 9.1% higher than the results of the control group, and after 12 months exceeded similar values by 1.4 times . Patients in the control group showed a (unbelievable) improvement in the quality of life index by 3,4 % after 1 month, compared with patients who underwent cow blood cell transplantation. However, after 3 months and beyond, there was a decrease in the dynamics of growth of the quality of life index in patients of the control group. 12 months after conservative treatment, this figure differed 1,3 times from the initial results.

Analyzing X-ray angiography data 12 months after transplantation, X-ray contrast angiography data showed a significant improvement in distal blood flow, due to a more enriched collateral network 12 months after transplantation, a

decrease in the degree of ischemia is determined according to Fontaine's classification: in 4 patients the degree of ischemia decreased from IV to III, in 9 patients – from III to II.

Summarizing the above, it should be noted that due to the use of indirect revascularization by transplantation of cord blood cells and stimulation of angiogenesis, a long-term positive clinical effect was obtained, manifested in reducing ischemia, increasing distance and speed of painless walking, improving personal health. in the physical, psychological and socio-economic spheres, and, as a consequence, the improvement of family relationships.

It has been clinically proven that the use of cord blood cell transplantation in patients who cannot perform direct reconstructive interventions enhances the successful treatment of patients with chronic lower extremity ischemia with obliterating atherosclerosis and may be the last resort for patients with amputation.

Key words: chronic ischemia, cord blood cells, distal lesion, angiogenesis.

Список публікацій здобувача:

Стаття у науковому фаховому виданні України:

1. Домбровський Д. Б., Пшиборовська Ю. Р., Яковець К. І., **Савін В. В.**, Оліник Ю. В., Максим'юк В. В. Характеристика та шляхи використання стовбурових клітин кордової крові. Буковинський медичний вісник. 2014. Т. 18. №1(69). С. 151–155. *(Здобувачем досліджено результати використання клітин кордової крові при різних нозологіях, написано статтю).*

2. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р. Трансплантація клітин кордової крові як метод лікування хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2018. №22(3). С. 450–455. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із хронічною ішемією, написано статтю).*

**Статті у наукових фахових виданнях України,
включені до міжнародних наукометричних баз даних:**

3. Домбровський Д. Б., Савін В. В., Оліник Ю. В., Пшиборовська Ю. Р., Максим'юк В. В. Імуногістохімічна характеристика диференціації клітин кордової крові за різних умов трансплантації в експерименті. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2013. №12(4). С. 32–37. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

4. Домбровський Д. Б. Савін В. В., Максим'юк В. В. Морфологічна та імуногістохімічна характеристика трансплантації стовбурових клітин пуловинної крові за умов ішемії кінцівок в експерименті. Клінічна та експериментальна патологія. 2015. Т. XIV. №1(51). С. 51–54. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

5. Домбровський Д. Б., Савін В. В. Оцінка стану мікрогемодинаміки за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії у хворих із хронічною ішемією нижніх кінцівок після трансплантації клітин кордової крові. Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука. 2016. №1(73). С. 34–37. *(Здобувачем проведено оцінку даних лазерної доплерівської флоуметрії після трансплантації клітин кордової крові, написано статтю).*

6. Савін В. В. Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов експериментальної ішемії. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016. №15(3). С. 81–86. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

7. Dombrovsky D. B., Savin V. V., Maksymyuk V. V. Transplantation of the cord blood stem cells under conditions of experimental ischemia. Morphological and immunohistochemical characteristics. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2017. №16(1). С. 65–69. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

**Стаття у науковому виданні іншої держави,
яка входить до Європейського Союзу:**

8. Dombrovskiy D. B., **Savin V. V.**, Oliynyk Yu. V., Sheremet M. I., Pshyborovska Yu.R. Clinical and functional aspects of cord blood cell transplantation in patients with distal lesion of lower limb arteries. Letters in Applied NanoBioScience. 2020. Vol. 9(2). P. 952–955. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із дистальним ураженням, написано статтю).*

Статті у інших наукових виданнях України:

9. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Пшиборська Ю. Р. Клініко-функціональні аспекти трансплантації клітин кордової крові у хворих із дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Медицина. 2020. №1. С. 38–44. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із хронічною ішемією, написано статтю).*

10. Домбровський Д. Б., Салютін Р. В., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р. Імуногістохімічна характеристика процесів після трансплантації клітин кордової крові при ішемії кінцівок в експерименті. Клінічна флебологія. 2013. №6(1). С. 29–33. *(Здобувачем запропоновано трансплантацію клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

11. Домбровський Д. Б., Давиденко І. С., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р., Масний О. І. Клініко-експериментальні аспекти клітинної трансплантації при хронічній ішемії кінцівок. Клінічна флебологія. 2014. №7(1). С. 150–151. *(Здобувачем досліджено результати експериментальних та клінічних досліджень використання клітин кордової крові при хронічній ішемії, написано статтю).*

12. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Масний О. І. Стимуляція ангіогенних процесів за умов ішемії кінцівок в експерименті та в клініці

після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Клінічна флебологія. 2015. №8(1). С. 94–95. *(Здобувачем досліджено результати експериментальних та клінічних досліджень використання клітин кордової крові при хронічній ішемії, написано статтю).*

13. Домбровський Д. Б., Салютін Р. В., **Савін В. В.** Непряма реваскуляризація як метод вибору в лікуванні хворих з ураженням артеріального дистального русла. Клінічна флебологія. 2016. №9(1). С. 69–70. *(Здобувачем досліджено ефективність непрямих методів при хронічній ішемії, написано статтю).*

14. **Савін В. В.**, Домбровський Д. Б., Пшиборовська Ю. Р. Трансплантація клітин кордової крові у хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Клінічна флебологія. 2017. №10(1). С. 53–54. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із дистальним ураженням, написано статтю).*

Тези наукових доповідей:

15. Dombrovsky D. B., Olinyk Ju. V., **Savin V. V.**, Pshiborovska Ju. R. Ultrastructural changes of vascular endothelial during transplantation of mesenchymal stem cells of fatty tissue at term of ischemia in experiment. Medicine of the republic of Moldova: The XIX session of Balkan medical days and the second congress of emergency, Moldova, September 22–24, 2013: abstracts book. Archives of the Balkan Medical Union. 2013. Vol. 48(3). P. 109. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано тези).*

16. Домбровський Д. Б., Салютін Р. В., Олійник Ю. В., **Савін В. В.** Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов ішемії в експерименті. Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 22–23 листопада 2013 року: тези доповіді. Київ, 2013. С. 40–45. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано тези).*

17. Домбровський Д. Б., Пшиборовська Ю. Р., **Савін В. В.** Клініко-експериментальні аспекти клітинної трансплантації при хронічній ішемії кінцівок. XV конгрес Світової Федерації Українських Лікарських Товариств, м. Чернівці, 16–18 жовтня 2014 року: тези доповіді. Чернівці, 2014. С. 271–272. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із хронічною ішемією, написано тези).*

18. Домбровський Д. Б., Салютін Р. В., **Савін В. В.**, Олійник Ю. В. Стимуляція процесів ангиогенезу за умов ішемії кінцівок в експерименті. 95 підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету, присвячена 70-річчю, м. Чернівці, 17–21 лютого 2014 року: тези доповіді. Чернівці, 2014. С. 111–112. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано тези).*

19. **Савін В. В.**, Домбровський Д. Б., Масний О. І. Стимуляція ангиогенних процесів за умов ішемії кінцівок в експерименті та в клініці після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. 97 підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького складу Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці, 15–22 лютого 2016 року: тези доповіді. Чернівці, 2016. С. 156–157. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із хронічною ішемією, написано тези).*

20. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р. Трансплантація кордової крові у лікуванні пацієнтів з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Сухаревські читання – ангиологія та судинна хірургія сьогодні: Конгрес асоціації судинних хірургів, флебологів та ангиологів України, м. Київ, 11–12 квітня 2019 року: тези доповіді. Клінічна флебологія. 2019. №11(1). С. 53–55. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із дистальним ураженням, написано статтю).*

Патент на корисну модель:

21. Домбровський Д. Б., Савін В. В., Пшиборовська Ю. Р. Патент на корисну модель №131176 Україна, МПК А61В 17/00. Спосіб лікування хворих з ішемією нижніх кінцівок; власник Вищий державний навчальний заклад «Буковинський державний медичний університет» МОЗ України; № u201806800; заявлено 15.06.2018; опубліковано 10.01.2019. Бюл. №1. *(Здобувачем запропоновано спосіб лікування хворих з ішемією нижніх кінцівок шляхом трансплантації стовбурових клітин в зону ішемізованої м'язової тканини гомілки у вигляді стрічкової доріжки вздовж облітерованих судин за допомогою довгої канюлі та оформлено патент).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ШЛЯХИ ВИКОРИСТАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ (огляд літератури) ...	26
1.1. Загальні дані щодо високодиференційованих карцином та мультифокальності (частота виявлення, епідеміологія)	26
1.2. Діагностика та методи хірургічного лікування ішемії на фоні мікроциркуляторних розладів нижніх кінцівок	29
1.3. Характеристика клітин кордової крові, їх використання при різних захворюваннях	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
2.1. Законодавча база для проведення експериментального дослідження	48
2.2. Характеристика та методика проведення експериментального дослідження	50
2.3. Методика проведення гістологічних та імуно-гістохімічних досліджень	54
2.4. Характеристика та методика проведення клінічного дослідження	58
2.5. Методика отримання та характеристика клітин кордової крові	70
2.6. Методика введення клітин кордової крові	73
2.7. Оцінка стану мікрогемодинаміки за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок	76
2.8. Оцінка якості життя хворих	81
2.9. Методи статистичної обробки результатів дослідження	85
РОЗДІЛ 3. ТРАНСПЛАНТАЦІЯ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ В	

ЕКСПЕРИМЕНТИ	86
3.1. Рухова активність щурів I та II груп	86
3.2. Гістологічні зміни структури м'язової тканини кінцівки за умов експериментальної ішемії	87
3.3. Імуно-гістохімічні зміни структури м'язової тканини кінцівки за умов експериментальної ішемії	95
РОЗДІЛ 4. КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ	101
4.1. Клінічна картина у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок після клітинної трансплантації	101
4.2. Оцінка стану мікроциркуляторного русла у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок після клітинної трансплантації	105
4.3. Гістологічна характеристика ішемізованої м'язової тканини нижньої кінцівки після клітинної трансплантації	119
4.4. Імуногістохімічна характеристика ішемізованої м'язової тканини нижньої кінцівки після клітинної трансплантації	126
4.5. Характеристика якості життя пацієнтів після трансплантації клітин кордової крові	131
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	137
ВИСНОВКИ.....	150
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	152
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	153
ДОДАТОК 1. Список опублікованих праць	180
ДОДАТОК 2. Впровадження	185

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГСА – глибока стегнова артерія

ГІНК – гостра ішемія нижніх кінцівок

ЗСА – загальна стегнова артерії

ЗВГА – задня великогомілкова артерія

ЕАЕ – ендартеректомія

КІНК – критична ішемія нижніх кінцівок

СК – Стовбурові клітини

МГА – малогомілкова артерія

ПА – підколінна артерія

ПАС – поверхнева артерія стегна

ПВГА – передня великогомілкова артерія

РВГ – реовазографія

РІ – реографічний індекс

РОТ – роторна реваскуляризаційна остеотрепанація

РСТ – регіонарний систолічний тиск

СПГС – стегново-підколінно-гомілковий сегмент

ТПС – тибіо-перонеальний стовбур

УЗДС – ультразвукове дуплексне сканування

ЛДФ – лазерна доплерівська флоуметрія

ХІНК – хронічна ішемія нижніх кінцівок

ЕКГ – електрокардіограма

СК КК – стовбурові клітини кордової крові

ПШ – показник шунтування

ПМ – показник мікроциркуляції

РККо – резерв капілярного кровотоку оклюзивної проби

РККн – резерв капілярного кровотоку нітрогліцериновної проби

ВСТУП

Актуальність теми. Хронічні облітеруючі захворювання артерій нижніх кінцівок займають більше 20 % серед всіх уражень серцево-судинної системи (Никульников П. И., 2013; Кутовий О. Б., 2012; Гардубей Є. Ю., 2014; Корсак В. В., 2016). Смертність серед пацієнтів, які мають початкові клінічні прояви даної патології у вигляді переміжної кульгавості становить 3–5 % за рік, а при наявності критичної ішемії нижніх кінцівок смертність підвищується до 20 % за рік (Дунаевская С. С., Подрезенко Е. С., Никифорова А. А. та ін., 2015; Björck M. et al., 2020; Hinchliffe N. et al., 2020).

На сьогоднішній день актуальною та невирішеною залишається проблема лікування пацієнтів з оклюзійно-стенотичним ураженням артерій гомілки (дистального русла) (Прасол В. А., Мясоєдов К. В., Гилев Б. В., 2015; Никульников П. И., 2015). Оптимальним методом лікування хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок залишається адекватна реваскуляризація кінцівки – шунтуючі операції та ангіопластики (Dormandy J. A., Rutherford R. B., 2000).

Однак, результати хірургічної реваскуляризації на сьогоднішній день не можна визнати задовільними, адже відмічено чітку тенденцію до зростання кількості хворих із мультифокальним ураженням, із незадовільними дистальним руслом та кальцинозом артеріального русла. Прямі реконструкції в таких умовах можливо виконати лише в 49,5–58,0 % випадків. (Кузнецов М. Р., Евграфов А. И., Туркин П. А., 2002; Савельєв В. С., Кошкин В. М., Каралкин А. В., 2010; Русин В. І., Корсак В. В., Попович Я. М., Русин В. В., 2014). У першу чергу це стосується гомілкових сегментів, судинне русло яких не відповідає різко збільшеному об'єму крові, що надходить після проведеної прямої реваскуляризації (Пиптюк О. В., Сабадош Р. В., Пиптюк В. О., 2008; Гудз О. І., 2012; Поляков П. И., Горелик С. Г., Железнова Е. А., 2013).

Тому, коли можливості консервативного лікування вже вичерпані, а умови для виконання реконструктивних операцій на підколінно-гомілковому

сегменті відсутні, для запобігання інвалідизації пацієнта, хірурги все частіше застосовують непрямі методи реваскуляризації, спрямовані на покращання колатерального кровообігу і збільшення об'єму мікроциркуляторного русла внаслідок стимуляції ангиогенезу (Прасол В. А., 2014; Русин В. І., Корсак В. В., Русин В. В. та ін., 2015).

Існують різноманітні методи непрямой реваскуляризації нижніх кінцівок, такі як остеотрепанация, фасціотомія, поперекова симпатекомія, пересадка шкірних клапотів на ніжці, аутотрансплантація чепця на судинній ніжці (Zeller Th., Sixt S., Schwarz Th. et al., 2006; Fernandez N., McEnaney R., Marone L. K. et al., 2010), трансплантація мультипотентних клітин жирової тканини, аутотрансплантація аспірата кісткового мозку та ін. (Heidrich H., Schmidt T., Fahrig C., 2005; Norgren L., Hiatt W. R., Dormandy J. A. et al., 2007).

Трансплантація клітин жирової тканини ускладнюється через тривалий та складний процес заготівлі й культивування (Andrews R. G., Singer J. W., Bernstein I. D., 1986; Stashower M., Smith K., Williams J. et al., 1999; Badorff C., Brandes R. P., Popp R. et al., 2003; Katz A. J., Tholpady A., Tholpady S. S., 2005; Петренко А. Ю., Петренко Ю. А., Скоробогатова Н. Г., 2008; Поляченко Ю. В., Дрюк М. Ф., Домбровський Д. Б., 2010), а використання клітин кісткового мозку обмежене в зв'язку з високою травматизацією при заборі трансплантата, низьким рівнем активності та диференціації дорослих мезенхімальних клітин (Papadaki H. A. et al., 2005; Dominici M., 2006; Ra J. C. et al., 2011).

Кордову кров розглядають як джерело стовбурових клітин на рівні з іншими джерелами: кістковим мозком, периферійною кров'ю, плацентою, жировою тканиною та ін. (Kern S., Eichler H., Eichler H., Stoeve J., 2006; Lu X., Alshemali S., Wynter E. A., Dickinson A. M., 2010; Sun T, Ma Q-H., 2013; Nabich A., 2013; Jaing T. H., 2014; Achyut V. R., Varma N. R. S., Arbab A. S., 2014). Проте, відсутні дані щодо можливості застосування клітинних технологій для лікування пацієнтів з дистальним ураженням артерій

нижній кінцівок, зумовлених облітеруючим атеросклерозом. У зв'язку з вищевикладеним, розробка нових методів реваскуляризації зі стимулюванням ангиогенезу та моделюванням капілярного русла у хворих з атеросклерозом при хронічній ішемії нижніх кінцівок на фоні дистального ураження артерій є актуальним напрямком, що дозволить зменшити відсоток інвалідизації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у рамках науково-дослідної роботи кафедри хірургії №1 Буковинського державного медичного університету МОЗ України за темами: «В експерименті та клініці визначити ефективність застосування клітинних трансплантатів аутологічного та аlogenного походження в лікуванні хворих на хронічні ішемічні стани» (номер державної реєстрації 0112U001146); «Особливості діагностики, прогнозування розвитку ускладнень та лікування деяких хірургічних захворювань органів черевної порожнини у хворих з генетично детермінованими предикторами їх несприятливого перебігу» (номер державної реєстрації 0116U002936).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – покращити результати лікування хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок шляхом клінічного застосування трансплантації клітин кордової крові.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Виявити пацієнтів із дистальним ураженням артерій, проблематичним для проведення прямої реваскуляризації та запропонувати методи їх лікування.

2. В експерименті із моделюванням ішемії дослідити вплив клітин кордової крові на процеси стимуляції ангиогенезу.

3. Враховуючи проведені експериментальні дослідження обґрунтувати використання в клінічній практиці методики трансплантації клітин кордової крові у хворих на хронічну ішемію кінцівок.

4. За допомогою інструментальних методів та на основі гістологічних і імуногістохімічних досліджень м'язової тканини кінцівки на різних етапах клітинної трансплантації оцінити стан регіонарної гемодинаміки та визначити ефективність застосування клітин кордової крові у лікуванні хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок.

5. Провести аналіз ефективності застосування трансплантації клітин кордової крові шляхом оцінки якості життя пацієнтів з хронічною ішемією нижніх кінцівок.

Об'єкт дослідження – хронічна ішемія нижніх кінцівок.

Предмет дослідження – процеси ангиогенезу в ішемізованих кінцівках хворих при комплексному хірургічному лікуванні хронічної ішемії нижніх кінцівок із використанням трансплантації клітин кордової крові в експерименті та клініці.

Методи дослідження: експериментальні (гістологічні та імуногістохімічні дослідження біопсійного матеріалу, тест примусового плавання та визначення дистанції одномоментного пробігу тварин); загальноклінічні обстеження (опитування, аналіз скарг та анамнезу захворювання, послідовне об'єктивне обстеження), лабораторні (загальноклінічні, коагулограма, біохімічний аналіз крові); для визначення стану судинного русла кінцівки використані інструментальні (ультразвукова доплерографія, лазерна доплерівська флоуметрія, рентгенконтрастна ангиографія), морфологічні (гістологічні та імуногістохімічні дослідження біопсійного матеріалу); статистично-аналітичний метод.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше на експериментальній моделі ішемії кінцівок проведено вивчення впливу трансплантації клітин кордової крові на процеси ангиогенезу.

Вперше, науково обґрунтовано та розроблено методику лікування хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок із використанням трансплантації клітин кордової крові (патент України на корисну модель №131176).

Вперше в експерименті доведено, що використання клітин кордової крові стимулює ангиогенез в ішемізованій кінцівці та сприяє відновленню її функціонального стану.

Вперше проведено аналіз методів інструментального дослідження (ультразвукової доплерографії, лазерної флоуметрії та рентгеноконтрасної ангиографії) для визначення стану мікроциркуляційного русла при застосуванні трансплантації клітин кордової крові.

Вперше продемонстровано, що застосування трансплантації клітин кордової крові в комплексному лікуванні хронічної ішемії нижніх кінцівок в клінічній практиці дозволяє покращити процеси мікроциркуляції, збільшити дистанцію безбольової ходьби та зменшити ступінь ішемії.

Практичне значення одержаних результатів. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи адаптовані для впровадження та застосування в практичній медичній діяльності. Запропоновано методику проведення трансплантації клітин кордової крові та розроблено покази до її застосування хворим на хронічну ішемію кінцівок. На підставі проведених досліджень визначено, що трансплантація клітин кордової крові, при неможливості виконання реконструктивних операцій, стимулює ангиогенез і зменшує ішемічні прояви у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок. Позитивні результати лікування пацієнтів з хронічною ішемією нижніх кінцівок із використанням трансплантації клітин кордової крові дозволяють застосування цього методу в широкій клінічній практиці.

Наукові положення дисертації та рекомендації впроваджено у навчальний процес, лікувальну практику кафедр Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, Ужгородського національного університету, відділення Державної установи «Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова» НАМН України, профільних відділень лікарень Києва, Вінниці, Чернівців.

Особистий внесок здобувача. Внесок автора у дисертаційне дослідження є основним. Спільно з науковим керівником, сформулював мету і завдання дослідження, визначив актуальність теми, спланував і виконав наведені в дисертації дослідження. Здійснив інформаційний пошук, аналітичний огляд літератури. Всі експериментальні дослідження на лабораторних тваринах та подальше спостереження за ними виконані здобувачем самостійно в повному обсязі. Інтерпретував отримані гістологічних та імуногістохімічних даних експериментального та клінічного матеріалу. Особисто отримував біопсійний матеріал на різних етапах лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок, приймав участь у всіх оперативних втручаннях із застосуванням трансплантації клітинного матеріалу, провів аналіз отриманих даних, сформулював висновки та практичні рекомендації. Самостійно узагальнив результати роботи, обґрунтував методи лікування, підготував наукові матеріали до друку. Наведені в дисертації результати досліджень, їх аналіз та інтерпретація, а також ідеї, принципові наукові положення і висновки сформульовані автором. Самостійно проведено статистичну обробку даних із застосуванням комп'ютерних програм та узагальнення отриманих результатів. У наукових працях, опублікованих в співавторстві, використано фактичний матеріал досліджень автора.

Апробація результатів дисертації. Основні результати та положення дисертації було представлено на: XIX session of Balkan medical days and the second congress of emergency «Medicine of the republic of Moldova» (Moldova, 2013), Науково-практичній конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика» (м. Київ, 2013 р.); 95-й підсумковій конференції професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету, присвяченій 70-річчю (м. Чернівці, 2014 р.); XV конгресі Світової федерації Українських Лікарських Товариств (м. Чернівці, 2014 р.); V З'їзді судинних хірургів, флебологів та ангіологів України «Сухаревські читання. Діагностика і сучасні методи лікування

гострих і хронічних захворювань судин» (м. Київ, 2017 р.), Конгресі асоціації судинних хірургів, флебологів та ангіологів України «Сухаревські читання – ангіологія та судинна хірургія сьогодні» (м. Київ, 2019 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукова праця, з яких 2 статті у науковому фаховому виданні України; 5 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних; 1 стаття у науковому виданні іншої держави, яка входить до Європейського Союзу; 6 статей у інших наукових виданнях України; 6 тез наукових доповідей, 1 патент на корисну модель.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ШЛЯХИ ВИКОРИСТАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ

(огляд літератури)

1.1. Епідеміологія ішемії нижніх кінцівок

Захворювання периферичних артерій останніми роками стрімко розповсюджуються у всьому світі, стаючи серйозною проблемою не тільки в країнах із низьким рівнем життя, а навіть для розвинених країн (Shishehbor M. H., 2014). За даними ВООЗ близько 10% населення нашої планети хворіють атеросклерозом судин різноманітної локалізації, при цьому біля 2 % складають атеросклеротичні артеріопатії нижніх кінцівок. Атеросклероз магістральних судин становить понад 20 % серед усіх видів серцево – судинних захворювань, що відповідає 2–3 % від загальної кількості населення України. Частота оклюзивних захворювань артерій нижніх кінцівок у старшій віковій групі може сягати 23 %, серед яких у 20–40 % розвивається критична ішемія нижніх кінцівок (КІНК) [12, 63, 64].

Захворювання периферичних артерій є причиною від 12 до 15 % смертей у Європі [7, 64] і є основним тягарем для системи охорони здоров'я. Спектр коливається від безсимптомної або переміжної кульгавості до некрозу та втрати кінцівок [65].

Існують різні причини, які можуть призвести до ішемії нижніх кінцівок, такі як артеріальна емболія (30 %), артеріальний тромбоз внаслідок прогресування та ускладнення атеросклерозу (40 %), тромбоз аневризми підколінної ямки (5 %), травма (5 %) або тромбоз трансплантата після реконструктивних операцій(20 %) [66].

У 2015 році фахівцями в Mayo Clinic та University of California San Francisco опубліковано результати метааналізу 13 досліджень, де порівнювали частоту ампутацій у 1527 пацієнтів протягом одного року після операцій реваскуляризації, яка склала у пацієнтів з хронічною критичною

ішемією 12%, а у пацієнтів з переміжною кульгавістю – 1 % [67]. У 2006 році в Бостоні (США) проведено проспективне, рандомізоване, подвійне, сліпе, багатоцентрове дослідження (PREVENT III), де проаналізовано результати реваскуляризації у пацієнтів з хронічною критичною ішемією нижніх кінцівок та тяжкими супутніми захворюваннями та отримано такі дані: післяопераційна (до 30 діб) летальність – 2,7 %, оклюзія шунта – 5,2 %, летальність протягом року – 16 %, збереження кінцівки у пацієнтів, які вижили протягом року – 80 % [68].

За даними Colini V. G. (2011), частота ампутацій нижніх кінцівок при їх критичній хронічній ішемії протягом перших шести місяців становить 12 %, а смертність протягом першого року – 19,1 % [69]. Інші дослідження показують, що 50 % пацієнтів з критичною хронічною ішемією нижніх кінцівок протягом року з моменту діагностування обходяться без ампутації, хоч і залишаються із симптомами ішемії, тоді як 25 % потребують високої ампутації, а інші 25 % помирають [70].

За даними Chaudhuri A. (2018), протягом 6-ти місяців після встановлення діагнозу ішемії нижніх кінцівок 20 % пацієнтів помирають від різних причин, 35% залишаються живими завдяки виконаній ампутації кінцівки, 45% виживають без ампутації, якість життя яких значною мірою погіршується через збереження явищ ішемії. Пацієнти з ішемією нижніх кінцівок мають високий ризик смертності та розвитку серцево-судинних інцидентів, який перевищує такий при атеросклеротичних ураженнях коронарних артерій [71, 72]. Хоча кількість ампутацій у загальній популяції пацієнтів із ураженнями периферичних артерій останніми роками знижується, їх рівень залишається досить високим. Можливою причиною цього є пізні звернення пацієнтів до судинних хірургів, але не виключається також і роль відсутності узгодженої позиції щодо визначення «кінцівки, яку неможливо зберегти» [73].

Більшість досліджень оцінювали «лікар-орієнтовані» результати лікування пацієнтів з ішемією нижніх кінцівок, такі як прохідність шунта,

збереження кінцівки, виживання пацієнтів [74]. І тільки за останні декілька років дослідники перенесли акцент на «пацієнт-орієнтовані» результати лікування, що призвело до покращення якості життя у цих хворих, навіть після ампутації кінцівки, порівняно з боротьбою за нежиттєздатну кінцівку [75, 76, 77, 78, 79].

При проведенні 5-річного дослідження в 3-х госпіталях Фінляндії, відзначили, що після високої ампутації кінцівки всього 10 % пацієнтів могли самостійно ходити, а 25 % – жити за межами лікувального закладу. Протягом 3 років після ампутації нижньої кінцівки 35,8 % хворих у зв'язку з декомпенсацією кровообігу була проведена ампутація єдиної кінцівки [8].

Досить часто, коли можливості консервативного лікування і непрямих методів реваскуляризації, як правило, вже вичерпані, необхідна артеріальна реконструкція, яка часто неможлива або технічно дуже складна внаслідок мультифокального ураження судин, а вогнища деструкції на стопі створює вкрай високий ризик розвитку післяопераційних гнійних ускладнень, у тому числі інфікування судинних трансплантатів [5, 41].

Незалежні дослідження, проведені в Швеції, Данії та Фінляндії, показали, що частота великих ампутацій, виходячи з великих популяційних або національних реєстрів, варіює від 120 до 500 на 1 млн жителів у рік. Досить високим залишається і відсоток смертей: у ранньому післяопераційному періоді при трансметатарзальній ампутації стопи він досягає 5,6 %, при ампутації гомілки – 5–10 %, стегна – 15–20 % [24, 25, 26]. Ампутація на рівні стегна призводить хворого до глибокої інвалідності, тільки 30,3 % пацієнтів після подібної операції успішно користуються протезом (після ампутації на рівні гомілки 69,4 %).

Фізіологічні зміни в організмі інваліда призводять до того, що пацієнти часто назавжди випадають з повсякденного ритму життя, втрачають роботу, коло спілкування, що, поряд з фізичним, доставляє моральні страждання, пов'язані з втратою колишнього повноцінного світ. Висока частота захворювань судин з їх важкими ускладненнями, величезна вартість

проведеного лікування визначають значну медико-соціальну значимість даної проблеми [8, 11].

Вживання і тривалість життя хворих, які перенесли ампутацію, залежить як від характеру соматичної патології, так і від соціальних умов. Тривалість життя оперованих коливається від декількох днів після виписки до 9-ти років (в середньому 25 міс), пік смертей припадає на 2-й рік після ампутації [7].

Отже, наведені дані літератури однозначно свідчать, що ішемія нижніх кінцівок визнається одним з провідних факторів виникнення та прогресування негативних результатів лікування пацієнтів. Це спонукає до перегляду діагностично-лікувальної тактики у відношенні до таких пацієнтів, що може скласти нові підвалини для створення ефективних методів лікування хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок, прогнозування клінічного перебігу.

1.2. Діагностика та методи хірургічного лікування ішемії на фоні мікроциркуляторних розладів нижніх кінцівок

У наш час більшість авторів висловлюються про безперспективність консервативних методів як самостійної терапії для лікування хронічної ішемії нижніх кінцівок, особливо у хворих з важким ступенем хронічної артеріальної недостатності, так як вони не можуть у більшості випадків вирішити проблему термінальної ішемії кінцівки [2, 8, 14, 17].

Традиційна консервативна терапія, до якої входять антикоагулянти, реологічні препарати та ангіопротектори, виявляється не досить ефективною і супроводжується втратою кінцівки у 37 % хворих протягом 1-го року [4, 80]. Однак адекватна реваскуляризація артеріального русла нижніх кінцівок на практиці можлива лише у 37,3–58 % пацієнтів (ICAI Study Group, 2000). Останнє пов'язано із сумнівним успіхом ізольованої хірургічної реваскуляризації у пацієнтів із багаторівневим типом атеросклеротичного ураження. Згідно з дослідженнями низки авторів, консервативне лікування

хронічної ішемії нижніх кінцівок малоефективне, і протягом першого ж року 20–30 % хворих помирає або втрачає одну, а в наступних 2–3 роки — обидві ноги [81, 82].

Значна кількість хворих (12–86,4 %) мають мультифокальні ураження. У 60–80 % пацієнтів із множинними і дистальними формами патології розвивається тяжка ішемія, що призводить до ампутацій кінцівки в 10–20 %. Смертність після первинної ампутації протягом 2-х років досягає 65 %, а 5-річна виживаність становить лише 40 % [80, 83, 84].

Для зниження кількості ампутацій і поліпшення якості життя все ширше використовуються традиційні ендovasкулярні судинні операції, непрямі методи реваскуляризації, сучасні ангіотропні препарати, а при відсутності можливості зберегти кінцівку проводять комплекс заходів для зниження числа ускладнень і летальних випадків [20, 23].

Особливі труднощі виникають при лікуванні пацієнтів з дистальним типом ураження артерій нижніх кінцівок. Відсутність шляхів відтоку при оклюзії артерій гомілки і стопи є основною причиною неможливості виконання прямих (шунтуючих) реконструктивних судинних операцій та ендovasкулярних ангіопластик через високий периферичний опір та протяжність ураження судинного русла [13, 14, 15]. У таких ситуаціях першорядне значення набувають непрямі методи реваскуляризації нижніх кінцівок, що призводять до стійкої рефлекторної дилатации мікроциркуляторного русла і стимуляції колатерального регіонарного кровообігу [34].

Незадоволеність результатами хірургічного лікування (переважно у хворих з дистальними формами оклюзійних уражень) ініціювало хірургів до розробки нових методів реваскуляризації, таких як поперекова симпатектомія [85, 86, 87, 88, 89, 90], остеотрепанція гомілкової кістки [91, 92, 93, 94], фасціотомія [95, 96, 97, 98, 99], пересадка шкірних клаптів на ніжці [100, 101, 102, 103, 104, 105], артеріалізація венозного русла [106, 107, 108, 109], використання мультипотентних стромальних клітин жирової тканини [110,

111, 112, 113, 114, 115], аутотрансплантація аспірата кісткового мозку [116, 117, 118, 119, 120], у тому числі аутотрансплантація на нижню кінцівку васкуляризованих тканин з інших ділянок тіла. З цією метою використовувався великий чеpecь [121, 122, 123, 124, 125]. Мікросудинну трансплантацію великого сальника вперше запропонували Goldsmith і Alday в 1967 році. Таке втручання деякий час було операцією вибору при атеросклеротичному ураженні дистальних відділів, у тому числі, у хворих на облітеруючий тромбангіт з ураженням артерій стопи зі збереженням однієї або декількох артерій на гомілки [126].

Використання венозного судинного русла для доставки артеріальної крові до дистальним відділам ішемізованій кінцівки привертає увагу хірургів уже більше століття. Ідею такої операції запропонував Francois Frank у 1881 році, якій запропонував накласти анастомоз між стегною артерією і однойменною веною. Результатом цієї операції стала виражена дилатація артеріалізованої вени [127]. У 1902 році вперше бічне сполучення між стегною артерією і веною у пацієнтів з гангреною виконав San Martin A. Однак обидва випадки закінчилися ампутацією [128].

Перше успішне застосування артеріалізації венозного русла провів Julius Wieting у 1908 році, після чого ця проблема стає предметом численних досліджень [129]. Незважаючи на інтенсивність вивчення цієї проблеми, успіх артеріалізації досягався в одиничних випадках, а велика кількість тромбозів пов'язували з наявністю клапанів у венозній системі, перешкоджають ретроградному току артеріальної крові [130, 131, 132].

У 1951 році D. Eemerick Szilagyі, Gilbert D. Jay III опублікували результати 9-ти невдалих спроб накладення анастомозу «кінець в кінець» між поверхневою стегною артерією і однойменною веною [133]. Під час операції проводили вимірювання артеріального тиску і швидкість реверсного кровотоку на різних рівнях. Після проходження через кожен клапан тиск і швидкість кровотоку різко зменшувалася, а артеріальна кров скидалась по колатераліям. У більшості випадків реверсію кровотоку вдавалось отримати

на протязі 25–30 см від артеріовенозного анастомозу, але не далі третього клапана, що було підтверджено агіографічно. Якщо вдавалося зруйнувати найближчий до анастомозу клапан, то ділянка вени з реверсним кровотоком збільшувалася. Автори відзначають, що при такому швидкому падінні артеріального тиску в стеговому сегменті артеріалізованої вени домогтися реверсії кровотоку в капілярах неможливо.

Доцільність операції формування анастомозу між стеговими артерією і веною поставив під сумнів Опель В.А., пояснюючи клінічний ефект, отриманий J. Wieting при артеріалізації вени, не відновленням у ній зворотного потоку крові, а утрудненням венозного відтоку, тобто створенням тих же умов, які мають місце при операції перев'язки підколінної вени, запропонованої Опелем В.А. при «спонтанній гангрені» [134, 135].

Тоді ж була створена теорія про «Редукований кровообіг», в якій стверджувалося, що при перев'язці магістральної артерії кров'яний тиск по всій системі цієї судини різко падає. Розвивається подальша ішемія тканин залежить не тільки від недостатнього припливу артеріальної крові, але і від «надлишкового» відтоку венозної крові, у результаті чого посилюються обмінні порушення. Запропонована ним операція перев'язки підколінної вени усуває невідповідність між припливом і відтоком крові і підвищує тиск у капілярах [136, 137].

Аналіз 93-х цих операцій, проведених у його клініці, а також 96-ти перев'язок вен, виконаних іншими хірургами, показав, що поліпшення розвивається більш ніж у 40% випадків. Опель В. А. вважав перев'язку вени операцією паліативною, найбільш показаною в тих випадках, коли був «більш спокою», але не було ще набряку і гангрені кінцівки (ХАН III ст.). Операція була високо оцінена хірургами і широко застосовувалася при різних стадіях облітеруючих захворювань артерій нижніх кінцівок у поєднанні з іншими видами оперативного лікування (періартеріальна і люмбальна симпатектомії, епінефректомії, резекція трамбованої артерії) [138, 139, 140].

При непрохідності магістральних судин на тлі оклюзивних захворювань артерій нижніх кінцівок утворюються колатералі, в основному, з сусідніх другорядних артерій, м'язових гілок або судин великих нервових стовбурів. Велике значення у розвитку колатералів надається гемодинамічному фактору, який визначається величиною АТ, довжиною колатералів і в'язкістю крові. Значну роль у розвитку колатералів відіграють адаптаційні механізми пристосування тканин до нових умов гемодинаміки. Відновлення властивостей тканин в умовах, що змінилися, випереджає розвиток обхідного кровообігу, а для більш повноцінного його розвитку необхідна відповідність між припливом і відтоком [141]. Тому деякі дослідники також рекомендували проводити перев'язку однойменних вен при ураженні великого артеріального стовбура, так як після перев'язки вени підвищується артеріальний тиск, посилюється кровотік у периферичному відрізьку артерії, швидше відновлюється температура кінцівок. Лігування вени виявляє помітний позитивний вплив на трофічні процеси в тканинах. Досліджуючи хвилинний обсяг крові, впливає після ізольованою перев'язки стегнової артерії і стегнових артерій і вени, виявлено, що після перев'язки стегнової вени хвилинний обсяг крові збільшувався вдвічі, а перев'язка клубової і нижньої порожнистої вени збільшували артеріальний кровотік у 12 разів [142].

До основних непрямих реваскуляризуючих операцій належать поперекова і паравазальна симпатектомії, остеотрепанация. Реваскуляризуюча остеотрепанация вважається альтернативою ампутації. Реваскуляризуюча остеотрепанация може виконуватися самостійно або ж у поєднанні з реконструктивними втручаннями. Про хороший клінічний ефект поперекової симпатектомії, реваскуляризуючої остеотрепанации окремо і в поєднанні повідомляють окремі автори [1, 34].

Ідея впливати на нервові симпатичні сплетення хірургічним шляхом для усунення судино-звужуючого впливу вперше знайшла своє відображення в 1900 році в операції періартеріальній симпатектомії, виконаної Jabouley, який

перетнув усі нервові гілки, які підходять до стегнової артерії протягом 10–15 см [143]. У 1917 році цю операцію видозмінив Lerich, який замість перетину нервів, запропонував видаляти адвентицію артерії протягом 2–3 см і більше [144].

Широко застосовуються і патогенетично обґрунтованим методом лікування при ураженні артерій нижче пахової зв'язки є поперекова симпатектомія, яка впливає на регулятор тону судин – симпатичну нервову систему.

Вважають, що збільшення кровонаповнення кінцівки після поперекової симпатектомії обумовлено зниженням периферичного опору судинного русла в післяопераційному періоді за рахунок ліквідації спазму артерій ураженої кінцівки [145, 146, 147, 148].

Ефективність її досить висока, однак у важких стадіях захворювання вона може призводити до прогресування ішемії кінцівки, надаючи короточасний безпосередній ефект і визначаючи незадовільні віддалені результати.

Важливим аспектом будь-якого оперативного втручання є техніка його виконання. У цьому питанні поперекова симпатектомія є класичним прикладом крайніх варіантів виконання операції від максимально об'ємних до пункцій. Традиційний доступ до поперекового симпатичного стовбура (трансперитонеальна методика по Adson-Brown) є досить травматичним. Наявність великого розрізу в довжину від 15 до 18 см супроводжується перетинанням м'язів черевної стінки, розтином на великій відстані заднього листка парієтальної очеревини, мобілізація товстої кишки з метою видалення гангліонарного симпатичного ланцюжка на рівні L2–L3 та перетворюється у велику операцію, що загрожує нагноєнням рани, парезом кишечника, розвитком заочеревинної гематоми.

Позаочеревинний доступ по Робу для виконання поперекової симпатектомії передбачає бічний розріз з перетином або ретракцією м'язів черевної стінки [149], є менш травматичним і найбільш часто

використовується хірургами для «відкритого» доступу до симпатичного стовбура.

Пошук альтернатив травматичного оперативного втручання для виконання десимпатизації судинного русла нижніх кінцівок проводиться за кількома напрямками. Перший з них – виконання черезшкірної хімічної поперекової симпатеکتомії [150, 151, 152, 153].

Розвиток лапароскопічної хірургії визначив появу іншого напрямку – відеоендоскопічної екстраперитонеальної поперекової симпатеکتомії [154, 155, 156, 157]. Упровадження цієї методики розширює можливості операції у осіб похилого та старечого віку, що мають, як правило, високий операційний ризик. Однак порівняльні дослідження їх з відкритою операцією за кількома критеріями (часу анестезії та операції, кількості ускладнень і термінів перебування в стаціонарі) не доводять визначених переваг відеоендоскопічних втручань.

Довгий час використовували й інші методи непрямой реваскуляризації при дистальних ураженнях артерій нижніх кінцівок. Так, трансплантація клітин жирової тканини ускладнюється через тривалий та складний процес заготівлі й культивування [42, 44, 158], а використання клітин кісткового мозку дещо обмежене у зв'язку з високою травматизацією при заборі трансплантата, низьким рівнем активності та диференціації дорослих мезенхімальних клітин [46, 49, 50]. Крім того, ембріональні стовбурові клітини мають ряд юридичних, моральних, релігійних та етичних аспектів, пов'язаних з їх застосуванням для медичних цілей [51].

Розробка нових способів непрямой реваскуляризації і тактики консервативних методів лікування значно розширила можливості лікування хворих з оклюзійними захворюваннями судин нижніх кінцівок, тому в останні роки метою багатьох досліджень стало вивчення можливості нормалізації кровообігу нижніх кінцівок шляхом стимуляції ангиогенезу – процесу розвитку капілярної мережі від вже існуючих судин [159, 160, 161, 162, 163]. Оскільки ендогенної експресії проангіогенних факторів при

тривалій ішемії, як правило, буває недостатньо для розвитку колатеральних судин, необхідна екзогенна стимуляція, що і є завданням терапевтичного ангиогенезу [164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171]. З цією метою використовуються власне ангиогенні фактори, гени, які їх кодують, і клітини-попередники (клітини кісткового мозку, ембріональні клітини, скелетні, міобласти). У наш час ведуться порівняльні дослідження ефективності різних видів стимуляторів, комбінацій стимуляторів, способів введення [172, 173, 174]. Успішні доклінічні дослідження і багатообіцяючі результати клінічних випробувань створили основу для серйозних надій на те, що ангиогенез стане ще одним перспективним напрямком у лікуванні хронічної ішемії нижніх кінцівок як самостійний метод або в поєднанні з іншими методиками [175, 176].

Дослідження ангиогенезу і пошук факторів, що впливають на нього, були розпочаті J. Volkman [177] ще в середині 70-х років. Пізніше ним були виділені білкові ангиогенні чинники, тобто фактори, що стимулюють ріст кровоносних судин [178, 179]. У даний час відомо кілька десятків таких факторів, з яких в дослідженнях найбільш обговорюваними з точки зору клінічного використання при ішемії нижніх кінцівках є фактор росту ендотелію судин (VEGF), фактор росту фібробластів (FGF) і ангиогенін (ANG). У цілій низці досліджень показано роль цих факторів на ангиогенез, що виникає у відповідь на гіпоксію тканин [181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189]. Піонером у використанні даної методики в лікуванні ішемії нижніх кінцівок був J. Isner (США), який у 1994 році продемонстрував позитивний вплив введеного гена VEGF у формуванні колатеральних судин на тваринних моделях критичної ішемії, а потім у 1996 успішно застосував ген, який кодує синтез VEGF, для лікування пацієнтів з ішемією нижніх кінцівок [181, 190, 191, 192]. У подальшому аналогічні результати були отримані і іншими авторами: I. Baumgartner, S. Rajagopalan et al. [187, 193].

Отже, представлені методи консервативного та хірургічного лікування хронічної ішемії нижніх кінцівок вкрай різноманітні. Вони відрізняються

залежно від патогенезу захворювання, механізмами дії, швидкістю настання ефекту від лікування та іншими характеристиками. З'являються все нові й нові способи лікування ішемії, що свідчить про актуальність цієї проблеми і про відсутність ефективних методів лікування.

Отож, незважаючи на подальший розвиток судинної хірургії, багато питань, пов'язаних з методами лікування хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок, залишаються невирішеними. Якість лікувальних заходів, як і раніше, залежить від профілю лікувального закладу, наявності в ньому відділення хірургії судин, суб'єктивного ставлення лікарів до тих чи інших методів лікування, їх знань і досвіду в цій галузі. Тому для вирішення даних проблем, підвищення якості лікування і покращення подальшого життя пацієнтів потрібне створення додаткових методів лікування таких хворих.

1.3. Характеристика клітин кордової крові, їх використання при різних захворюваннях

З розвитком медицини з'явилася можливість застосування нових технологій у лікуванні багатьох важких захворювань різного генезу. В основі замісної терапії лежить клітинна трансплантація і використання унікальних властивостей стовбурових клітин організму, їх здатності імплантуватися в зону пошкодженої тканини (хоумінг), диференціюватися, вбудовуватися в склад клітин, уражених патологічним процесом органів або тканин [194].

Стовбурові клітини – це первинні клітини, що можуть самовідновлюватися шляхом поділу клітини (мітозу), а також диференціюватися в досить велику кількість спеціалізованих типів клітин, тобто перетворюватися на клітини різних органів і тканин [194, 195, 196].

Сучасній науці відомі різні джерела отримання стовбурових клітин. Опубліковано величезну кількість доповідей, в яких дослідники і лікарі повідомляють про можливість отримання і використання стовбурових клітин практично зі всіх тканин організму [46, 47, 48, 49, 54, 55, 58, 62, 197]. Однак

при проведенні терапії лікарі віддають перевагу тим джерелам, які можуть дати більшу кількість стовбурових клітин з високою здатністю до поділу і диференціювання, а також більшою ймовірністю приживлення клітин в організмі, від чого залежить ефективність лікування [53, 57, 197, 198].

Усі стовбурові клітини можна розділити на три основні групи, залежно від джерела їх походження:

– ембріональні стовбурові клітини (плюрипотентні). Вони утворюють внутрішню клітинну масу, або ембріобласт, на ранньому етапі розвитку ембріона та, що дуже важливо, не експресують HLA (human leucocyte antigens), тобто не виробляють антигени тканинної сумісності. Одним з їх основних недоліків є неможливість використання аутогенного матеріалу при трансплантації, оскільки виділення ембріональних стовбурових клітин з ембріона несумісне з його подальшим розвитком [199, 200];

– фетальні стовбурові клітини. Вони містять мультипотентні та уніпотентні стовбурові клітини. Їх отримують із матеріалу плодів після абортів [201]. Ці клітини вже почали диференціювання, отже, кожна з них може пройти тільки обмежене число поділів та дати початок не будь-яким, а певним видам спеціалізованих клітин. Однак використання в дослідженнях як фетальних, так і ембріональних стовбурових клітин завжди викликає етичні, політичні, моральні та емоційні суперечки серед різних категорій населення [202];

– постнатальні стовбурові клітини. Незважаючи на те, що стовбурові клітини зрілого організму мають меншу потентність, у порівнянні з ембріональними та фетальними стовбуровими клітинами, етичний аспект їх дослідження і застосування не викликає серйозної полеміки. Крім того, можливість використання аутогенного матеріалу забезпечує ефективність і безпеку лікування. Стовбурові клітини дорослого організму можна поділити на три основні групи: гемопоетичні (кровотворні), мультипотентні мезенхімальні (стромальні) і тканинспецифічні прогеніторні клітини [202, 201, 202].

Іноді в окрему групу виділяють клітини кордової (пуповинної) крові, оскільки вони є найменш диференційованими з усіх клітин дорослого організму [203, 204].

Кордова кров в основному містить гемопоетичні стовбурові клітини, а також мультипотентні мезенхімальні, проте в ній присутні й інших різновидів стовбурових клітин, котрі при певних умовах здатні диференціюватися в клітини різних органів і тканин [202].

Кордова кров відіграє важливу роль у розвитку дитини. Вона циркулює по судинах плаценти та пуповини, забезпечуючи майбутнього малюка киснем і необхідними поживними речовинами [205]. Кордова кров збирається після народження дитини. Це безпечна, технічно нескладна процедура, що не несе загрози здоров'ю матері та дитини та не вимагає загальної анестезії при зборі. Залежно від ваги новонародженого, строку, на якому відбулися пологи та певних особливостей здоров'я матері, можливо зібрати від 40–50-ти мл до 140–150-ти мл крові.

Кордова кров має безліч переваг, у порівнянні з іншими джерелами стовбурових клітин. Це порівняно низька вірогідність розвитку гострої або хронічної реакції “трансплантат проти хазяїна”, а також розширення пулу донорів за рахунок толерантності при 1–2 HLA-несумісності з 6-ти можливих (більше число несумісності пов'язане з меншою імовірністю приживання) [58, 206, 207].

Більше того, вона розглядається як основне джерело стовбурових клітин внаслідок збільшення щорічної народжуваності, що, за даними ООН, становить 140 мільйонів населення за 2020 рік [208]. Кордову кров легко та безпечно збирають і зберігають у якості майбутнього терапевтичного генетичного матеріалу [209].

Також існує менший ризик передачі латентних вірусних інфекцій від донора до реципієнта та висока частота знаходження рідкісних гаплотипів для представників етнічних меншин, оскільки перед забором кордової крові породілям проводять клінічні та лабораторні тестування [206].

Останнім часом кордова кров розглядається як хороша альтернатива ембріональним стовбуровим клітинам, оскільки доведено, що в її складі міститься популяція мультипотентних стовбурових клітин, які здатні диференціюватися на різні типи клітин, включаючи епітеліальні, ендотеліальні, м'язові і нервові [52, 163, 167, 195, 210].

Дослідники виявили ще одну властивість кордової крові. Здатність до ділення стовбурових, що у її складі, у 8-10 разів вища, ніж у аналогічних клітин, виділених із кісткового мозку дорослої людини [206].

Кордова кров є відмінним джерелом для утворення індукованих плюрипотентних клітин. У її складі міститься близько 70-ти видів біологічно активних речовин і фетальних факторів росту [207], близько 40 % моноцитів (попередників макрофагів) та лімфоцитів, 10 % нейтрофілів і інших типів лейкоцитів. Решту становлять стовбурові клітини і клітини-попередники, включаючи кластер диференціації CD34 + ендотеліальні клітини-попередники, CD133 + мультипотентні стовбурові клітини і CD105 + мезенхімальні стовбурові клітини [211].

Завдяки унікальним властивостям, відносній простоті й безпеці їх заготівлі на сьогоднішній день кордова кров стала одним з найбільших прийнятних джерел гемопоетичних стовбурових клітин у багатьох країнах світу [206]. Повідомлення про проведення першої трансплантації стовбурових клітин кордової крові було опубліковано ще в 1972 р. в американському медичному виданні *Virginia medical monthly*. При лікуванні 16-річного хлопчика з гострою лімфобластичною лейкемією вводили гемопоетичні стовбурові клітини кордової крові. При трансплантації використовували 8 донацій кордової крові від HLA-несумісних донорів. Протягом 18-ти діб проводили підсадки, і тільки одна з них призвела до стану повної ремісії до наступного курсу процедур, призначених через 9 міс. [212]. Пізніше, в 1982 р, група американських дослідників на чолі з Н. Е. Врохтмеуер з Індіанського університету (Індіанapolis, США) показала пріоритетність збору і використання клітин кордової крові сибсів при

трансплантації дітям з онкологічними захворюваннями крові [213]. У 1989 р Gluckman і співавт. опублікували роботу, в якій представили результати лікування анемії Фанконі у п'ятирічного хлопчика з позитивним і довгостроковим ефектом ремісії після введення тільки одноразової дози кордової крові від його новонародженої сестри [214]. Саме з цього моменту настав період осмислення і оцінки результатів використання стовбурових клітин кордової крові, виникло прагнення лікарів і дослідників простежити терапевтичний ефект більшої кількості і генезу захворювань, а також почало формуватися соціальна думка про значущість збору і зберігання даних.

До кінця 2013 року у світі проведено більше 30000 трансплантацій стовбурових клітин кордової крові [215] З метою забезпечення систематичної заготівлі гемопоетичних стовбурових клітин кордової крові для тривалого кріозберігання і використання їх у клінічній практиці було створено 160 успішно функціонуючих банків пуповинної крові, в яких на кріозберіганні знаходиться більше 600 000 тестованих концентратів кордової крові [216, 217].

Світова наука дала багато доказів ефективності застосування стовбурових клітин у лікуванні багатьох захворювань, зокрема, хвороб серцевосудинної системи. Експериментальні дослідження показують, що високоселективні гемопоетичні стовбурові клітини, якими багата кордова кров, сприяють відновленню міокарда шляхом васкуляризації, зниження апоптозу та стимуляції кардіоміогенезу [218].

Німецькими вченими доведено, що продукцію та кількість циркулюючих у периферичній крові клітин-попередників ендотеліоцитів, з яких, власне, утворюються судини та основні структури серця, підвищує фізична активність [219].

Схоже дослідження у 2008 р. опубліковано в журналі «J. Appl. Physiol.» японськими вченими [220]. А в «British J. Sports Medicine» у 2007 році опублікована робота, яка доводить, що після фізичних навантажень достовірно зростає здатність мезенхімальних стовбурових клітин до міграції [221].

Британські вчені пов'язують це з тим, що м'язові клітини, скорочуючись, виділяють у системний кровообіг IL-6, що стимулює дозрівання стовбурових клітин.

У кардіології навіть виник новий терапевтичний напрямок – клітинна кардіоміопластика, показами до якої є інфаркт міокарда, ідіопатична дилатаційна кардіоміопатія, діабетична кардіоміопатія, хвороба Чагаса (трипаносомоз), ішемічна мітральна регургітація, кардіоміопатія в дітей [222, 223].

На основі мезенхімальних стовбурових клітин, а також гемангіобластів, виділених з кордової крові, базуються підходи тканинної інженерії до вирощення клапанів серця і біоштучного міокарда [224].

У світі щонайменше сім центрів працюють над вирощуванням клапанів серця зі стовбурових клітин, зокрема виділених з пуповинної крові. Уже є дані про імплантацію такого клапана у кролів з їхньої власної тканини (Японія, університет м. Осака). Процес вирощування 12-експериментальних клапанів тривав 4-6 тижнів. Лабораторні дослідження підтвердили хорошу функціональну здатність цих клапанів [225]. За твердженням д-ра Ralph Sodian, керівника проекту з вирощування зі стовбурових клітин пуповинної крові клапанів серця (Німеччина, Мюнхен) – тканинна інженерія перспективна щодо створення ідеального протеза клапана серця, який функціонуватиме все життя, ростиме з реципієнтом і набуватиме потрібної форми.

З 2009 року в Україні реалізується програма, спрямована на надання допомоги новонародженим дітям із вадами серцево-судинної системи, які діагностовано внутрішньоутробно. Разом із кардіохірургами розроблена методика уведення стовбурових клітин, отриманих із пуповинної крові, при оперативному лікуванні вад серця в дітей [225]. Методика, яка використовується для лікування дітей, уперше розроблена та введена українськими кардіохірургами [226].

Хірургічні операції проводяться в перші години життя дитини [227]. Проводяться доклінічні випробування на тваринах. Клапани серця, вирощені з власних стовбурових клітин, позбавлять дітей, хворих на вади серця, від повторних операцій із заміни клапана в міру того, як росте серце [228].

Розповсюдженість цукрового діабету становить близько 4–5 % серед усього населення, а в осіб, старших 65-ти років – 10–15 % і подвоюється через кожні 10–15 років. Проте ефективних методів лікування цього захворювання поки що не розроблено. У зв'язку з цим науковці досліджуються галогенні і ксеногенні культури клітин острівців Лангерганса, стовбурові клітини кісткового мозку і кордової крові. Регенеративна терапія панкреатичних β -клітин може поєднуватися з іншими терапевтичними напрямками, котрі включають трансплантацію панкреатичних острівців, клітинну, генну і медикаментозну терапію, а також неогенез [229, 230].

Трансатлантична бригада вчених університету Ньюкасла і Техаського університету зі стовбурових клітин кордової крові виростили людську тканину, яка продукує інсулін. А дослідники з Флоридського університету вперше показали, що внутрішньовенне уведення власної кордової крові призводить до зниження потреби в інсуліні дітей, хворих на цукровий діабет, поліпшує функціональні показники імунної системи. Таке ж дослідження проходило в Північно-західному університеті в Чикаго [231].

В Україні також проводилися дослідження в цій галузі. Отримані результати вказують на доцільність трансплантації культур клітин підшлункової залози і ГСК для корекції ЦД 1-го типу. Крім того, встановлено, що трансплантація ГСК призводить до повного гальмування розвитку мікроангіопатії за умов експериментально змодельованого цукрового діабету [232].

Повідомляється про здатність стовбурових клітин пуповинної крові захищати нейрони. Група вчених з Інституту психіатрії в Лондоні продемонструвала, що протягом семи днів реально заповнити порожнину, яка залишилася в мозку після інсульту, новою тканиною, вирощеною зі

стовбурових клітин пуповинної крові. Стівбурові клітини допомагають достатньо швидко відновити втрачені функції. Адже сьогодні інсульт вважається невиліковним і непередбачуваним захворюванням [225, 233].

На 18-й зустрічі Європейської Неврологічної спілки в м. Ніцца висвітлені успішні результати 10-річного дослідження, у ході якого вивчалася ефективність імуносупресивної терапії і трансплантації гемопоетичних стівбурових клітин кордової крові при лікуванні розсіяного склерозу [234].

Дослідження з вивчення ефективності лікування дитячого церебрального паралічу власною кордовою кров'ю проводяться в Duke University, США [235]. Також за допомогою стівбурових клітин успіхів у лікуванні ДЦП і ряду інших захворювань нервової системи в дітей досягли вчені Петербурзького НДІ нейрохірургії ім. Полєнова [236].

Операції з використанням стівбурових клітин у ортопедії проводять у Лодзі (Польща). У Йоркському університеті запущено проект, розрахований на три роки, мета якого – розробити кісткові клітини зі стівбурових клітин пуповинної крові [225].

В останнє десятиліття з'явилися чисельні публікації щодо успішного застосування стівбурових клітин у лікуванні погіршення та втрати зору при діабеті, глаукомі, уроджених вад зору, пігментному ретиніті, атрофії зорового нерву, дегенерації сітківки, опіках очей. Про особливі успіхи в лікуванні уроджених вад зору з використанням кордової крові повідомляють китайські вчені. Ученими з Університету Нового Південного Уельса (Австралія) створено спеціальні контактні лінзи зі стівбуровими клітинами для лікування прогресуючого погіршення зору, викликаного ураженням рогівки [237].

Трансплантація стівбурових клітин, у тому числі кордової крові, широко застосовується у випадку лікування ряду природжених імунодефіцитів [238].

Після розвитку противірусних препаратів для лікування СНІДу вчені налаштовані застосувати іншу зброю – стовбурові клітини. Відомо, що ВІЛ уражає декілька типів клітин крові, котрі є частиною імунної системи. Якщо захистити стовбурову кровотворну клітину, від якої походять решта клітин крові, то всі клітини будуть захищені. За допомогою поєднання клітинних технологій та генетичної інженерії науковці намагаються створити у хворих "паралельну імунну систему", яка зможе боротися з хворобою [52, 225, 228].

Гемопоетичні стовбурові клітини часто застосовуються з метою відновлення кровотворення після радикальної хіміо- та радіотерапії, при лікуванні гемобластозів, великих пухлин і тяжких форм системних запальних захворювань сполучної тканини (ревматоїдного артриту, системної склеродермії, системного червоного вовчача та ін.) [52, 225]. З метою лікування злоякісних захворювань вивчаються клітини – натуральні кілери, виділені з пуповинної крові [239].

Крім лікування гемобластозів, трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин є основним методом терапії апластичних анемії, променевої хвороби. Щорічно у світі народжується біля 300 000 хворих на таласемію і серпоподібноклітинну анемію, яких може врятувати лише трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин. Саме при лікуванні серпоподібноклітинної анемії в дітей вже напрацьований успішний досвід застосування стовбурових клітин пуповинної крові [240].

Певний досвід клінічного застосування стовбурових клітин кордової крові вже є на базі Інституту нейрохірургії імені А. П. Рамаданова НАМН України, де у 2009–2010 рр. шестирічному хлопчику з м'язовою дистрофією Дюшена провели два курси терапії стовбуровими клітинами кордової крові, яку зібрали під час народження його молодшої сестри [241].

У фаховій літературі з'являється дедалі більше повідомлень про отримання зі стовбурових клітин кордової крові клітин легеневої тканини, котрі можна використовувати при відновлювальній терапії захворювань органів дихання: емфіземи легень, хронічного бронхіту, бронхіальної астми

(у програмі імуносупресивної терапії з подальшою трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин), фіброзу та травматичного пошкодження легень [242].

Канадські вчені запатентували метод запобігання кисневому пошкодженню легень у недоношених дітей із використанням власних стовбурових клітин пуповинної крові. Пересаджені стовбурові клітини вбудовувалися в тканину легневих альвеол та експресували білок С сурфактанта, що вказує на можливість їх диференціації в альвеолярні пневмоцити II типу [243].

Стовбурові клітини можуть знайти клінічне застосування для відновлення печінки пацієнтів, котрі страждають хронічною печінковою недостатністю чи гострим порушенням її функції. Багато досліджень вказує на ефективність стовбурових клітин крові пуповини в лікуванні цирозу печінки [244].

Відомо, що однією з основних причин захворюваності і смертності населення в розвинених країнах в останні десятиліття є патології системи кровообігу. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), щорічно в світі від хвороб серцево-судинного генезу помирають близько 17 млн. чоловік, що складає близько 29 % від усіх випадків смерті у світі [7].

Узагальнюючи дані цього розділу, можна зазначити, що зростання рівня захворюваності та смертності обумовлених серцево-судинними подіями, спонукає до пошуку оптимальних методів профілактики та лікування пацієнтів з даною нозологією. Одним з таких методів може стати терапевтичний ангиогенез, заснований на тактиці стимуляції утворення нових кровоносних судин для лікування або профілактики патологічних станів, що характеризуються зниженням рівня кровопостачання. Потреба в терапевтичному ангиогенезі особливо велика у випадках хронічної ішемії нижніх кінцівок, ішемічної хвороби серця, інфаркті міокарда, при яких хірургічні методи лікування недостатньо ефективні.

В останні кілька років кількість робіт, присвячених вивченню властивостей стовбурових клітин кордової крові значно зросла. Накопичено великий масив даних, що стосуються ефективності виділення первинної культури з пуповини, її проліферативних властивостей, стабільності каріотипу, особливостей транскриптома і секретома.

У той же час вкрай суперечливі дані, що стосуються взаємодії стовбурових клітин кордової крові з ендотеліальними клітинами *in vitro* (впливу на проліферацію та міграцію, поведінки при моделюванні ангіогенезу в матриці базальної мембрани і т.д.), і тільки в деяких роботах обговорюється роль фактора росту ендотелію судин – VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Умови і кінцевий результат диференціювання стовбурових клітин кордової крові в ендотеліальному напрямку також різняться у окремих груп дослідників.

Отже, даний напрямок використання клітин кордової крові завдяки їх здатності диференціюватися, вбудовуватися в склад клітин, уражених патологічним процесом, та як наслідок стимуляції ангіогенезу з можливим моделюванням капілярного русла, потребує подальшого вивчення для можливого використання у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Законодавча база для проведення експериментального дослідження

Законодавство України про трансплантацію базується на Конституції України та складається з Основ законодавства України про охорону здоров'я, інших законодавчих актів, що регулюють відносини з питань, пов'язаних з охороною здоров'я цього Закону та інших прийнятих відповідно до них нормативно-правових актів. Закон України №1007–14 від 16.07.1999 року «Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людині», який дозволяє практичне використання анатомічного матеріалу після проведення клінічного випробування, відповідно до Постанови Кабінету Міністрів України №1100 від 5 вересня 2007 року «Про заходи щодо організації діяльності закладів охорони здоров'я та наукових установ пов'язаної з трансплантацією органів, тканин і клітин», втратив свою чинність на підставі закону України № 2427-19 від 17.05.2018 "Про застосування трансплантації анатомічних матеріалів людині". Цей Закон з урахуванням сучасного стану науки і рекомендацій Всесвітньої організації охорони здоров'я визначає умови і порядок застосування трансплантації як спеціального методу лікування, забезпечує додержання в Україні прав людини та захист людської гідності при застосуванні трансплантації та здійсненні іншої, пов'язаної з нею діяльності.

Діяльність, пов'язану з трансплантацією, можуть здійснювати акредитовані в установленому законодавством України порядку державні та комунальні заклади охорони здоров'я і державні наукові установи за переліком (695-2000-п), затвердженим Кабінетом Міністрів України.

ОКНП "Чернівецька обласна клінічна лікарня", на базі якої виконано роботу, входить до переліку державних та комунальних закладів охорони здоров'я і державних установ, які мають право проводити діяльність,

пов'язану з трансплантацією органів та інших анатомічних матеріалів людині згідно постанови Кабінету Міністрів України № 695 від 24 квітня 2000 року в редакції постанови кабінету Міністрів України № 164 від 18 лютого 2006 року «Деякі питання реалізації Закону України «Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людині», Відповідно до Закону України "Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людині", Конвенції про захист прав і гідності людини у зв'язку з використанням досягнень біології і медицини та постанови Кабінету Міністрів України від 05.09.2007 N 1100 «Про заходи щодо організації діяльності закладів охорони здоров'я та наукових установ, пов'язаної з трансплантацією органів, тканин і клітин» порядок проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань чітко регламентується наказом МОЗ України №630 від 10.10.2007 року «Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань й унесення змін до Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань, затвердженого наказом Міністерства охорони здоров'я України від 13.02.2006 N 66, зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 10.03.2006 за N 252/12126». Цей Порядок установлює основні вимоги до проведення клінічних випробувань трансплантації тканин і клітин в Україні. Він поширюється на всі види клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів, у тому числі стовбурових клітин кордової (пуповинної) крові, й передбачає проведення доклінічного експериментального дослідження на лабораторних тваринах з метою визначення ефективності та безпеки клітинної трансплантації.

Комісія з питань біомедичної етики ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет» МОЗ України (м. Чернівці) встановила, що дослідження проводиться з дотриманням основних положень Ухвали Першого національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи

експериментів на тваринах» (2001 р.), ICH GCP (1996 р.), Конвенції Ради Європи про права людини, біомедицину (від 04.04.1997р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях (від 18.03.1986 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2013 рр.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.

2.2. Характеристика та методика проведення експериментального дослідження

Дисертаційне дослідження містить дві частини: експериментальну та клінічну. Експериментальне дослідження проведено на базі кафедри хірургії №1 Буковинського державного медичного університету. Його метою було вивчення впливу трансплантації клітин кордової крові на процеси ангіогенезу у тварин із змодельованою ішемією кінцівки. У якості дослідних тварин ми використали 30 білих нелінійних щурів, що утримувались при кімнатній температурі, на звичайному лабораторному раціоні. Маса тіла дослідних щурів становила в середньому ($240,4 \pm 4,56$) г, вік – ($6 \pm 1,2$) місяці. Усі експериментальні оперативні втручання проводились під кетаміновим знеболенням із збереженням умов асептики та антисептики.

Експериментальні тварини були поділені на 2 групи, розподіл наведено в таблиці 2.1.

Моделювання ішемії задньої кінцівки щура проводилось за методом Т. А. Князевої у модифікації О.М. Горбатюка, згідно з якою ішемії досягали шляхом накладання двох лігатур із капронової нитки навколо судинної ніжки, що кровопостачає тканини кінцівки, на відстані 1 см одна від одної (рис. 2.1). Застосована експериментальна модель ішемії кінцівки є простою, доступною щодо виконання, дозволяє об'єктивно оцінити характер ішемічного ураження м'язової тканини за допомогою лабораторних,

інструментальних та інших методів дослідження.

Таблиця 2.1

Розподіл дослідних тварин по групах

Група	Характеристика групи
I	Тварини, яким виконано моделювання ішемії кінцівки (n=15)
II	Тварини, яким на фоні змодельованої ішемії кінцівки трансплантовано клітини кордової крові (n=15)



Рис. 2.1. Моделювання ішемії задньої кінцівки у дослідних щурів.

Для поглиблення ішемічних явищ у кінцівці одночасно перев'язували стегнову артерію, вену та нерв вище місця відходження а. circumflexa femoris lateralis (рис. 2.2). Рану пошарово ушивали.

Схематично представлено рівень та місця перев'язки судинно-нервового пучка для моделювання ішемії кінцівки щура.

За даними авторів, перші прояви ішемічного стану фіксували на 2-3-ю добу після моделювання.

У якості трансплатату використовували кріоконсервовану суспензію, що містить клітини кордової крові, яку отримували з банку пуповинної крові ТОВ «Інститут клітинної терапії» та доставляли з супроводжувальною

документацією автомобілем ТОВ «Інститут клітинної терапії» експедитором в ємкостях Дьюара при температурі $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

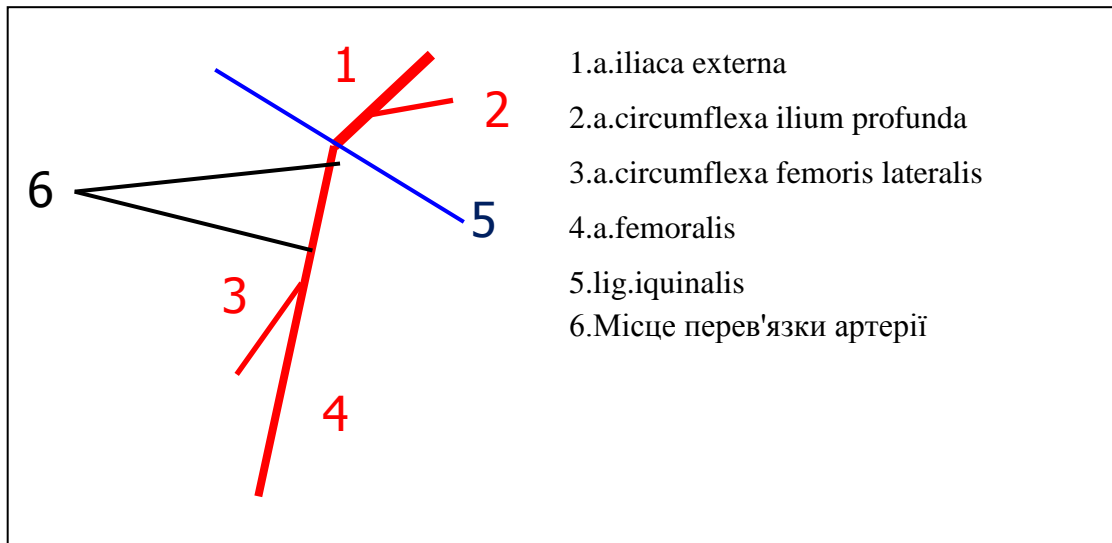


Рис. 2.2. Схема перев'язки магістральної артерії задньої кінцівки щура.

Доза введення клітинної суспензії щурам основної групи становила $1\pm 0,1$ мл одній тварині, у якому містилося 0,18 мл клітин кордової крові, 0,01 мл гепарину та 0,8 мл фізіологічного розчину. Клітинний трансплантат вводили в ішемізовані кінцівки на 3-ю добу після експериментального моделювання ішемії (рис. 2.3), підфасціально, тонкою смужкою на медіальній та латеральній поверхні стегна задньої кінцівки.



Рис. 2.3. Уведення клітин кордової крові в м'язову тканину стегна лабораторним щурам.

Контрольній групі тварин вводили 0,9% фізіологічний розчин у дозі 1 мл підфасціально, тонкою смужкою на медіальній та латеральній поверхні стегна задньої кінцівки на 3-ю добу після моделювання ішемії.

Тваринам обох експериментальних груп проводили дослідження функціональних параметрів з визначенням рухової активності та морфологічним дослідженням тканин зони ішемії.

Після моделювання ішемії всім щурам проводили визначення функціонального стану м'язової системи кінцівок шляхом проведення спеціальних тестів за загальноприйнятими методиками. Проби з фізичним навантаженням включали визначення відстані одномоментного пробігу та тест примусового плавання, які проводили на 21–25 доби після моделювання ішемії.

У якості експериментальної моделі використовували Porsolt test (тест Порсолта), який зазвичай називають тест «примусового плавання» (в іноземних джерелах використовуються терміни Forced-swimming test, FST або «Behavioural Despair test») [5]. Устаткування для проведення тесту представляє собою прозорий циліндр діаметром 31 см та висотою 40 см. Циліндр на висоту приблизно 15 см наповнювали водою, температура якої підтримували на рівні 25°C, потім туди поміщали щурів з масою тіла 200–220 г. Для досліду використали 30 щурів. Попередньо, за добу до тестування, кожному тварину опускали в посудину з водою на 5–6 хв для адаптації. У день експерименту щура поміщали в циліндр з водою таким чином, щоб вона не могла ні вибратися з судини, ні знайти в ній опору, тобто не доставала лапами дна. Основним показником виразності стану по даному тесту є тривалість нерухомості, тобто сума епізодів іммобілізації у кожній тварини протягом 6-ти хв спостереження. При проведенні тесту оцінювали час, коли тварина від активних спроб знайти вихід з неприємного становища (занурення у воду і неможливості покинути установку), переходила до нерухомості, «зависання», яке дослідники асоціюють з поведінкою відчаю або так званим «станом втрати твариною надії – безвихідь» [6]. Крім того,

оцінюються спроби активного опору впливу аверсивних факторів, які реєструється за кількістю стрибків і тривалістю активного плавання (ритмічні рухи всіма кінцівками).

У ході експерименту, на 3-5-ту, 7-14-ту, 21-25-ту доби після моделювання ішемії кінцівки, в обох групах тварин виконували забір біопсійного матеріалу (м'язева тканина) з медіальної та латеральної поверхонь стегна на стороні моделювання ураження для проведення гістологічного та імуногістохімічного дослідження.

Керуючись основними положеннями Закону України № 3446-ІУ від 21.02.2006 року "Про захист тварин від жорстокого поводження", після закінчення терміну експериментальних дослідів, виконання функціональних проб та забору біопсійного матеріалу всіх лабораторних тварини виводили з експерименту шляхом передозування наркозу.

2.3. Методика проведення гістологічних та імуногістохімічних досліджень

З метою визначення ефективності використання клітин кордової крові під час експерименту та на клінічному етапі були проведені гістологічні та імуногістохімічні дослідження отриманих біоптатів м'язової тканини ураженої кінцівки. Аналіз біопсійного матеріалу виконували на базі лабораторії патоморфології Буковинського державного медичного університету.

Після надходження біопсійного матеріалу проводили фіксацію фосфатним буфером 10-% водного розчину забуференого формаліну. Для досягнення необхідної фіксації співвідношення тканини до кількості формаліну складало не менше 1:10-20. Період фіксації становив 12–24 годин залежало від періоду поступлення препарату, та температурного режиму.

Наступний етап після фіксації – зневоднення тканини. Його проводили в серії спиртів наростаючої концентрації (від 50 до 96 %), з подальшим заключенням у рідкий парафін. Тканину після дегідратації поміщали в рідкий

парафін для просочення тканин при температурі 55–56 °С. Далі формували з нього квадратні віск-парафінові блоки для зручності використання. З парафінових блоків проводили зрізи на санному мікротомі серії (МС-2). Серійні зрізи (слайди) товщиною 5–6 мкм. наносили на попередньо оброблене предметне скельце. Зайвий парафін видаляли зі зрізу шляхом нагрівання до температури 55–56 °С та фіксували його до скла. На підготовлених зрізах, залежно від потреби, проводили необхідні методики фарбування згідно їх протоколів. Після фарбування отримані мікропрепарати для зменшення впливу оточуючого середовища заключали в розчин полістеролу в ксилолі та покривали покривними скельцями.

Оцінювання отриманих результатів проводили за допомогою мікроскопа Delto Optical Evolution 100 (Польща) з об'єктивом 10^x (планохромт) та окуляром 10^x. За допомогою цифрової фотокамери Olympus SP-550UZ оптичні зображення з мікроскопа переводили в цифрові. Цифрові зображення використовували для вивчення, порівняння та аналізу структур.

Для дослідження зрілості сполучнотканинних волокон та чіткого оптичного орієнтування у структурах тканин було застосовано гістохімічний метод забарвлення "хромотропом 2В" – "водним блакитним" за методикою Н. З. Слінченко (1964). Різниця у фарбуванні сплучнотканинних волокон свідчить про різний ступінь зрілості. Знижена інтенсивність може свідчити як про низьку зрілість, так і про дезорганізацію (розгортання спіральної структури молекули). Особливість до накопичення барвника сполучнотканинними волокнами дала можливість вивчити їх морфологічні особливості відносно розташування. Також дана методика дозволила встановити морфологічну відмінність між сполучнотканинними волокнами з колагеновими волокнами від ділянок з переважанням фібрину.

Використана методика Н. З. Слінченко («хромотроп 2 В» – «водний блакитний») після протравки фосфорно-вольфрамовою кислотою передбачає заливку на предметне скло відфільтрованого розчину гематоксиліну Бомера, терміном до 5–10 хв. Після злиття гематоксиліну назад до колби, зрізи

поміщали у водопровідну воду на 10 хв. та дистильовану воду – 1–2 хв. Далі наносили розчин хромотропу Б2 на 1 хв., після чого ополіскували дистильованою водою. Потім скло поміщали у розчин фосфорно-вольфрамової кислоти до 1 хв і знову ополіскували дистильованою водою. Після забарвлення водним блакитним 2–4 хв скло вміщували у воду, а потім у 70 і 96 % спирт. Після послідууючої підсушки, зрізи вміщували в ксилол до їх прояснення, а потім заключали у бальзам.

Вказане забарвлення за результатами відповідає відомій методиці Меллорі, але, на відміну від останньої, дозволяє адекватно зафарбовувати тканини, фіксовані звичайним способом у формаліні. Після фарбування з'являється можливість візуалізувати волокна сполучної тканини – по чистому блакитному забарвленню різної інтенсивності, фібрин – малиновий колір, еритроцити – яскраво червоні, різні клітини: їх ядра і цитоплазма забарвлюються у відтінки кольорів від блакитного до пурпурового.

Для визначення типу клітин, зокрема ендотеліоцитів, найбільш інформативними є імуногістохімічні технології. Імуногістохімічне дослідження базується на моноклональному типуванні, де завдяки специфічній спорідненості антигена та моноклональних антитіл і утворенні імунокон'югати «антиген-антитіло», що сприймає певний хромогенний субстрат, що дозволяє візуально реєструвати антигенну детермінанту. Тому використання цієї методики дозволяє достатньо ґрунтовно простежити етапи стимульованого ангиогенезу.

У ході проведеного дослідження ми визначали експресію антигенів до фактора Віллебранда та віментину.

Фактор Віллебранда – плазмовий глікопротеїн, що забезпечує адгезію тромбоцитів до колагену в місці пошкодження ендотелію судин. Більшість дослідників сходяться на думці, що основна частина фактора Віллебранда, яка знаходиться в крові, має ендотеліальне походження. Він синтезується ендотеліальними клітинами і мегакаріоцитами. саме тому фактора Віллебранда вибраний нами в дисертаційному дослідженні як маркер

молодих, щойно утворених ендотеліоцитів кровоносних судин (тобто свідчить про наявність активного процесу ангиогенезу).

Віментин – це протеїн проміжних філаментів III типу, що разом з мікрофіламентами (актин) та мікротубулінами (тубулін) бере участь у формуванні цитоскелету. Він також відіграє роль в утворенні агресом – структур, що формуються при появі білків з помилковою третинною структурою, утворюючи клітку навколо. Віментин експресується переважно в мезенхімальних клітинах та є основним компонентом їхнього цитоскелету. Завдяки цьому віментин часто застосовується як маркер клітин мезенхімального походження.

Отже, оскільки вищезазначені фактори є характерними показниками процесів новоутворення судин, були проведені імуногістохімічні дослідження експресії антигенів саме до цих факторів як в експериментальних, так і клінічних групах спостереження.

Імуногістохімічне дослідження проводили за протоколами, рекомендованими виробником реактивів "DAKO", за допомогою наборів реактивів на основі полімерної системи детекції з пероксидазною міткою та візуалізацією за допомогою барвника діамінобензодину. Розведення підбирається в тому діапазоні, який рекомендує фірма-виробник (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Спосіб розведення антитіл

Маркер	Назва антитіл	Розведення
Фактор Віллебранда	Polyclonal Rabbit Anti – Human F8/86	1:40
Віментин	Mouse Anti-Vimentin, clone V9	1:200

Розведення проводилось так, щоб після завершення імуногістохімічної процедури в кожному препараті реєструвались яскраво профарбовані імунопозитивні структури і був відсутній неспецифічно пофарбований фон.

Також обов'язковою умовою для достовірності імуногістохімічного

дослідження було чітко дотримання вимог процесу забарвлення. Технологічний процес обробки зрізів проводився в темній вологій камері при кімнатній температурі. Із парафінових блоків за допомогою апарату "МС-2" виготовляли серійні зрізи 5–6 мкм. У 2-х порціях ортоксилолу по 5 хвилин проводили депарафінування, далі у 2-х порціях 96 % спирту проводили дегідратацію. Після цього готувим розчином (Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Reagent) проводили блокування пероксидази. Демаскування антигенів проводили в мікрохвильовій печі протягом 20 хвилин при 700 мВт у розчині цитратного буфера (pH=6,0). В окремих випадках демаскування проводили на водяній бані із дотриманням температурного режиму 95-98°C протягом 30 хв. Інкубування з первинними антитілами проводили у вологій камері протягом 20 хв, а з вторинними антитілами – протягом 40 хвилин у вологій камері у термостаті при температурі 37°C. Реакцію візуалізації антигенів проводили із використанням системи детекції "UltraVision Quanto Detection System HRP Діамінбензидином – DAB Chromogen" (Thermo Fisher Scientific). Дофарбовували гематоксиліном Маєра.

Інтенсивність забарвлення ендотеліоцитів у судинах мікроциркуляторного русла та окремих скупчень фібробластів обраховували в одиницях відносної оптичної густини. Після порівняння результатів у групах дослідження встановлювали значення, яке найкраще вказувало на відмінність між групами дослідження.

2.4. Характеристика та методика проведення клінічного дослідження

Для проведення клінічної частини дисертаційного дослідження брали участь 46 пацієнтів з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу, які перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні хірургії судин Чернівецької обласної клінічної лікарні.

Ступінь, локалізацію та розповсюдженість ураження артеріального русла

нижніх кінцівок визначали на основі аналізу результатів ультразвукової доплерографії, рентгеноконтрастної ангіографії.

Таблиця 2.3

Перелік реконструктивних оперативних втручань

Назва оперативних втручань	Пацієнти (n=22)
стегново-стегнове алопротезування	4
стегново-стегнове алошунтування	3
стегново-стегнове аутовенозне шунтування	3
стегново-стегнове аутовенозне протезування	5
стегново-підколінне протезування	1
стегново-підколінне шунтування	2
стегново-підколінне аутовенозне протезування	1
стегново-підколінне аутовенозне шунтування	2
стегново-задньовеликогомілкове аутовенозне шунтування	1

Після обстеження у 22-х пацієнтів констатовано наявність локальних ділянок оклюзії артерій нижніх кінцівок та задовільне дистальне русло, що було показом до виконання прямих оперативних втручань. Цим хворим виконано прямі реконструктивні операції (табл. 2.3).

У подальшому клінічному етапі дослідження брали участь 24 пацієнти з облітеруючим атеросклерозом та дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Основну групу дослідження склали 13 пацієнтів, яким виконували трансплантацію клітин кордової крові, з них 10 чоловіків (76,9±11,7 %) та 3 жінки (23,1±11,7 %).

До групи контролю увійшли 11 пацієнтів (9 чоловіків та 2 жінки), яким не проводилась трансплантація клітин кордової крові. Обидві групи отримували курс консервативної терапії (табл. 2.4). Групи були однорідними за статтю ($p=0,37$).

Таблиця 2.4

Гендерний розподіл пацієнтів

Стать	Дослідна група (n=13)		Контрольна група (n=11)	
	Кількість пацієнтів	Кількість пацієнтів, %	Кількість пацієнтів	Кількість пацієнтів, %
Чоловіки	10	76,9±11,7	9	81,8±3,51
Жінки	3	23,1±11,7	2	18,2±3,51

Згідно з віковою класифікацією, запропонованою Всесвітньою організацією охорони здоров'я від 2015 року, до групи середнього віку (45–59 років) належало 69,2±12,8 % пацієнтів, похилого віку (60–74 роки) – 30,8±12,8 % пацієнтів основної групи; у групі контролю пацієнти середнього віку становили 45,5±4,53 %, похилого віку – 54,5±4,53 % (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

Класифікація пацієнтів за віком (ВООЗ, 2015)

Вікові групи	Вік	Групи пацієнтів			
		Основна група (n=13)		Група контролю (n=11)	
		Кількість пацієнтів	Кількість пацієнтів, %	Кількість пацієнтів	Кількість пацієнтів, %
Молодий вік	До 44	–	–	–	–
Середній вік	45–59	9	69,2±12,8	5	45,5±4,53
Похилий вік	60–74	4	30,8±12,8	6	54,5±4,53

Середній вік пацієнтів дослідної групи склав 55,8±4,7 роки, групи контролю – 62,3±5,1 роки. Групи були однорідними за віком ($p=0,17$).

У пацієнтів з перемірною кульгавістю для визначення лікувальної тактики, на відміну від класифікації за Fontaine, зручніше користуватись

класифікацією Rutherford, яка ґрунтується на функціональних даних артерій нижніх кінцівок і відображає клінічний стан нижніх кінцівок, включаючи характеристику регіонарної гемодинаміки. Її перевагою є більш детальна характеристика ступенів важкості хронічної ішемії нижніх кінцівок, адже тут не тільки виділені різні за поширенням та глибиною стадії трофічних розладів, але і визначені в окремі самостійні пункти різні за ступенем вираження випадки переміжної кульгавості, у тому числі «виражена переміжна кульгавість».

У ході дисертаційного дослідження нами були встановлені критерії відбору та виключення пацієнтів основної групи для проведення клітинної трансплантації (табл. 2.6).

Таблиця 2.6

Критерії відбору та виключення пацієнтів для проведення клітинної трансплантації

Критерії відбору	Критерії виключення
Неможливість виконання прямих реконструктивних операцій	Наявність показів до прямих реконструктивних операцій
Належність пацієнтів до 4,5 класу по Рутерфорду (III та IV ступінь ішемії по Фонтейну з незначними некрозами тканин)	Пацієнти, що відносяться до 6 класу по Рутерфорду (IV ступінь ішемії по Фонтейну з вираженими некрозами та ішемічними виразками)
Негативні тести на онкомаркери та відсутність онкопатології в анамнезі	Обтяжений онкоанамнез або позитивні тести на онкомаркери
Дистальне ураження артерій нижніх кінцівок	Наявність цукрового діабету

Основну групу формували пацієнти з дистальним ураженням артерій

нижніх кінцівок, болями в стані спокою – категорія 4 за Рутерфордом (III ступінь ішемії за Фонтейном) та обмеженими некрозами тканин – категорія 5 за Рутерфордом (IV ступінь ішемії за Фонтейном), у яких немає показів до виконання прямих реконструктивних оперативних втручань при умові відсутності онкопатології в анамнезі та негативних тестах на онкомаркери.

При наявності показів до прямих реконструктивних операцій пацієнти не входили в основну групу та групу контролю. Також не брали участь у дисертаційному дослідженні пацієнти з поширеними некрозами нижніх кінцівок -категорія 6 за Рутерфордом (IV ступінь ішемії за Фонтейном), хворі з цукровим діабетом, з обтяженим онкологічним анамнезом або позитивних онкомаркерах. Наявність у хворих іншої супутньої патології не було критерієм виключення.

Наявність у хворих супутньої патології (крім онкологічних захворювань та цукрового діабету) не входило в групу виключення.

До моменту госпіталізації та формування груп дослідження частині хворих ($46,15 \pm 13,8$ % дослідної групи та $54,5 \pm 15,0$ % групи контролю) в анамнезі проводили первинні та повторні оперативні втручання (табл. 2.7).

Крім того, основна частина пацієнтів (95 %) обох груп тривалий час займалися самолікуванням, а потім отримували консервативне лікування, проте клінічний ефект був недовготривалим. 1 пацієнт (8 %) дослідної групи не звертався за медичною допомогою в жоден лікувальний заклад, самостійно, в домашніх умовах, приймав анальгетики.

Наявність хронічної ішемії в обох групах пацієнтів підтверджувалась також відповідною клінічною симптоматикою: біль у нижній кінцівці, що з'являється під час фізичного навантаженні або в стані спокою, наявність трофічних порушень м'яких тканин стопи або без них, довготривалий перебіг захворювання. Хворі основної та контрольної групи були схожими за наявністю клінічних симптомів (табл. 2.8).

Таблиця 2.7

Оперативні втручання, які були виконані пацієнтам до участі в дослідженні

Характер оперативних втручань	Групи пацієнтів	
	Основна група (n=6)	Контрольна група (n=6)
здухвинно-стегнове протезування	1	1
здухвинно-стегново-підколінне протезування	1	1
стегново-підколінне протезування	2	2
поперекова симпатекомія	1	1
периартеріальна симпатекомія	3	1
аутомієлотрансплантація	1	2
тромбектомія з стегно-підколінного сегменту	1	1
тромбектомія з підколінної та гомілкових артерій	3	2

Так, на момент поступлення пацієнти скаржились на біль у ногах. 60 % усіх пацієнтів відмічали біль в одній нижній кінцівці, що локалізувався в стопі та гомілці, а його інтенсивність значно посилювалася в ділянці гомілкових м'язів при фізичному навантаженні. У 40 % пацієнтів скарги на біль в обох гомілках та стопах, проте, залежно від ступеню ураження тканин, вираженість больових відчуттів більше переважала в одній кінцівці (правій чи лівій) і також посилювалася після фізичного навантаження.

Таблиця 2.8

Клінічні симптоми у пацієнтів з хронічною ішемією до лікування

Клінічні симптоми	Групи пацієнтів				p
	Дослідна група (n=13)		Контрольна група (n=11)		
	Кількість пацієнтів	Кількість пацієнтів, %	Кількість пацієнтів	Кількість пацієнтів, %	
Біль у кінцівках	13	100±0	11	100±0	1
Зменшення дистанції ходьби:					
>1000 м	–	–		–	
1000-200 м	–	–		–	
200-25 м	–	–	2	18,2±11,63	0,199
<25 м	9	69,2±12,8	5	45,4±15,01	0,168
Біль у спокою, некротичне ушкодження тканин	4	30,8±12,8	4	36,4±14,50	0,281
Парестезії в кінцівках	10	76,9±11,69	9	81,8±11,63	0,370
Мерзлякуватість	6	46,1±13,83	5	45,4±15,01	0,317
Похолодання кінцівок	4	30,8±12,80	4	36,4±14,50	0,321
Порушення тактильної чутливості	10	76,3±11,69	9	81,8±11,63	0,370
Порушення суглобової чутливості	3	23,08±11,6 9	3	27,3±13,43	0,350
Зменшення активних рухів у суглобах	4	30,8±12,80	4	36,4±14,50	0,321
Наявність пульсації на кінцівці:	n=26		n=22		
стегнова артерія	26	100±0	22	100±0	1
підколінна артерія	21	80,7±7,73	17	77,3±8,93	0,265
передня великогомілкова артерія	–	–	–	–	
задня великогомілкова артерія	–	–	–	–	

Пацієнти вимозі пройти без болю дистанцію до 25 м (15 ± 10 м), після чого виникає сильний біль у литкових м'язах, який змушує зупинитись.

Погіршення сну в нічний час, що пов'язано з неприємними відчуттями та парестезіями в нижніх кінцівках, відчуття холоду в стопах та пальцях ніг та їх оніміння відмічало 70 % пацієнтів.

При об'єктивному огляді відмічено збіднений волосяний покрив у ділянці гомілок, шкіра гомілок та стоп бліда та прохолодна. Тактильна та суглобова чутливість у ділянці стоп зменшена. Активні рухи в суглобах дещо зменшені, пасивні – збережені в повному об'ємі.

У 34,5 % пацієнтів наявне незначне ушкодження тканин у вигляді крайового некрозу пальців чи ішемічної виразки в ділянці стопи або гомілки.

Отже, при опитуванні всі хворі скаржилися на біль та парестезії в ногах, мерзлякуватість стоп, зменшення дистанції безбольової ходьби. Однак характер прояву клінічної симптоматики був різним у залежності від ступеню ішемії кінцівки. Ступінь ішемічного ураження визначався наявністю больового синдрому, зменшенням дистанції безбольової ходьби, неможливістю самостійного пересування та виконання побутових функцій, професійних обов'язків та змінами психоемоційного стану (табл. 2.9).

При надходженні до стаціонару пацієнтам обох груп проводили загально-клінічні лабораторні (загальний і біохімічний аналізи крові, коагулограма) та інструментальні методи обстеження що включали ультразвукову доплерографію, рентгенконтрастну ангіографію судин нижніх кінцівок, лазерну доплерівську флоуметрію.

Пацієнтам основної групи проводилось обстеження на онкомаркери що включало для чоловіків ПСА загальний, α -фетопротеїн, раково-ембріональний антиген, онкомаркер підшлункової залози, жовчного міхура, шлунку, ШКТ та для жінок раково-ембріональний антиген, тиреоглобулін, онкомаркер яєчників, молочної залози, підшлункової залози, жовчного міхура, шлунку, ШКТ (табл. 2.10).

Таблиця 2.9

Розподіл хворих за ступенем ішемії нижніх кінцівок

Симптоми		Стадія за Фонтейн	Клас по Рутерфорд	Кількість хворих основної групи (n=13)	Кількість хворих групи контролю (n=11)
безсимптомний перебіг		I	0	–	–
кульгавість >200м	легка кульгавість	IIa	1	–	–
кульгавість <200м	помірна кульгавість	IIб	2	–	–
	тяжка кульгавість		3	–	2
біль у спокої		III	4	9	5
некроз та ішемічні виразки	незначне ушкодження тканин	IV	5	4	4
	значне ушкодження тканин		6	–	–

Таблиця 2.10

Методи обстеження, що проводилися пацієнтам при госпіталізації в стаціонар

Дослідна група (n=13)	
Чоловіки	Жінки
ПСА загальний, α -фетопротейн, раково-ембріональний антиген, онкомаркер підшлункової залози, жовчного міхура, шлунку, ШКТ	Раково-ембріональний антиген, тиреоглобулін, онкомаркер яєчників, молочної залози, підшлункової залози, жовчного міхура, шлунку, ШКТ

На момент госпіталізації результати аналізу клініко-лабораторних показників пацієнтів обох груп свідчили про незначну тенденцію до зниження рівня гемоглобіну в периферичній крові у порівнянні з нормою, при цьому рівень еритроцитів коливався на нижній межі норми, а кольоровий показник не відрізнявся від значень норми (табл. 2.11).

Таблиця 2.11

Середні показники загального аналізу крові у хворих з хронічною ішемією кінцівок при госпіталізації

Показники	Дослідна група (n=13)	Контрольна група (n=11)	Норма	p1	p2	p3
Еритроцити, Т/л	4,33±0,05	4,42±0,07	ч: 4,5-5,0 ж: 3,8-4,5	0,33	0,709	0,921
Гемоглобін, Г/л	133,44±2,36	137,82±2,08	ч: 130-160 ж: 120-140	0,18	0,226	0,672
Кольоровий показник, од	0,9±0,01	0,9±0,01	0,9	1,000	1,000	1,000
Лейкоцити, Г/л	7,61±0,29	7,28±0,23	6-9	0,39	0,882	0,767
Еозинофіли, %	1,56±0,29	1,64±0,24	1-5	0,84	0,113	0,128
Палочкоядерні нейтрофіли, %	4,78±0,28	5±0,27	6	0,57	0,002	0,004
Сегментоядерні нейтрофіли, %	58,89±2,44	60,64±2,39	47-72	0,62	0,834	0,692
Лімфоцити, %	27,89±1,71	28,82±1,54	19-37	0,69	0,959	0,688
Моноцити, %	5,44±0,73	5,82±0,58	3-11	0,69	0,202	0,294
ШОЕ, мм/год	13,89±1,21	14,09±1,00	ч: 1-10 ж: 2-15	0,90	0,002	0,001

Примітки: ч – чоловіки, ж – жінки; p1 – порівняння дослідної групи та контрольної; p2 – порівняння дослідної групи з нормою; p3 – порівняння контрольної групи з нормою.

В обох групах пацієнтів, особливо у хворих з важким ступенем хронічної артеріальної недостатності, відмічено збільшення показника швидкості осідання еритроцитів порівняно з нормою та зменшення Палочкоядерних нейтрофілів. Решта показників загального аналізу крові

пацієнтів основної групи в цілому не відрізнялись від показників групи контролю та норми.

При аналізі показників біохімічного аналізу крові звертає на себе увагу дещо збільшена концентрація сечовини у плазмі крові у деяких хворих з важким ступенем ішемії кінцівок контрольної групи (табл. 2.12).

Таблиця 2.12

Середні показники біохімічного аналізу крові у хворих із хронічною ішемією кінцівок при госпіталізації

Показники	Дослідна група (n=13)	Контрольна група (n=11)	Норма	p1	p2	p3
Загальний білок, г/л	74,6±1,45	72,42±1,14	65-85	0,254	0,842	0,155
Глюкоза, ммоль/л	4,5±0,11	4,57±0,09	3,3-5,5	0,615	0,754	0,655
Білірубін загальний, мкмоль/л	13,12±1,4	12,23±1,08	5-21	0,620	0,948	0,640
Сечовина, ммоль/л	6,07±0,25	9,85±0,42	1,6-8,3	<0,001	0,171	<0,001

Примітки: p1 – порівняння дослідної групи та контрольної; p2 – порівняння дослідної групи з нормою; p3 – порівняння контрольної групи з нормою.

Це пов'язано з тим, що в основну групу навмисне відбирались пацієнти з нормальною фільтраційною функцією нирок, оскільки їм у ході дослідження планується проведення рентгенконтрастної ангіографії.

Варто відмітити, що вміст глюкози та загального білка в крові у пацієнтів обох груп відповідав середнім показникам норми.

Показники коагулограми обох груп пацієнтів не мали достовірних змін та в цілому не відрізнялись від значень показників норми (табл. 2.13).

При поступленні в стаціонар пацієнтам основної та контрольної групи виконано рентгенконтрастну ангіографію для визначення рівня і ступеня ураження артеріального русла. У зв'язку з підвищеним рівнем сечовини у

плазмі крові деяким пацієнтам контрольної групи рентгенконтрастна ангіографія не проводилась. Результати рентгенконтрастної ангіографії до трансплантації вказували на наявність ураження просвіту магістральних артерій нижніх кінцівок, локалізація й розповсюдженість яких індивідуальна в кожному окремому випадку.

Таблиця 2.13

**Середні показники коагулограми у хворих на хронічну ішемію
кінцівок при госпіталізації**

Показники	Дослідна група (n=13)	Контрольна група (n=11)	Норма	p1	p2	p3
Протромбіновий індекс, %	94,33±1,17	93,36±1,1	80-100	0,553	0,180	0,160
Активований час рекальцифікації, с	96,44±6,41	99,73±5,41	60-120	0,700	0,452	0,216
Фібриноген, г/л	3,78±0,3	3,98±0,18	2,2-4,4	0,586	0,175	0,278
Гематокрит, %	43,67±1,06	42,6±1,03	36-48	0,479	0,285	0,691

Примітки: p1 – порівняння дослідної групи та контрольної; p2 – порівняння дослідної групи з нормою; p3 – порівняння контрольної групи з нормою.

Однак, враховуючи надзвичайно малі розміри і виражене розгалуження внутріорганих судинних мереж, вищевказані методи не дають достатньо даних про стан мікрогемодинаміки в кінцівці і не дозволяють у повній мірі оцінити ефективність застосованої реваскуляризуючої методики. Тому, для детального аналізу стану мікроциркуляторного русла в ішемізованих кінцівках пацієнтів, що беруть участь у нашому дисертаційному дослідженні, ми використали такий метод як лазерна доплерівська флоуметрія. Її результати дають змогу оцінити стан мікрогемодинаміки, виявити дисфункцію ендотелію, прогнозувати характер порушень мікроциркуляції у досліджуваних хворих, здійснювати динамічний моніторинг за ефективністю призначеної терапії та визначати ефективність

проведеного лікування.

В умовах стаціонару пацієнти обох груп отримували консервативну терапію терміном 10–14 діб. Схема лікування включала введення стандартних доз спазмолітиків, периферичних вазодилітаторів та препарати групи L-аргініну. Пацієнти тривало отримували подвійну антиагрегантну терапію. При необхідності отримували аналгетики, кратність та форма прийому яких варіювала в залежності від ступеня вираження больового синдрому.

Перед проведенням трансплантації клітин кордової крові в ішемізовану кінцівку з усіма пацієнтами основної групи дисертаційного дослідження проводили бесіду, пояснювали особливості клітинної трансплантації, можливі позитивні клінічні наслідки та ускладнення. До проведення оперативного лікування обов'язковим було отримання «Інформованої згоди пацієнта», підписаної хворим.

При надходженні до стаціонару та через 1, 3, 6, 12 місяців пацієнтам основної групи проводили гістологічне та імуногістохімічне дослідження ішемізованої м'язової тканини.

2.5. Методика отримання та характеристика клітин кордової крові

Клітинний трансплантат «Препарат «Мононуклеарні клітини пуповинної (кордової) крові (МКПК)» являє собою кріоконсервовану при -196°C популяцію клітин людини, що виділені з пуповинної крові. Містить стовбурові, комітовані кровотворні та дорослі клітини крові.

Забір первинного матеріалу проводиться в акушерських і гінекологічних відділеннях пологових будинків на підставі укладених договорів ТОВ "Інститут клітинної терапії" з породіллями.

Забір кордової (пуповинної) крові у породіль проводиться з дотриманням норм асептики на основі повної конфіденційності й анонімності на засадах добровільної інформованої згоди.

Для отримання біологічного матеріалу від донора обов'язковим є

відсутність аутоімунних, системних, вірусних захворювань і TORCH інфекції (*Toxoplasma gondii*, вірус краснухи, цитомегаловірус, вірус простого герпесу 1 та 2 типів); гепатитів вірусної етіології; бактеріальної інфекції і септицемії; сифілісу (в анамнезі і лікованого); прогресуючих дегенеративних неврологічних захворювань; жовтяниці нез'ясованої етіології; пухлин різної локалізації; прийому гормональних препаратів. Удонації не беруть участь жінки, яким у минулому проводилася радіаційна чи хіміотерапія; приймають наркотичні чи токсичні речовини та належать до групи ризику ВІЛ-інфекції.

Виключаються також жінки, вагітність яких відбувалась на фоні акушерської та екстрагенітальної патології, а саме: гестозів II половини вагітності й імунологічного конфлікту, загрози переривання вагітності, фетоплацентарної недостатності, гіпотрофії плоду, гемотерапії в останні 3 тижні вагітності, внутрішньоутробної патології розвитку плоду.

Вихідний матеріал для отримання клітин транспортують з супровідною документацією в опечатаній термоізоляційній тарі в лабораторію банку пуповинної крові та інших тканин людини ТОВ «Інститут клітинної терапії».

З моменту забору пуповинної крові до моменту доставки в інститут клітинної терапії не перевищує 24 години.

Далі в стерильних боксах біотехнологічної лабораторії ТОВ «Інститут клітинної терапії» проводяться роботи з видалення еритроцитів, після чого отримана пуповинна кров підлягає сепарації протягом 45 хв методом спонтанного зсідання осадковим розчином, до складу якого входить желатин. За допомогою плазмоекстрактора фракцію з лейкоцитами переміщують у малий контейнер. Для видалення надлишків плазми контейнер з лейкоцитами центрифугують зі швидкістю 1200 об/хв протягом 15 хв. Після центрифугування, контейнер оброблюють дезрозчином і переносять на робочу поверхню ламінарного боксу. Видаляють надлишок плазми, а мононуклеарну фракцію, що залишилась, переміщують у 50 мл мірні пробірки по 25 мл і додають 1:1 кріоконсервант.

Суспензія зберігається при температурі -196°C у спеціалізованих нішах

сховища кріосховище «38K w/Kryos Controler» або «ХБ 05» у герметичних кріоампулах об'ємом 4,5 і 1,5 мл, з відповідним маркуванням, де вказується шифр і номер серії препарату.

Кріоконсервована пуповинна кров містить $2,25-110,6 \times 10^6$ /мл ядровмісних клітин у загальному об'ємі, загальна кількість ядровмісних клітин від $0,11 \times 10^9$ до $3,7 \times 10^9$, відносний вміст мононуклеарів 15–60 %, загальна кількість мононуклеарів в ексфузаті $0,01-1,48 \times 10^9$, колонієутворюючих одиниць (гранулоцитарно-макрофагальних) (КУО-ГМ) – $50 \pm 10 \times 10^3$ /мл, вміст гемопоетичних клітин, що несуть на своїй поверхні маркер CD 34+ (0,5–2 %) від 1×10^6 до 50×10^6 . Життєздатних клітин – не менше 87 ± 5 % від початкової (таб. 2.14).

Таблиця 2.14

Характеристика пуповинної крові

Об'єм ексфузату, мл	Кількість ЯКК, $\times 10^6$ /мл	Загальна кількість ЯКК в ексфузаті, $\times 10^9$	Відносний вміст мононуклеарів, %	Загальна кількість мононуклеарів ексфузаті, $\times 10^9$
$39,1 \pm 19,2$ (9–108)	$21,6 \pm 9,4$ (2,25–110,6)	$0,8 \pm 0,3$ (0,11–3,69)	$32,9 \pm 0,3$ (15 – 60)	$0,3 \pm 0,02$ (0,01 – 1,48)

Клітинний трансплантат у відділення хірургії судин Чернівецької обласної клінічної лікарні отримували з банку пуповинної крові ТОВ «Інститут клітинної терапії», згідно з договором. Кріоконсервовану клітинну суспензію, що знаходилась у кріоампулах об'ємом 1,5 мл, транспортували в емностях Дьюара при температурі -196°C (рис. 2.4).

Досліджуваний клітинний трансплантат супроводжувався аналітичним паспортом, на якому зазначається найменування підприємства-виробника, його товарний знак та адреса, найменування препарату, кількість одиниць контейнерів з препаратом, кількість клітин в 1 мл, кількість КУО, стать,

групу крові, на відсутність яких інфекції перевірено, стерильність, умови зберігання та розморожування, термін придатності (рис. 2.5).



Рис. 2.4. Ємкість Дьюара з криоампулами всередині.

ИНСТИТУТ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Украина, 03680, г. Киев, пр. Космонавта Комарова, 3
тел.: +380 (44) 207 9 207, факс: +380 (44) 206 6 660
www.stemcellclinic.com

**АНАЛІТИЧНИЙ ПАСПОРТ
КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИН ДОНОРСЬКОЇ ПУПОВИННОЇ
КРОВІ**

- Маркування: ДК 351
- Група крові (ABO) AB IV
- Резус фактор Rh (+) nov.
- Стать новонародженого жін.
- Кількість контейнерів: 5 x 1,5 шт
- Кількість ядромісних клітин 89.1 x10⁶
- Життєздатність клітин 99 %
- Мікробіологічний контроль : стерильно
- Результати дослідження маркерів трансмісивних інфекцій в материнській і пуповинній крові: Anti- HIV 1/2, Anti- HCV, Anti- Trepanema pallidum, Anti- HBcorAg, Anti- Toxoplasma gondii, Anti- CMV- **не виявлені**
- Результати ПЛР-аналізу на наявність інфекційних агентів в материнській і пуповинній крові: HIV 1/2, HCV, CMV, HBV **не виявлено**
- Умови зберігання -196 °C
- Умови розморожування: водяна баня +40°C

Відповідальний за кріоконсервовані матеріал: к.б.н. , ст.н.с. Г.С.Любінцева

Дата 20.12.13 Підпис [Signature]

Рис. 2.5. Супровідний аналітичний паспорт кріоконсервованих клітин кордової крові.

2.6. Методика введення клітин кордової крові

Отримані криоампули з клітинним трансплантатом виймали з ємкості

Дьюара за допомогою пінцета та витримували на повітрі 10–15 секунд. Після цього ампули поміщали на водяну баню (не менше 1 літра) при температурі $+40^{\circ}\text{C}$, підтримуючи пробку ампули, та розморозували до появи рідкої фази в ампулі (до 0°C). Вміст ампули вилучали за допомогою стерильного шприца. Дозу ведення (4–6 кріоампул по 1,5 мл) розводили в 40 мл фізіологічного розчину, з додаванням 0,5 мл гепарину (рис. 2.6).



Рис. 2.6. Ампули з кріоконсервованими стовбуровими клітинами кордової крові.

Після спинномозкового/епідурального знеболення, за допомогою довгої гострої канюлі та шприца, клітинний трансплантат ін'єкційно вводили в ішемізовану м'язову тканину. Канюлю вводять під прямим кутом (90°) через шкіру, підшкірно-жирову клітковину та фасцію у верхній третині гомілки по медіальній та латеральній поверхні (рис. 2.7).

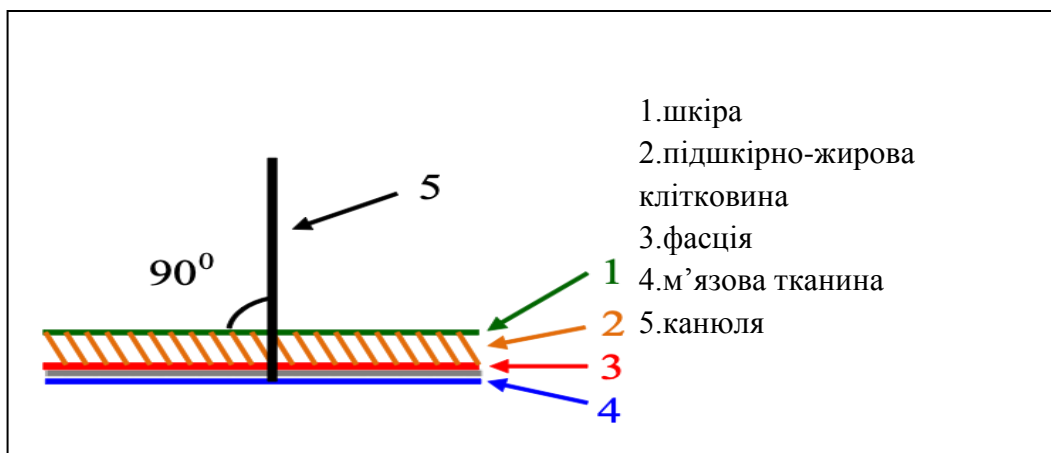


Рис. 2.7. Схематичне розташування канюлі відносно поверхні кінцівки.

Під час проколу фасції долали опір, після чого виникає відчуття «провалювання» і кут введення змінювали до 20–30°. Канюлю без зусиль доводили до медіальної та латеральної кісточок (рис. 2.8).

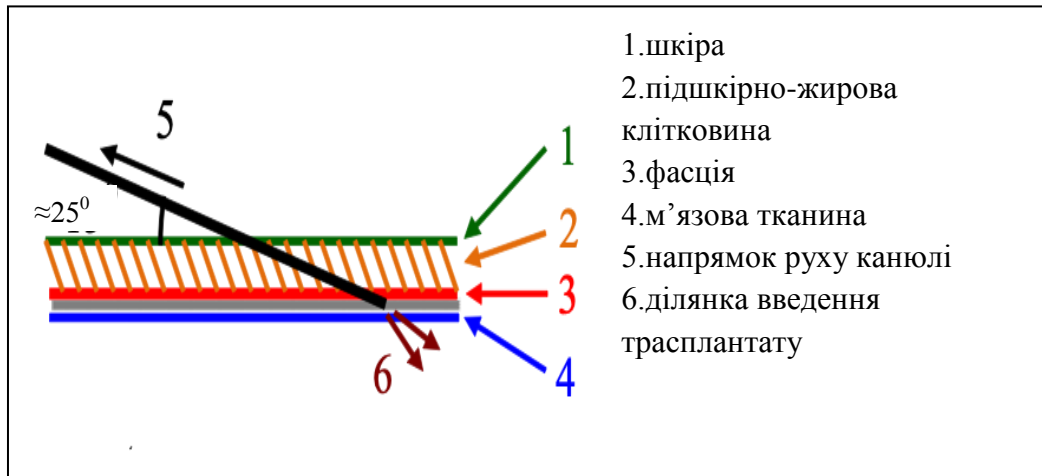


Рис. 2.8. Схема введення трансплантату в тканини.

Ін'єкції виконували рівномірно, у вигляді стрічкової доріжки, підфасціально та внутрішньом'язово вздовж облітерованих судин від нижньої до верхньої третини гомілки по медіальній та латеральній поверхні (рис. 2.9). Після цього пацієнту накладали асептичну пов'язку.

Загальна кількість введеної суспензії, що містила стовбурові клітини кордової крові, в одну ішемізовану кінцівку становила 50 ± 5 мл (вміст ядровмісних клітин – від 47×10^6 до 356×10^6 , життєздатність клітин – не менше 87 ± 5 % від початкової).

Ця методика способу лікування хворих з ішемією нижніх кінцівок за умов введення стовбурових клітин кордової крові розроблена нами в ході дослідження та запатентована.

До трансплантації, після проведення пацієнту спинномозкового чи епідурального знеболення, за допомогою біопсійної голки проводили забір матеріалу – біопсію ішемізованої м'язової тканини у середній та нижній третині гомілки по медіальній та латеральній поверхні.

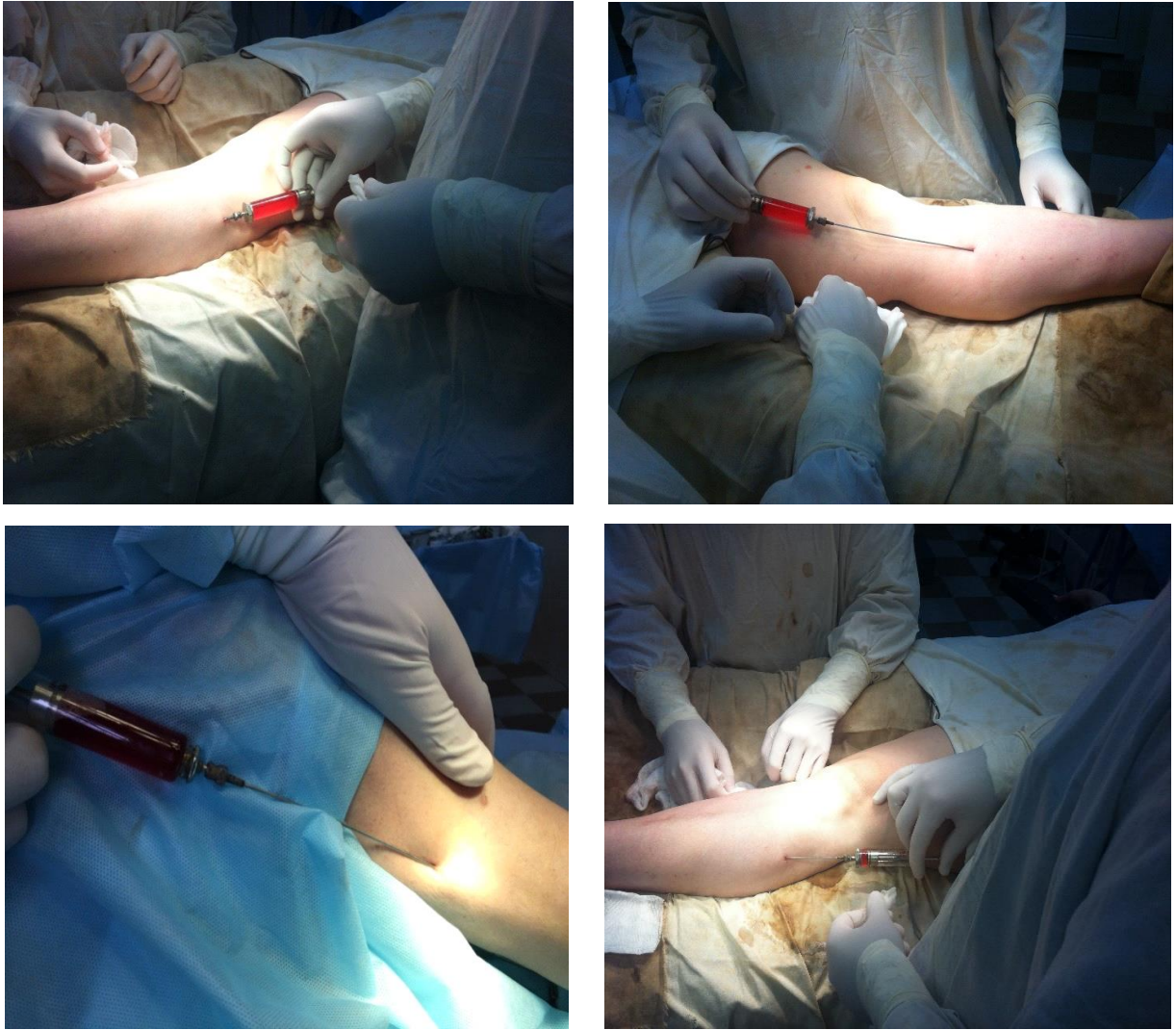


Рис. 2.9. Введення розчину зі стовбуровими клітинами кордової крові пацієнтам з ішемією нижніх кінцівок.

2.7. Оцінка стану мікрогемодинаміки за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок

Для контролю ефективності застосованих методів оперативного лікування сьогодні застосовують ангиографію, визначення сегментарного тиску та дуплексне сканування артерій. Проте через дуже малі розміри і сильну розгалуженість внутрішньом'язевих судинних мереж, вищенаведені методи не дають достатньо даних про стан мікроциркуляції в кінцівці і не дозволяють адекватно оцінити ефективність застосованої реваскуляризуючої методики. Тому в клінічній практиці використовують такі методи дослідження мікроциркуляції як лазерна доплерівська флоуметрія.

Лазерна доплерівська флоуметрія (ЛДФ) – ефективний метод дослідження мікроциркуляції, що забезпечують детальний аналіз стану мікроциркуляції в ділянці патологічного вогнища, заснований на виділенні ритмічних складових гемодинамічних потоків у тканинах. ЛДФ ґрунтується на визначенні інтенсивності мікроциркуляції в досліджуваній ділянці тіла, який включає в себе середню швидкість руху еритроцитів, показник капілярного гематокриту і число функціонуючих капілярів. Принцип методу полягає у відображенні лазерного випромінювання від рухомих у мікросудинах еритроцитів, що призводить до зміни частоти сигналу (ефект Доплера), і дозволяє визначити інтенсивність мікроциркуляції в досліджуваній ділянці тіла. Зворотнє розсіювання монохроматичного зондуєчого сигналу формується в результаті багаторазового розсіяння на поверхні еритроцитів. Тому спектр відбитого сигналу після багаторазового детектування, фільтрації та перетворення дає інтегральну характеристику капілярного кровотоку в заданій одиниці об'єму тканин, яка складається із середньої швидкості руху еритроцитів, показника капілярного гематокриту і числа функціонуючих капілярів.

ЛДФ дозволяє визначити внесок окремих механізмів регуляції, які модулюють кровотік, оцінити рівень мікроциркуляції, виявити дисфункцію ендотелію, дає змогу прогнозувати характер порушень мікроциркуляції у досліджуваних хворих, здійснювати динамічний моніторинг за ефективністю призначеної терапії та визначати ефективність проведеного лікування.

Джерелом світла флоуметра служить гелій-неоновий лазер з довжиною хвилі 630 нм (червоний спектр), 115 нм (інфрачервоний спектр). Випромінена хвиля даної довжини та інтенсивності не чинить ушкоджуючої дії на тканини організму. Як датчик ЛДФ застосовується світловодний зонд, що виконаний із трьох моноволокон. Одне волокно використовується для доставки лазерного випромінювання з приладу до досліджуваної тканини, два інші волокна приймають відбите тканиною лазерне випромінювання. Промінь лазера (для червоного випромінювання) проникає в шкіру на

глибину 1 мм і дає інформацію про кровотік у поверхневих капілярах в об'ємі 1–1,5 мм³.

Дослідження стану мікроциркуляції у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок за допомогою ЛДФ проводилось на апаратному комплексі «ЛАКК-02» ПП «Лазма» (Москва, Росія) до та через 1, 3, 6, 12 місяців після клітинної трансплантації. Пацієнти, яким була виконана клітинна трансплантація склали основну групу.

З метою отримання контрольних значень було обстежено 15 практично здорових волонтера (30 кінцівок), які не мали ознак ураження судин нижніх кінцівок.

У пацієнтів визначали гемодинамічний тип мікроциркуляції (ГТМ) за допомогою реєстрації фонового запису з зовнішньої поверхні дистальної третини лівого передпліччя (умови дослідження проведено згідно рекомендацій групи по стандартизації ЛДФ (European Contact Dermatitis Society, 1994), фоновий показник мікроциркуляції перед початком лікування – Мф, резерв капілярного кровотоку (РККо) при проведенні оклюзійної проби, аналогічний ендотелій-залежній вазодилатації за пробою Celermajer D.S., реєстрацію показника мікроциркуляції з внутрішньої поверхні дистальної фаланги 1 пальця стопи – ПМ (лівої чи правої в залежності від ступеня ішемічного ураження).

Для визначення гемодинамічного типу мікроциркуляції (ГТМ) використовували ПМ на початковій ЛДФ-грамі та резерв капілярного кровотоку (КККо).

Виділяли наступні основні ГТМ: нормоциркуляторний, гіперемічний, спастичний, стазичний та застійний (таб. 2.15).

Нормоциркуляторний ГТМ характеризується початковою величиною ПМ 4,5–6,5 пф. од. при нормореактивному типі реакції на артеріальну оклюзію (РККо 200–300 %).

Гіперемічний ГТМ характеризується збільшенням притоку крові в мікроциркуляторному руслі з початковим зниженням ПМ менше 6,5 пф. од.:

амплітуда вазомоцій знижується або не змінюється, амплітуда пульсової хвилі не змінюється або збільшується, реакція на артеріальну оклюзію гіперреактивна. РККо завжди знижений (<200 %).

Таблиця 2.15

Критерії гемодинамічних типів мікроциркуляції

Типи мікроциркуляції	Показник мікроциркуляції, (пф.од.)	Резерв капілярного кровотоку, (%)
Гіперемічний	> 6,5	< 200
Нормоциркуляторний	4,5-6,5	200-300
Спастичний	< 4,5	> 300
Стазичний	< 4,5	< 200
Застійний	< 4,5-6,5	< 200

Примітка: пф. од. – перфузійні одиниці

Спастичний ГТМ характеризується зниженням притоку крові в мікроциркуляторному руслі за рахунок спазму резистивних судин і прекапілярних сфінктерів. Відмічається зниження ПМ менше 4,5 пф. од., амплітуда вазомоцій не змінюється або збільшується, амплітуда пульсової хвилі зменшується, реакція на артеріальну оклюзію ареактивна. РККо збільшений (>300 %).

Стазичний ГТМ відзначається при ознаках зниження швидкості та зстазі крові у компонентах мікроциркуляторного русла: супроводжується зниженням ПМ, амплітуди вазомоцій та мультисистої хвилі, РККо знижений (<200 %).

Застійний ГТМ відзначається при ознаках застою крові у венулах: супроводжується нормальним або зниженим ПМ (<4,5–6,5 пф. од.) і амплітуди вазомоцій. РККо <200 %.

Метод ЛДФ із застосуванням амплітудно-частотного аналізу коливань кровотоку дозволяє неінвазивно оцінити вплив міогенних, нейророгенних та ендотеліальних компонентів тону́су мікросудин. При цьому розраховується показник нейрогенного тону́су прекапілярних резистивних судин, міогенний тону́с метартеріол і прекапілярних сфінктерів, показник шунтування. Серед ланок регуляції мікрокровотока виділяють «активні» і «пасивні» механізми. До «пасивних» механізмів відносять зовнішні фактори, які знаходяться поза мікроциркуляторним руслом: кардіальний ритм на «вході» в мікроциркуляторне русло і венулярний ритм на «виході» з мікроциркуляторного русла.

«Активні» чинники безпосередньо впливають на судини мікроциркуляторного русла шляхом періодичної зміни опору судин потоку крові під впливом вазомотії і створюють поперечні коливання кровотоку. Ці фактори регуляції модулюють потік крові з боку судинної стінки і реалізуються через її м'язову складову, тому їх і називають тону́с формуючими. Вазомотії здійснюються не тільки за рахунок синхронізованих спонтанних осциляцій гладком'язових елементів судинної стінки (міогенний ритм), але і за рахунок їх модуляції з боку як симпатичної нервової регуляції (нейрогенний ритм), так і ендотеліальної регуляції (ендотеліальний ритм). До активних механізмів регуляції мікроциркуляції належать: A_{maxE} – максимальна амплітуда ендотеліальних флаксмоцій, A_{maxH} – максимальна амплітуда нейрогенних коливань до лікування, A_{maxM} – максимальна амплітуда міогенних коливань до лікування; до пасивних – A_{maxD} – максимальна амплітуда дихальних коливань, A_{maxC} – максимальна амплітуда серцевих коливань.

Нейрогенний компонент судинного тону́су, виходячи із симпатичних периваскулярних нервових волокон, опосередковується через артеріоли та артеріо-венулярні анастомози. У той же час прекапілярні сфінктери, що передують вхід у нутритивні капіляри, не мають симпатичної інервації, а регулюються загалом міогенно, тобто внаслідок підвищення м'язового тону́су

у відповідь, а підвищення внутрішньосудинного тиску (ефект Бейліса) і відповідно навпаки. Враховуючи локалізацію нейрогенного (артеріоли та артеріо-венулярні анастомози) і міогенного (прекапілярні сфінктери) компонентів тону, можливо неінвазивно оцінити співвідношення шунтового та нутритивного кровотоку в системі мікроциркуляції. Для цього був розрахований запропонований показник шунтування (ПШ) тканинного кровотоку, що представляє собою співвідношення значення амплітуди нейрогенного ритму до амплітуди міогенного ритму мікроциркуляції.

У динаміці лікування хворих було повторно обстежено з визначенням вищезгаданих показників через 1, 3, 6, 12 місяців після проведення трансплантації (розділ 4.2).

2.8. Оцінка якості життя хворих

Одним з головних критеріїв оцінки ефективності лікування є характеристика якості життя до та після надання медичної допомоги. Методика оцінки якості життя базується на використанні опитувальників, які є особливо корисними в тих випадках, коли порівнюються різні методи лікування та проводяться клінічні випробування.

Для оцінки результатів лікування ішемії кінцівок використовуються опитувальники якості життя та опитувальники для визначення дистанції ходи, за допомогою яких визначається дистанція переміжної кульгавості та функціональний стан пацієнтів.

Уніфікований опитувальник Walking Impairment Questionnaire (WIQ) рекомендований в якості специфічного опитувальника для пацієнтів з переміжною кульгавістю. Він складається з двох таблиць (табл. 2.16, 2.17), проаналізувавши дані яких ми визначали дистанцію безболісної ходьби та можливу швидкість ходьби у пацієнтів з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок.

За допомогою крокоміру OMRON (OMRON) HJ-005-E визначали кількість пройдених кроків.

Таблиця 2.16

Визначення дистанції безболісної ходьби

Дистанція ходьби	Рівень виконання	Бали
Декілька кроків	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
50 кроків	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
150 кроків	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
300 кроків	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
600 кроків	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
900 кроків	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
1500 кроків та більше	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3

Хворий відповідав на стандартні запитання для визначення відстані безбольової ходьби, тобто появу переміжної кульгавості, та для визначення можливої швидкості ходьби, що характеризує функціональний стан кінцівок. Після проведення опитування сума балів по визначенню дистанції та швидкості проходження відстані складалась. Максимальна можлива кількість

балів складала 33 бали, мінімальна – 11 балів. Подібні дослідження проводились через 3, 6 та 12 міс. після проведення трансплантації.

Таблиця 2.17

Визначення можливої швидкості ходьби

Швидкість ходьби	Рівень виконання	Бали
Проходження 100 м повільно (швидкість 2,5 км/год)	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
Проходження 100 м із середньою швидкістю (швидкість 3,5 км/год)	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
Проходження 100 м швидко (швидкість 5 км/год)	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3
Пробігти 100 м дуже швидко (швидкість 8 км/год)	ніколи	1
	іноді	2
	багато	3

У медичній практиці використовують достатньо велику кількість різноманітних опитувальників оцінки якості життя, як неспецифічних, що застосовуються незалежно від нозологічної форми, так і специфічних (для осіб з певним захворюванням). Більшість дослідників вважають, що опитувальники повинні бути стандартизованими і придатними до застосування у багатоцентричних дослідженнях [8].

При проведенні нашого дослідження за основу оцінки якості життя до

та після клітинної трансплантації був використаний опитувальник “Індекс якості життя” – “Quality of Life Index” (табл. 2.18).

Таблиця 2.18

Індекс якості життя

Бали	Працездатність	Життєва активність	Сприйняття власного здоров'я	Власна оцінка якості життя	Взаємовідносини в сім'ї
2	Працював, або займався господарством у повному обсязі	Повністю обслуговує себе самостійно	Самопочуття хороше	Хороше	Повністю надавали підтримку
1	Працював, або займався господарством обмежений час	Вимагає часткової допомоги сторонніх	Відчував фізичний дискомфорт	Задовільне	Негативне відношення через хворобу
0	Не працював	Не міг обійтись без сторонньої допомоги	Самопочуття погане	Погане	Підтримка тільки у екстерені у випадку

Його критеріями є оцінка пацієнтом рівня особистого благополуччя у фізичному, психічному та соціально-економічному відношенні. Проводилася оцінка якості життя протягом року, при цьому порівнювалася якість життя при первинному зверненні та через шість місяців після проведення клітинної трансплантації. Максимально “хороша” якість життя оцінювалася в 2 бали, середня якість – в 1 бал, максимальна “погана” – в 0 балів. Максимальна

кількість балів, що міг набрати пацієнт, складала 10 балів, мінімальна – 0 балів (детальні зміни показників описані в розділі 4.2).

2.9. Методи статистичної обробки результатів дослідження

Статистичну обробку отриманих результатів дослідження проводили за допомогою електронних таблиць Microsoft® Office Excel та програмою для статистичного обчислення «BioStat».

У тексті та таблицях кількісні дані представлені у вигляді $M \pm m$, якісні показники представлені у вигляді $n(\%)$. У зв'язку з малим об'ємом вибірок для порівняння показників використовували непараметричні критерії, а саме для порівняння кількісних показників дослідної та контрольної групи використовували ранговий критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні, що дозволяє робити порівняння для вибірок об'ємом не менше 3. Для порівняння кількісних показників основної групи з нормою для здорових осіб використовували критерій Розенбаума, що використовується для вибірок об'ємом не менше 11. Для порівняння відносних показників використовували точний критерій Фішера, що дозволяє порівнювати малі вибірки навіть при наявності нульових значень у статистичній таблиці

РОЗДІЛ 3

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

3.1. Рухова активність щурів I та II груп

Для оцінки ефективності трансплантації клітин кордової крові в експерименті проведено оцінку обох груп тварин з використанням проб рухової активності, що включали показники дистанції пробігу та показники тесту примусового плавання.

Тварини поділені на 2 групи: I – тварини, у яких була змодельована ішемія кінцівки, II – тварини, яким на тлі ішемії кінцівки введено клітини кордової крові.

Спостереження за тваринами II групи показали збільшення дистанції пробігу (рис. 3.1) вже на 7-у добу після введення клітин кордової крові в порівнянні з контрольною групою.

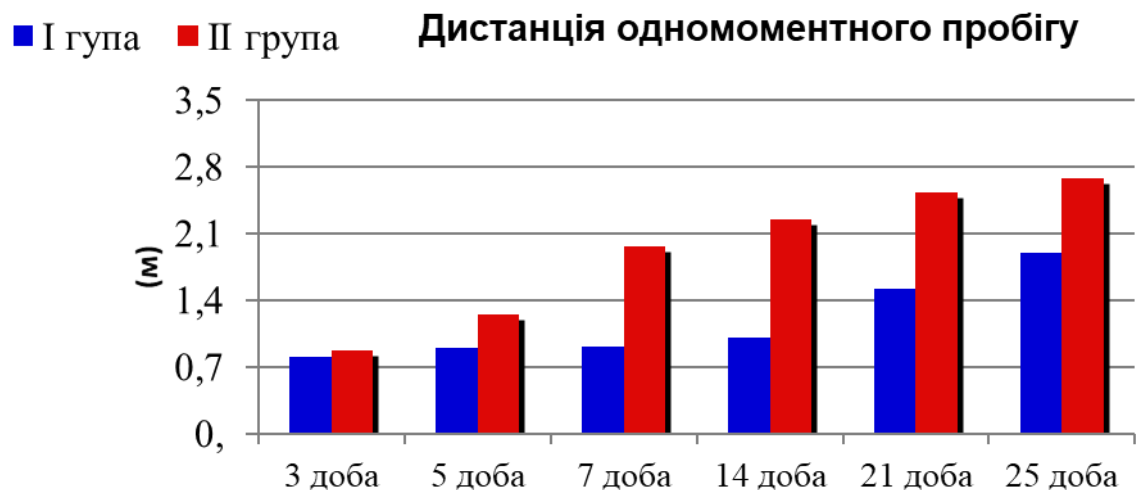


Рис. 3.1. Динаміка показників дистанції одномоментного пробігу.

Після проведення аналізу тесту примусового плавання (рис. 3.2) відмічається суттєве збільшення часу примусового плавання в II групі вже на 14 добу після введення клітин кордової крові, тоді як у групі контролю (I групі) показники змінювались несуттєво.

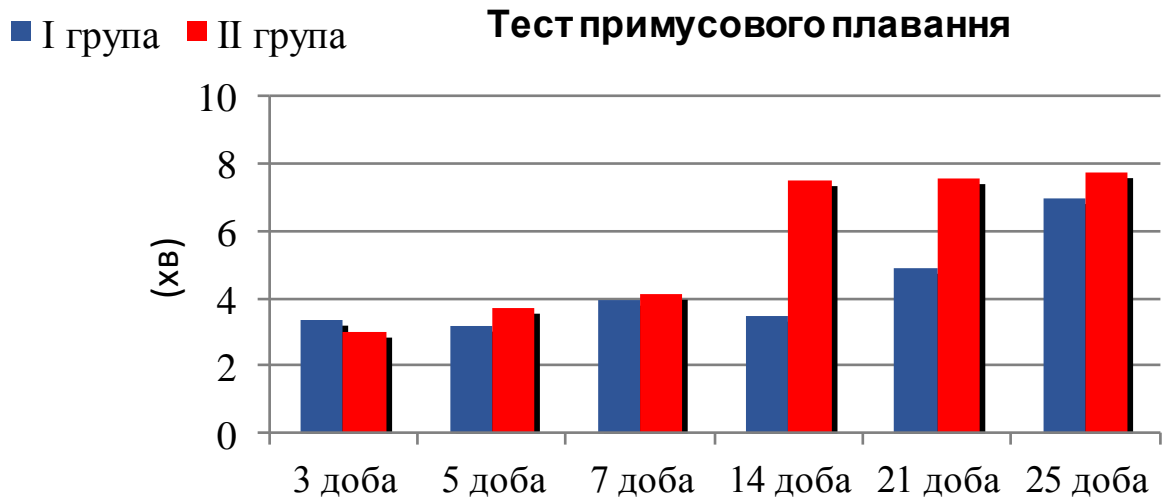


Рис. 3.2. Динаміка тесту примусового плавання.

Отже, рухові проби показали переваги трансплантації кордової крові. Однак, на нашу думку цей факт не є достатнім для екстраполяції лікувального ефекту клітин кордової крові у клінічну практику. У зв'язку з цим, наступним етапом роботи стало морфологічне дослідження змін м'язевих біоптатів у експериментальних тварин.

3.2. Гістологічні зміни структури м'язової тканини кінцівки за умов експериментальної ішемії

За допомогою гістологічного методу проведено дослідження стану м'язової тканини лабораторних тварин I та II груп у різні терміни експериментальної ішемії. При аналізі даних гістологічного дослідження м'язових волокон, які були проведені у I (n=15) та II (n=15) групах тварин, визначено терміни, які відображають характер морфологічних змін: 1 – 3-тя доба; 10 – 14-та доба та 21 – 25-та доба ішемії.

На 1–3-тю добу змодельованої ішемії в усіх експериментальних тварин спостерігали розлади кровообігу та зміни реологічних властивостей крові особливо у венозних судинах.

Після змодельованої ішемії задньої кінцівки в групі контролю на 3-тю добу експерименту результати дослідження тварин свідчили про наявність у

венозних судинах вираженого вогнищевого повнокров'я і стазу еритроцитів (рис. 3.3).

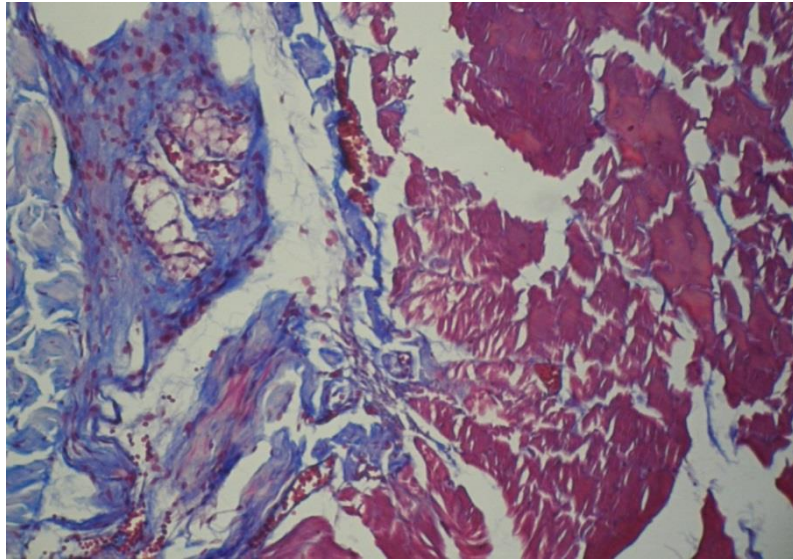


Рис. 3.3. Мікрофотографія. Третя доба після моделювання ішемії. Венозне повнокров'я і стаз еритроцитів. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об. 10, ок. 10.

Окрім того, фіксували наявність вогнищевого та нерівномірного набряку, при цьому частина ендотеліоцитів некротизована та злуцена (рис 3.4).

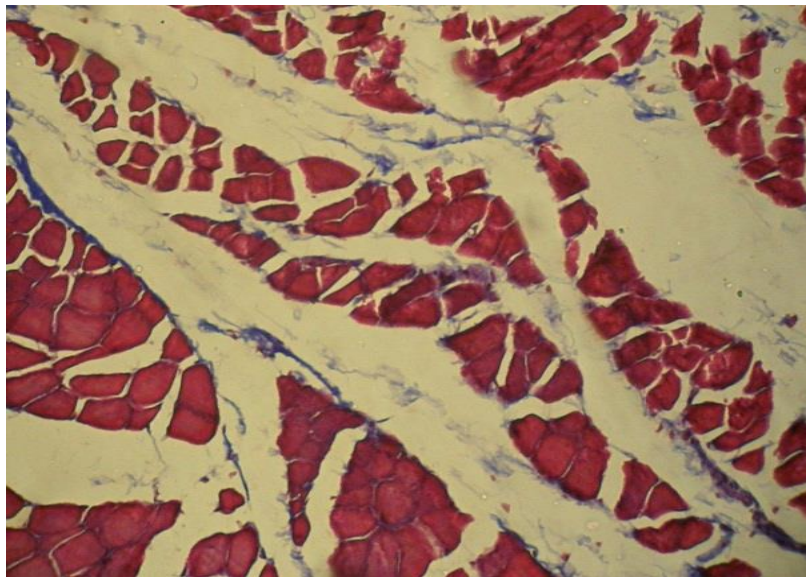


Рис. 3.4. Мікрофотографія. П'ята доба після моделювання ішемії. Набряк інтерстицію м'яза та некроз міоцитів. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об. 10, ок. 10.

Судинна стінка нерівномірно інфільтрована макрофагами та лімфоцитами. Дистрофія та вакуолізація м'язових волокон характеризувалась вогнищевістю та нерівномірністю. Необхідно відмітити втрату м'язовими волокнами своєї посмугованості, водночас починає виявлятися втрата еозинофілії поява базофілії та активація гістіоцитів, особливо макрофагів.

На 7–14-ту добу експерименту деструктивні зміни морфоструктури м'язової тканини посилювались. Фіксували прогресивне (в порівнянні з 3 добою) наростання деструктивних процесів у м'язових волокнах з наявністю вогнищ некрозу, ліпідної дистрофії, вакуолізації та набряку.

Спостерігалася десквамація та некроз ендотеліальних клітин з наступною облітерацією просвіту капілярів (рис. 3.5).

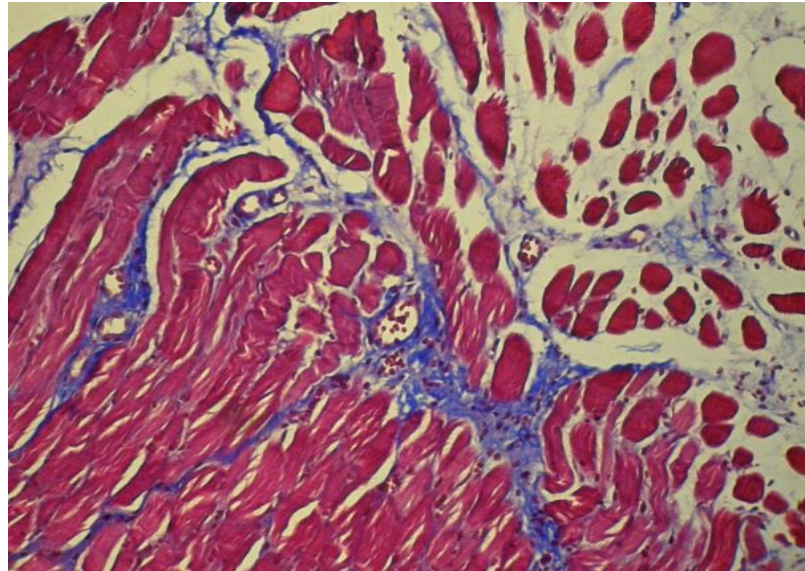


Рис. 3.5. Мікрофотографія. Десята доба після моделювання ішемії. Десквамація та некроз ендотеліоцитів з облітерацією просвіту судин. Зabarвлення за методом Н. З. Слінченко. Об. 10, ок. 10.

Трапляється розволокнення і набряк судинної стінки. На тлі набряку міжм'язових ділянок мають місце вогнища крововиливів (рис. 3.6) та поодинокі мультипотентні клітини. У деяких біоптатах були вогнища лімфомакрофагальної гістіоцитарної реакції.

Результатів гістологічного дослідження біоптатів м'язової тканини, вилученої у тварин на 21–25-ту добу експерименту, свідчили про поступове

зменшення розладів кровообігу (повнокров'я та стаз крові) у судинах м'язової тканини.

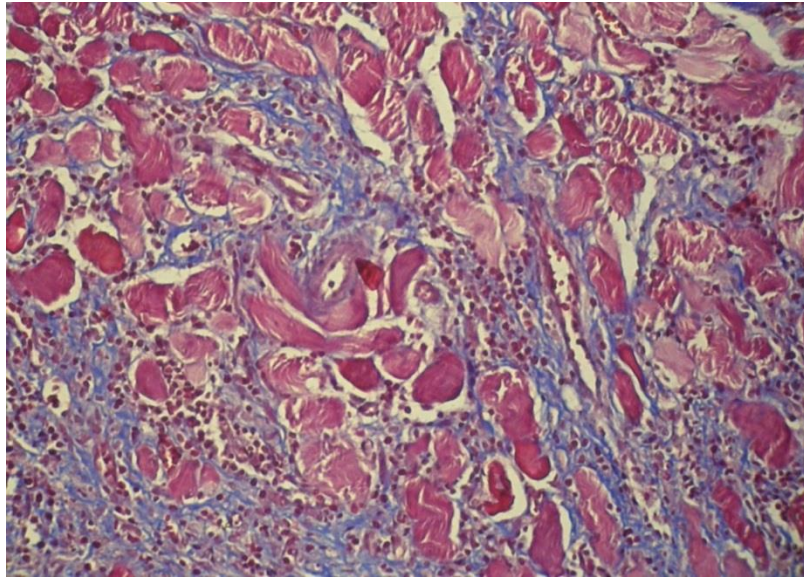


Рис. 3.6. Мікрофотографія. Чотирнадцята доба після моделювання ішемії. Вогнища крововиливів, набряк. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об. 10, ок. 10.

Однак доволі часто фіксували наявність вогнищ периваскулярного склерозу (фіброзу) (рис. 3.7).

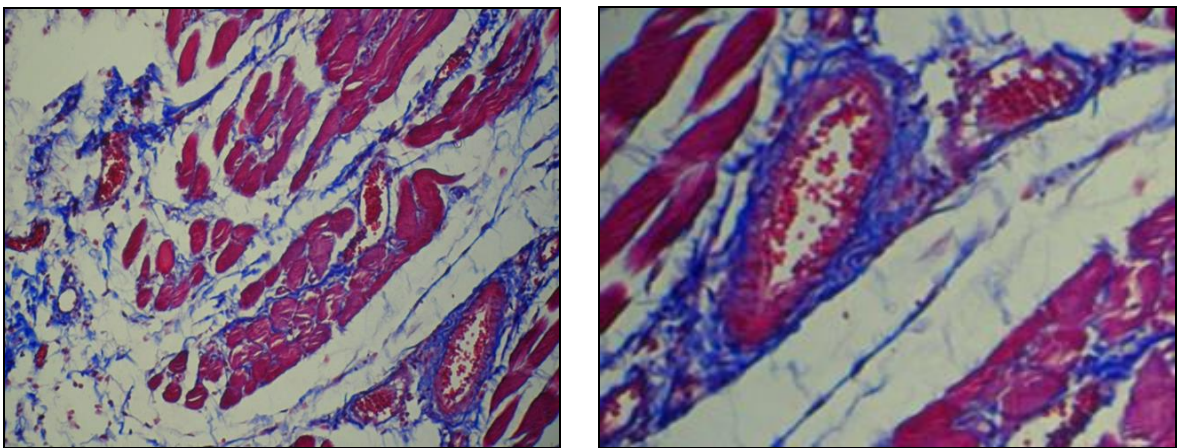


Рис. 3.7. Мікрофотографія. Двадцять п'ята доба змодельованої ішемії. Звичайна структура судин і м'язових волокон з ділянками периваскулярного фіброзу. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об. 10, ок. 10.

Варто зазначити, що до 21–25 доби, з'являються фібропластичні зміни стінки судин, а також потовщення та фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучної тканини (рис. 3.8).

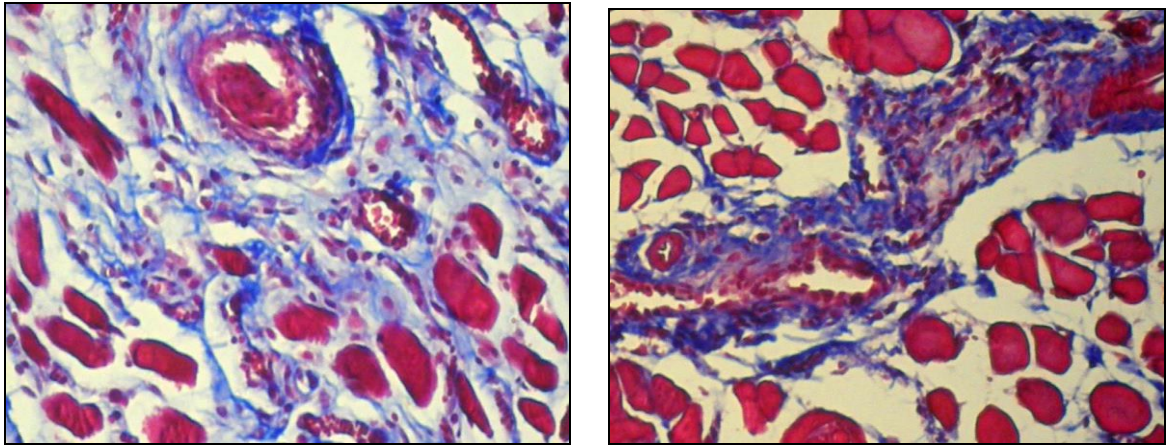


Рис. 3.8. Мікрофотографія. Двадцять п'ята доба змодельованої ішемії. Фіброз судинної стінки. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об. 10, ок. 10.

Отже, з 3-ої до 14-ої доби ішемічного ураження в м'язовій тканині фіксуються розлади кровообігу в судинах, особливо венозного типу, деструкції м'язових волокон, формування вогнищ некрозів, дистрофії та набряку. Однак необхідно відмітити, що з 21-ої доби експериментальної ішемії деструктивні процеси поступаються фібропластичним змінам – спостерігається потовщення та фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучної тканини.

Дані проведеного гістологічного дослідження у II групі тварин (дослідна група після трансплантації клітин кордової крові) свідчили що, на 1-2 добу після трансплантації стовбурових клітин кордової крові (4–6 доба змодельованої ішемії), у міопласті мали місце мозаїчні зміни, які відповідали тканинним характеристикам тварин I групи (рис. 3.9).

На 3-тю добу після трансплантації в міопласті мали місце мозаїчні зміни – явища дистрофії, деструкції міосимпласту та набряку інтерстицію з вогнищами повнокров'я та стазом крові в судинах ендомізію. На 5-ту добу

після трансплантації в біоптатах з'являються молоді ендотеліоцитоподібні клітини (рис. 3.10, 3.11).

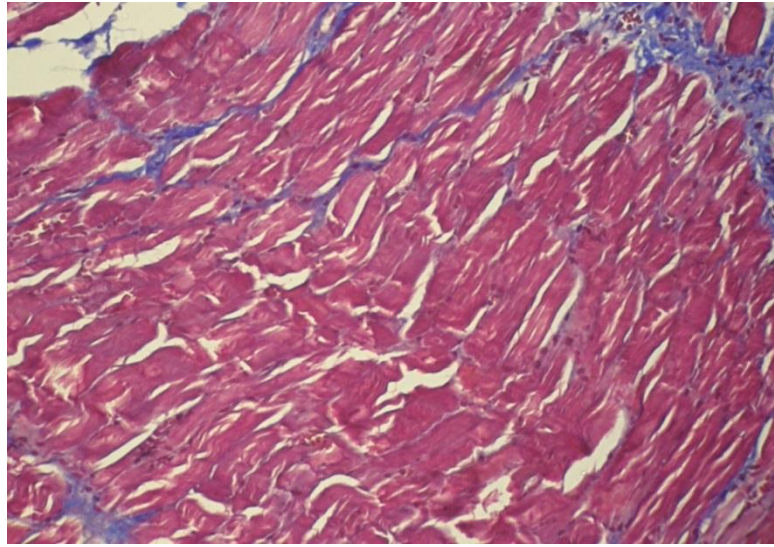


Рис. 3.9. Мікрофотографія. Перша доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Структура міосимпласту із скелетними м'язовими волокнами та поодинокими вогнищами крововиливів. Зabarвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 20.

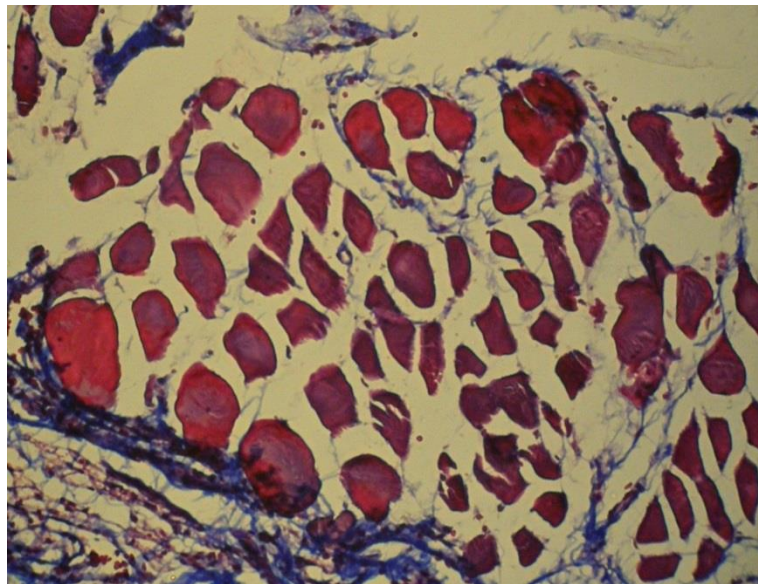


Рис. 3.10. Мікрофотографія. Друга доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. набряк інтерстицію з ділянками крововиливів в перемізії. Зabarвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

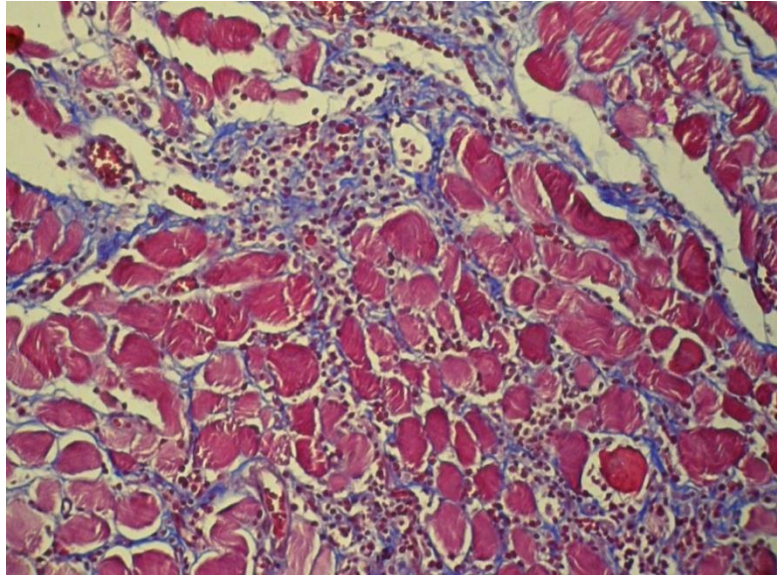


Рис. 3.11. Мікрофотографія. Третя доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Повнокров'я та стаз крові в судинах ендомізія. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

На 10-14-ту добу після трансплантації клітин кордової крові ендотеліальні клітини густо заселяють інтерстицій, відмічається збільшення числа фіброblastів (рис. 3.12).

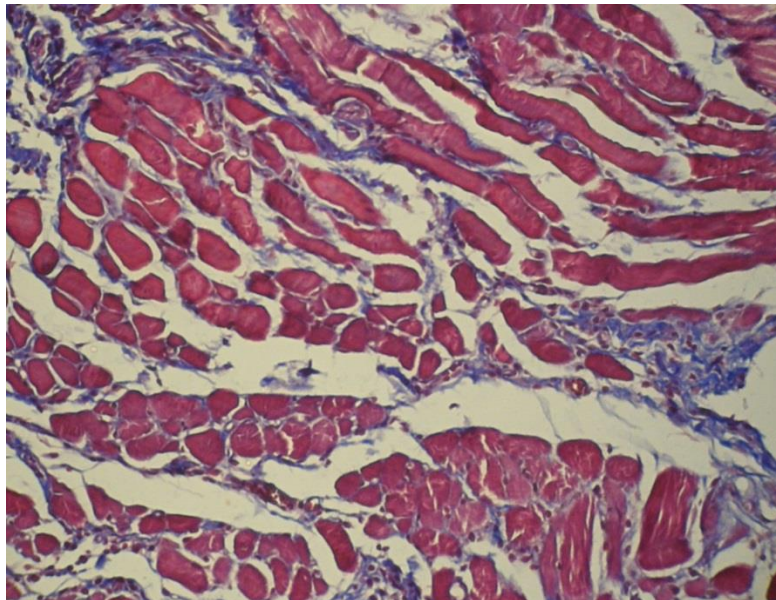


Рис. 3.12. Мікрофотографія. Десята доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Ділянки проліферації фіброblastів у структурах ендомізію. Забарвлення за методом Н.З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

На 21–25-ту добу виявлені вогнища ангиогенезу і регенерації, відмічено грануляційну тканину на етапі дозрівання у рубець із великою кількістю клітин (переважно фібробластів) та кровоносних судин, в яких здійснюється кровотік (рис. 3.13).

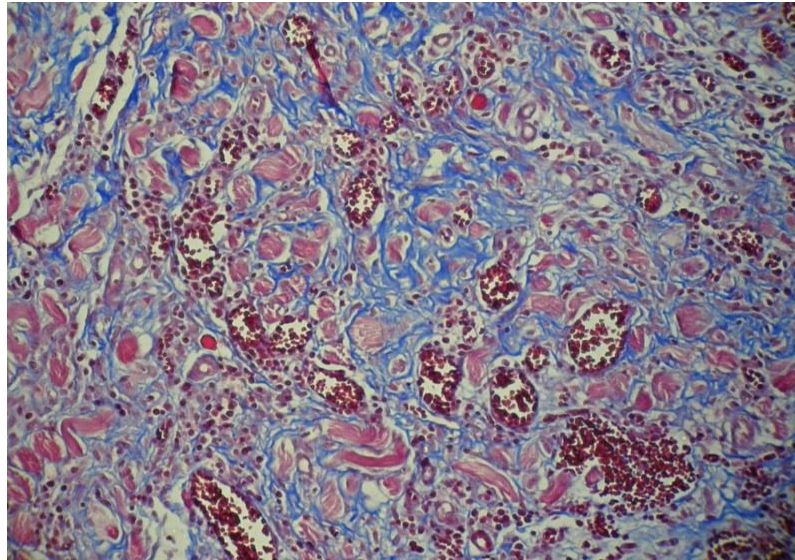


Рис 3.13. Мікрофотографія. Двадцять п'ята доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Кровоносні судини, в яких здійснюється кровотік. Зabarвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

Отже, трансплантація клітин кордової крові в ішемізовану м'язову тканину призвела до активації компенсаторно-відновних процесів, що характеризувалося появою на 5-ту добу після трансплантації перших молодих ендотеліоцитоподібних клітин. При гістологічному дослідженні біоптатів вже на 10–14 доби після клітинної трансплантації фіксували появу новоутворених капілярів з онаками функціонування. До 25-ої доби після трансплантації клітин кордової крові відмічено наявність функціонуючих новоутворених капілярів, які, анастомозуючи один з одним, утворювали розгалужену мережу судин.

3.3. Імуногістохімічні зміни структури м'язової тканини кінцівки за умов експериментальної ішемії

За допомогою імуногістохімічного методу визначення експресії віментину та фактора Віллебранда досліджено стан м'язової тканини дослідних тварин I та II груп у різні терміни експериментальної ішемії.

У I групі дослідних тварин експресія віментину та фактору Віллебранда визначалась нерівномірно та змінювались під час проведення дослідження.

Імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, особливо була виражена на 2 і 7 добу експериментальної ішемії в повнокровних судинах ендомізію та перимізію (рис. 3.14).

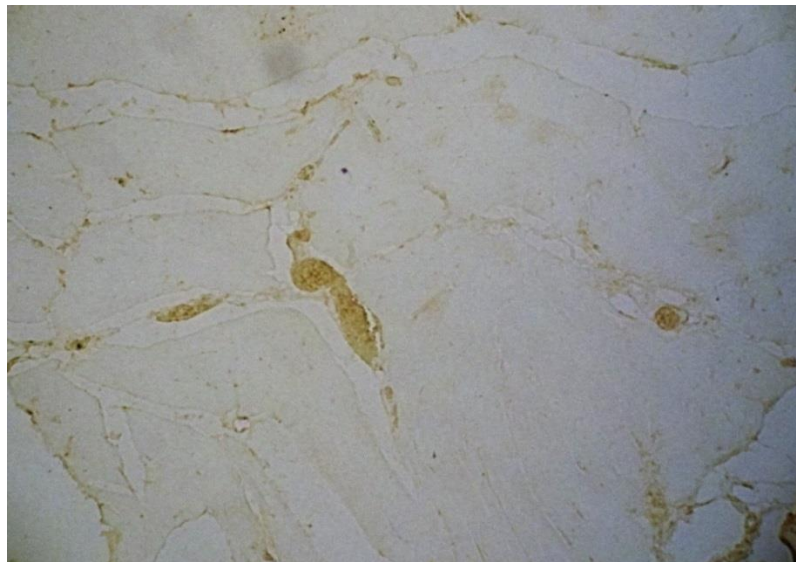


Рис. 3.14. Мікрофотографія. Друга доба ішемії. Експресія фактору Віллебранда в ендотеліоцитах на тлі повнокров'я капілярів і судин венозного типу, стаз еритроцитів. Полімерний метод визначення експресії фактора фон Віллебранда (поліклональне антитіло проти фактора Віллебранда) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодином. Ок. 10, Об. 10.

Імуногістохімічна реакція на віментин була найбільше виражена в міжм'язових волокнах, що оточують судинні пучки, та в мембранах стінки судин, і спостерігалась на 10–14 добу змодельованої ішемії (рис. 3.15).

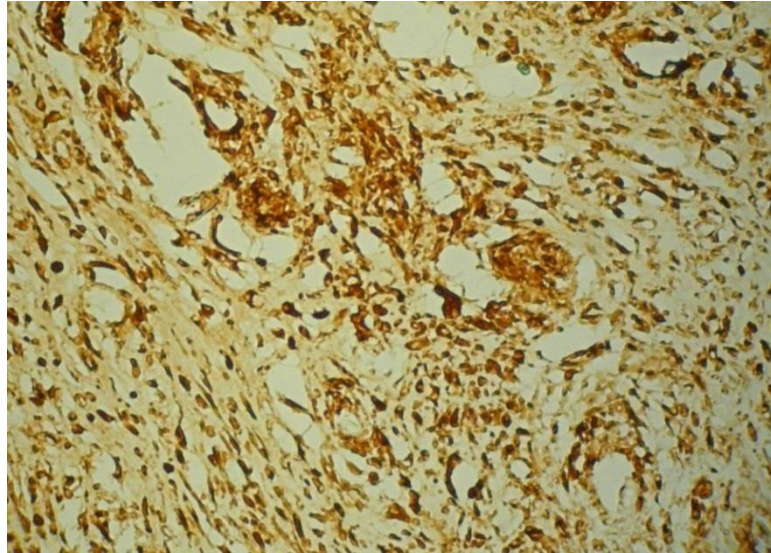


Рис. 3.15. Мікрофотографія. Десята доба змодельованої ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональне антитіло проти віментину, V9) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодинам. Ок. 10, Об. 10.

Окрім того, на тлі дистрофії і деструкції міопласту були виявлені вогнища фрагментації мезенхімальних структур, які зменшувалися і зникали до 21–25 доби після моделювання ішемії (рис. 3.16).

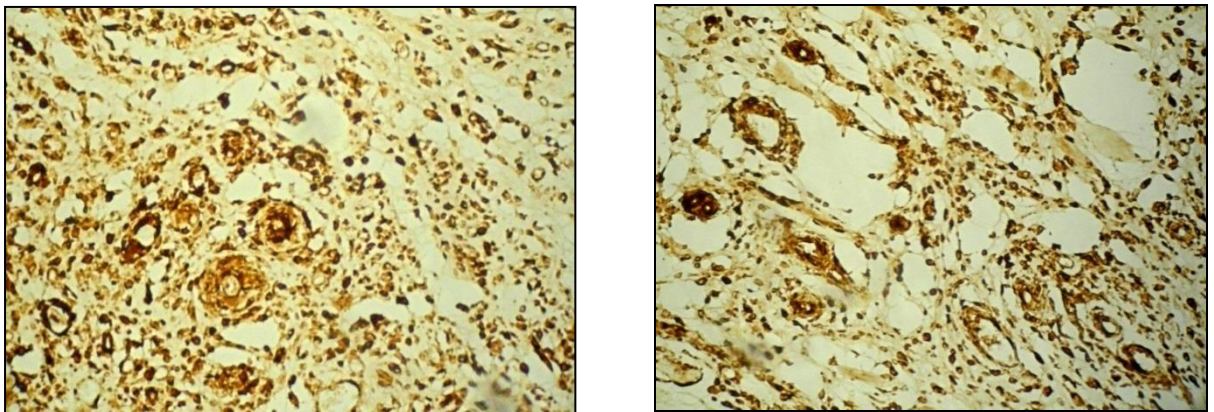


Рис. 3.16 Мікрофотографія. 25 доба змодельованої ішемії. Експресія віментину в перимізії довкола судин. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональне антитіло проти віментину, V9) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодинам. Ок. 10, Об. 10.

Отже, варто вказати, що у I групі тварин експресія фактора Віллебранда, що експресується в ендотеліальних структурах судин, особливо виражена в повнокровних судинах, в ендомізії та перимізії на 2 і 7 добу ішемії, що свідчить про активацію первинного тромбоцитарно–судинного гемостазу (реакція ендотелію на ішемію), а пік імуногістохімічної реакції на віментин відмічено на 10–14 добу змодельованої ішемії.

Починаючи з 5-ої і, особливо, з 10-14-ої доби, у II групі дослідних тварин після введення клітин кордової крові в ішемізовану кінцівку, ознаки характерні для гіпоксії поступово зникали. Інтерстицій густо заселений віментин-позитивними мультипотентними клітинами. Спостерігали наявність макрофагів та формування первинних судинних структур (Рис. 3.17, 3.18).

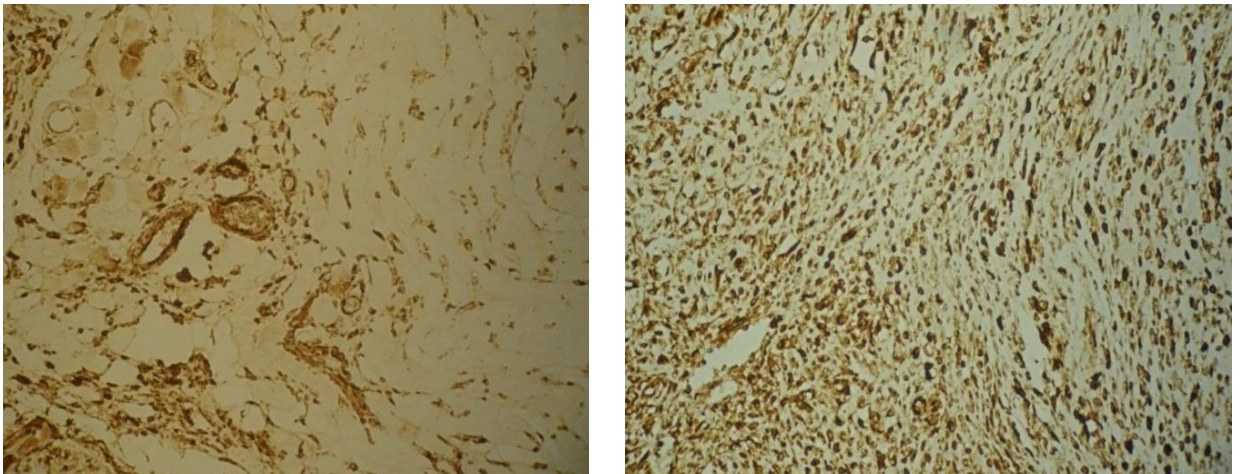


Рис. 3.17. Мікрофотографія. Колаж. Десята доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія віментину в первинних судинних структурах. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональне антитіло проти віментину V9) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодинам. Ок. 10, Об. 10.

На 21-у добу визначались осередки ангіогенезу і регенерації з множинними дрібними судинами, розташованими в сполучнотканинних і фіброзних вогнищах. Також виявлено зрілі віментин-позитивні

ендотеліюцити кровоносних судин, як показник стимульованого ангіогенезу (рис. 3.19).

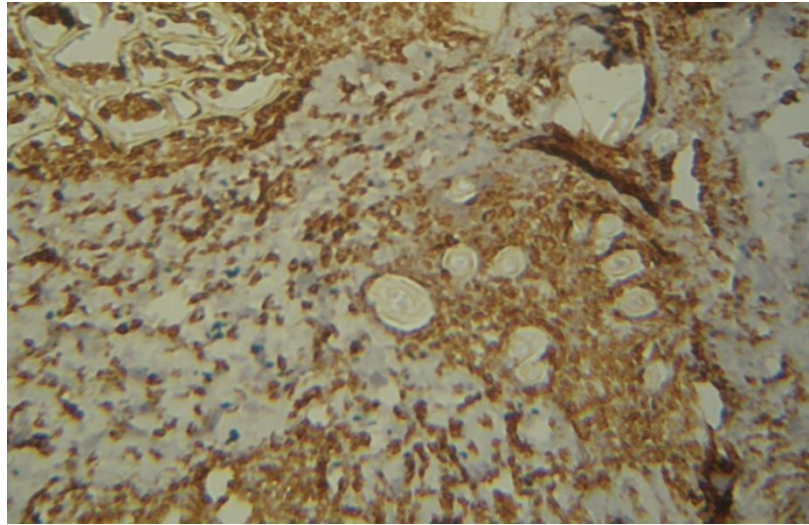


Рис. 3.18. Мікрофотографія. Чотирнадцять доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія віментину в перимізії докола новоутворених судин. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональне антитіло проти віментину V9) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодинам. Ок. 10, Об. 1.

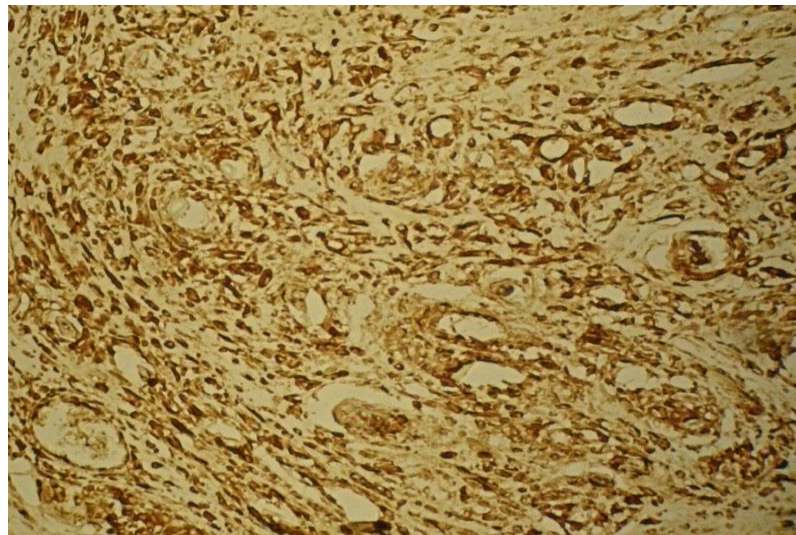


Рис. 3.19. Мікрофотографія. Двадцять перша доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Вогнища ангіогенезу з множинними судинами. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональне антитіло проти віментину V9) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодинам. Ок. 10, Об. 10.

Крім того, відмічаються дрібні дисеміновані групи клітин з чітким позитивним забарвленням на фактор Віллебранда (Рис. 3.20), що дозволяє констатувати виражений ангиогенез у цих щурів вже на 10-14 добу і подальший термін.

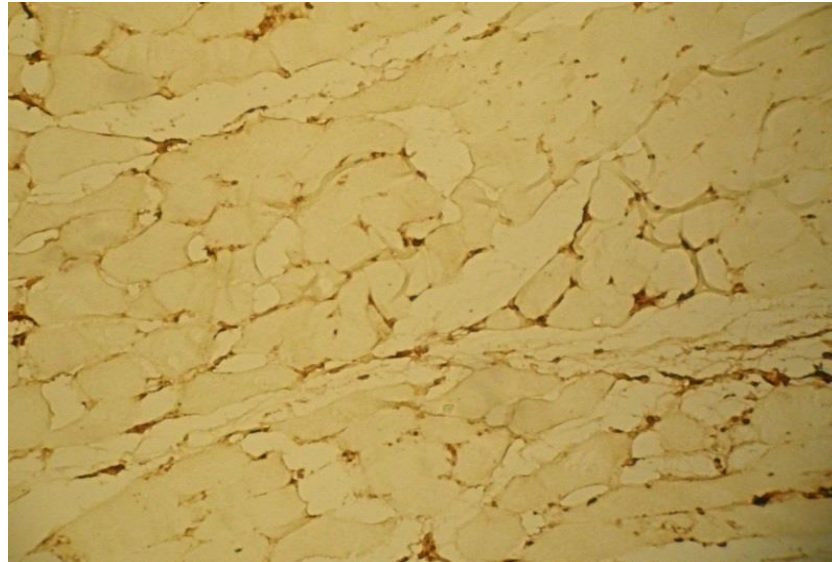


Рис. 3.20. Мікрофотографія. Десята доба після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія фактору Віллебранда в перимізій з новоутвореними ендотеліоцитами. Полімерний метод визначення експресії фактора фон Віллебранда (поліклональне антитіло проти фактора фон Віллебранда) з пероксидажною міткою та дофарбовуванням діамінобензодинам. Ок. 10, Об. 10.

Отже, після трансплантації клітин кордової крові на тлі ішемії кінцівок у тварин дослідної групи (II група) виявлено постійну структурну стимуляцію регенераторних процесів і ангиогенезу. На 10 – 14-ту добу експерименту наявний кровотік у “молодих” судинах, що підтверджувалося дослідженням експресії фактору Віллебранда. Разом з цим відмічені позитивні дані про зменшення і відсутність фіброзування, які характерні для розвитку ішемії, що підтверджується дослідженнями мезенхімального фактору віментину.

При гістологічному та імуногістохімічному дослідженні в експериментальних тварин (I групи) первинні ознаки компенсаторного

ангіогенезу вперше поодинокі фіксували на 25-ту добу експерименту, що характеризувалося появою функціонально незрілих ендотеліоцитів. Однак, наявність поодиноких клітин з посиленою (компенсаторною) функціональною активністю суттєво не впливає на загальну функцію капіляру.

Результати проведеного гістологічного та імуногістохімічного дослідження вказують на активацію регенераторних процесів та ангіогенезу в II групі щурів (тварини, яким на фоні змодельованої ішемії було трансплантовано стовбурові клітини кордової крові).

Ознаки розладу кровообігу та дистрофії м'язів менше виражені вже на 1 – 2 добу експерименту (4–6 доба після клітинної трансплантації). Це свідчить про більш виражений характер компенсаторних реакцій та стійкість до ішемічного ураження.

Наведені дані свідчать про покращання кровотоку в ішемізованих кінцівках після проведення трансплантації клітин кордової крові в порівнянні з тваринами I групи (щури, яким змодельовано ішемію кінцівок без трансплантації клітин кордової крові).

Аналіз проведеного дослідження свідчив, що ангіогенез відбувається, вірогідно, як за рахунок ендотеліальних клітин раніше існуючих судин, так і внаслідок стимуляції репаративних процесів і можливої безпосередньої трансформації трансплантованих клітин кордової крові.

Це вказує на ефективність трансплантації стовбурових клітин кордової крові з метою стимуляції процесів ангіогенезу при ішемічних розладах м'язів в експерименті та свідчить про доцільність проведення досліджень цього напрямку в клінічних умовах.

Основні положення розділу 3 опубліковані в роботах автора: [1], [3], [4], [6], [7], [10], [12], [16], [17], [18], [19].

РОЗДІЛ 4

КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ

4.1. Клінічна картина у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок після клітинної трансплантації

Ефективність клітинної трансплантації оцінювали враховуючи клінічний стан хворого за допомогою інструментальних методів дослідження (рентгенконтрасна ангіографія, лазерна флоуметрія мікроциркуляторного русла), а також проаналізували рівень якості життя пацієнтів з дистальним ураженням артеріального русла після лікування.

У більшості клінічних випадків після проведення трансплантації стовбурових клітин кордової крові спостерігали позитивну клінічну динаміку.

Протягом першого місяця після клітинної трансплантації хворі відмічали поступове покращення самопочуття, зменшувався, а надалі був відсутнім біль у стані спокою, зменшувались трофічні розлади та загоювались крайові некрози пальців, поступово збільшувалась дистанція безбольової ходи до 100 м та швидкість безбольової ходьби.

Через 3 місяці після клітинної трансплантації пацієнти повторно обстежувались для подальшої оцінки загального стану. Відмічено збільшення дистанції безбольової спокійної ходи до 150 м у 2-ох пацієнтів, до 200 м у 7-ми пацієнтів. Скарги на болі спокою в нижніх кінцівках та парестезії відсутні у 100 % пацієнтів.

Окрім покращення місцевого статусу, відмічено покращення загального стану, збільшилась працездатності та загальної активності.

При огляді та обстеженні пацієнтів через 6 місяців після клітинної трансплантації відмічено збільшення загальної дистанції безбольової ходи, що складала близько 250 м у 7-ми пацієнтів та близько 300 м у 6-ти пацієнтів.

Усі пацієнти працездатні, ведуть активне соціальне та побутове життя. Відсутні болі спокою та значно зменшились парестезії в кінцівках.

Проте одній пацієнтці (7,7 %) з дистальною формою ураження через 6 місяців після клітинної трансплантації була виконана ампутація кінцівки. Незважаючи на покращення клінічного стану та переходу ступеня ішемії з 4 класу за Рутерфордом на 3 клас, на тлі гострого порушення мозкового кровообігу зафіксували гострий артеріальний тромбоз підколінної артерії. Хвора не підлягала проведенню реконструктивних операцій (враховуючи важкість загального стану пацієнта обумовленого порушенням мозкового кровообігу та ураженням дистального артеріального русла хворої кінцівки), а призначена консервативна терапія мала недовготривалий результат. У зв'язку з погіршенням загального стану та появою вираженого больового синдрому кінцівка була ампутувана. Пацієнтка вибула з основної групи, проте її результати, отримані в попередні терміни, враховуються в нашому дослідженні.

Через 12 місяців після клітинної трансплантації стан пацієнтів стабільно добрий. 92,3 % пацієнтів працездатні, соціально та побутово адаптовані. Дистанція безбольової ходи у помірному темпі стабільна: близько 300 м у 5-ти пацієнтів та до 350 м у 7-и пацієнтів. Шкіра нижніх кінцівок (гомілка, стопа) – волога, тургор задовільний, тепла на дотик, без трофічних розладів.

У більшості пацієнтів протягом року після трансплантації клітин кордової крові в ішемізовану м'язову тканину ураженої кінцівки спостерігали зменшення ступеню ішемії згідно класифікації Рутерфорда (табл. 4.1).

У ході дисертаційного дослідження основній та контрольній групам було виконано рентгенангіографічне дослідження для визначення рівня та протяжності ураження артеріального русла. В обох групах на ангіограмах відмічається ураження просвіту магістральних артерій кінцівки, локалізація

та розповсюдженість яких була індивідуальна (рис. 4.1, 4.2). Контрастування коллатеральної сітки вздовж уражених магістральних судин було незначним.

Таблиця 4.1

Динаміка ступеню ішемії кінцівки після трансплантації

Ступінь хронічної ішемії за Рутерфордом	Клас	Кількість хворих до клітинної трансплантації	Кількість хворих через 12 міс після клітинної трансплантації	Ступінь хронічної ішемії за Фонтейном
0	0	–	–	0
I	1	–	–	I
I	2	–	3	IIa
I	3	–	2	IIб
II	4	–	3	
III	5	9	4	III
IV	6	4	–	IV
Всього		13 (100 %)	12 (92,3 %)	



Рис. 4.1. Ангіограма основної групи до лікування.

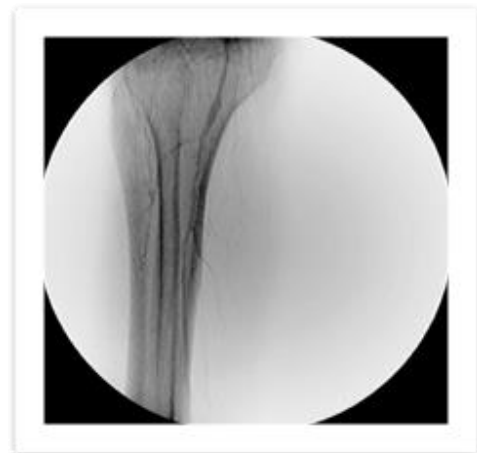


Рис.4.2. Ангіограма контрольної групи до лікування.

Контрольне рентгеноконтрастне ангіографічне дослідження виконували основній групі не раніше, ніж через 6–12 місяців після клітинної

трансплантації. За результатами контрольної рентгеноконтрастної ангіографії судин нижніх кінцівок у 92,3 % пацієнтів діагностовано покращення дистального кровотоку завдяки розвинутій колатеральній мережі вздовж облітерованих магістральних артерій (рис. 4.3).

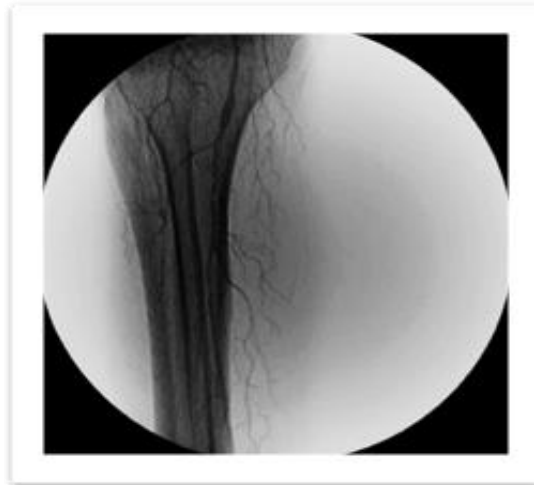


Рис. 4.3. Ангіограма основної групи через 12 місяців після трансплантації клітин кордової крові.

Отже, результати клінічного дослідження вказують на позитивний ефект після трансплантації стовбурових клітин кордової крові пацієнтам з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. У післятрансплантаційному періоді поступово зменшувались клінічні прояви ішемічного ураження, зникав біль спокою, збільшувалась дистанція та швидкість безбольової ходьби, що є маркером зменшення ступеню ішемії. Позитивні зміни клінічного статусу підтверджувались результатами рентгеноконтрастної ангіографії: фіксували наявність вираженої колатеральної мережі та посилення кровообігу в ураженій кінцівці, що, у свою чергу, призводить до суттєвого покращення загального стану пацієнтів та досягнення стійкої і тривалої ремісії.

4.2. Оцінка стану мікроциркуляторного русла у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок після клітинної трансплантації

З метою оцінки стану мікрогемодинаміки та ендотеліальної функції у хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу нами проведено лазерну доплерівську флоуметрію до та після трансплантації стовбурових клітин кордової крові з визначенням таких показників як: показник мікроциркуляції, резерв капілярного кровотоку, показник шунтування тканинного кровотоку та інші показники (табл. 4.2).

Для контролю нормативних показників обстежено 15 практично здорових волонтерів, без ознак ураження судин нижніх кінцівок.

При аналізі показників ЛДФ у хворих із хронічною ішемією кінцівок до трансплантації клітин кордової крові було достовірно ($p < 0,01$) більшим значення Мф – показника мікроциркуляції на фоновому запису з передпліччя лівої руки $7,02 \pm 1,04$ у порівнянні з нормою 4,6–6,0, що вказує на зміни в судинному руслі. Значення параметрів РККо було достовірно ($p < 0,01$) меншим у хворих до початку лікування $119,2 \pm 14,0$ у порівнянні з нормою 200–400. Значення ПМ у хворих мало тенденцію до зниження ($5,57 \pm 2,80$) при нормі 12–25 пф. од. За даними вейвлет-аналізу, у всіх хворих максимальна амплітуда ендотеліальних флаксмоцій – АmaxЕ та нейрогенних флаксмоній – АmaxН була достовірно більшою $0,84 \pm 0,12$ та $0,90 \pm 0,11$ порівняно з нормою – $0,29 \pm 0,04$ ($p < 0,05$) та $0,37 \pm 0,07$ ($p < 0,002$) відповідно. Це пов'язано з субмаксимальним напруженням системи L-аргінін – оксид азоту у зв'язку з переключенням регуляції системи мікроциркуляції на активні механізми: ендотеліальний і нейрогенний при прогресуючій ішемії, внаслідок ураження магістральних артеріальних судин при облітеруючих захворюваннях артерій кінцівок. Тобто, відмічається компенсаторна дилатація прекапілярних сфінктерів за рахунок зменшення нейротонусу і збільшення викиду оксиду азоту (табл. 4.2).

Таблиця 4.2.

Розподіл показників лазерної доплерівської флоуметрії

Параметри ЛДФ	до лікування n=13	1 міс. n=13	3 міс. n=13	6 міс n=13	12 міс n=12	Норматив n=15
Мф – показник мікроциркуляції фон. (пф.од.)	3,01±0,11 p<0,01	3,09±0,16 p<0,01	4,06±0,14 p<0,01	4,08±0,19 p<0,01	4,51±0,11 p<0,01	5,5±0,08
РККо – резерв капілярного кровотоку оклюзивної проби (%)	119,2±5,58 p<0,01	148,88±6,21 p<0,01	193,75±5 p<0,01	230,9±5,85 p<0,01	232,41±7,83 p<0,01	347,97±9,39
РККн – резерв капілярного кровотоку нітрогліцеринової проби (%)	103,67±6,85 p<0,01	229,22±6,88 p<0,01	291,11±6,4 p<0,01	388,33±5,36 p<0,01	352,38±6,79 p<0,01	442,23±13,27
ПМ – показник мікроциркуляції 1 пальця стопи (пф.од.)	5,57±0,53 p<0,01	10,84±0,8 p<0,01	11,78±0,29 p<0,01	12,85±0,2 p<0,01	13,09±0,17 p<0,01	20,53±0,62
АтахЕ – максимальна амплітуда ендотеліальних флаксмоцій (пф.од.)	0,84±0,05 p<0,01	0,63±0,04 p<0,01	1,12±0,03 p<0,01			0,29±0,08
АтахН – максимальна амплітуда нейрогенних флаксмоцій (пф.од.)	0,9±0,02 p<0,01	1,22±0,02 p<0,01	0,42±0,01 p<0,05			0,37±0,08
АтахМ – максимальна амплітуда міогенних флаксмоцій (пф.од.)	0,28±0,02 (p>0,05)	0,32±0,01 (p>0,05)	0,32±0,04 (p>0,05)			0,32±0,06
АтахД – максимальна амплітуда респіраторних флаксмоцій (пф.од.)	0,18±0,02 p<0,05	0,28±0,03 (p>0,05)	0,39±0,06 p<0,05			0,24±0,01
АтахС – максимальна амплітуда серцевих флаксмоцій (пф.од.)	0,28±0,03 p<0,05	0,27±0,04 p<0,05	0,34±0,04 (p>0,05)			0,41±0,04
ПШ – показник шунтування (у.о.)	2,53±0,07 p<0,01	2,45±0,13 p<0,01	1,87±0,12 p<0,01	1,38±0,07 p<0,01	1,17±0,01 (p>0,05)	1,13±0,02

При цьому також зростає артеріоло-венулярне шунтування, як компенсаторний перерозподільний механізм, що підтверджується отриманими нами даними показника шунтування, який був більшим у досліджуваній групі і складав $2,53 \pm 0,49$ у.о. ($p < 0,01$) порівняно з нормою – $1,13 \pm 0,14$.

При порівнянні параметрів ЛДФ у динаміці лікування через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові відмічається достовірне ($p < 0,01$) зменшення Мф $3,08 \pm 1,06$ пф.од. проти $7,02 \pm 1,04$ пф.од. до лікування ($< 56\%$). При цьому значення РККн достовірно ($p < 0,01$) збільшувалось. Якщо на початок дослідження воно складало $103,67 \pm 6,85\%$, то через місяць цей показник був $229,22 \pm 6,88$ ($p < 0,01$). Щодо ПМ відмічена тенденція до збільшення значень показника мікроциркуляції за рахунок, розширення існуючих капілярів і, можливо, утворення нових капілярних судин внаслідок залучення в кровотік не функціонуючих капілярів, а також за рахунок активації процесів новоутворення капілярного русла. Також має місце вплив трансплантованих клітин на ендотелій-незалежний механізм вазодилатації, здебільшого, за рахунок зниження міотонусу і нейротонусу прекапілярів.

При порівнянні значень ЛДФ у хворих на ішемію кінцівок до початку трансплантації клітин кордової крові та через 3 місяці після лікування можна відмітити нормалізацію Мф з $7,02 \pm 1,04$ пф.од. до $4,06 \pm 0,79$ пф.од. ($< 42\%$), у порівнянні з початковими даними. При цьому значення РККо достовірно збільшувалось з $119,2 \pm 14,0\%$ до $193,75 \pm 21,6\%$ ($> 62,5\%$) у порівнянні з вихідними даними, можливо за рахунок системи L-аргінін – оксид азоту, яка вивільняє NO-релаксуючий фактор під впливом ацетилхоліну (на M1 і M2 рецептори ендотелію при манжеточній пробі). Стосовно РККн відмічено тенденцію до його збільшення, але його значення все одно лишалось дещо нижче контрольних показників.

Цікавим фактом виявилась тенденція до зниження показника мікроциркуляції на пальцях нижніх кінцівок. Але за даними вейвлет-аналізу АтахД достовірно збільшувалась з $0,18 \pm 0,04$ пф.од. до $0,39 \pm 0,04$ пф.од.

($p < 0,01$) у порівнянні з вихідними даними, також мала місце тенденція до збільшення значення максимальної амплітуди ендотеліальних флаксмоцій. Такі зміни гемодинаміки свідчать про поліпшення стану мікрогемодинаміки за рахунок, в першу чергу, пасивних механізмів регуляції системи мікроциркуляції (АтахД), а також активних – ендотеліального компоненту. Збільшення абсолютного значення ПМ слід пояснити загальним покращенням процесів мікроциркуляції у хворих з хронічною ішемією кінцівок після трансплантації клітин кордової крові.

Аналізуючи значення ЛДФ у хворих на ішемію кінцівок через 6–12 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові, можна відмітити нормалізацію Мф до $4,51 \pm 0,75$ пф.од. (рис. 4.4).

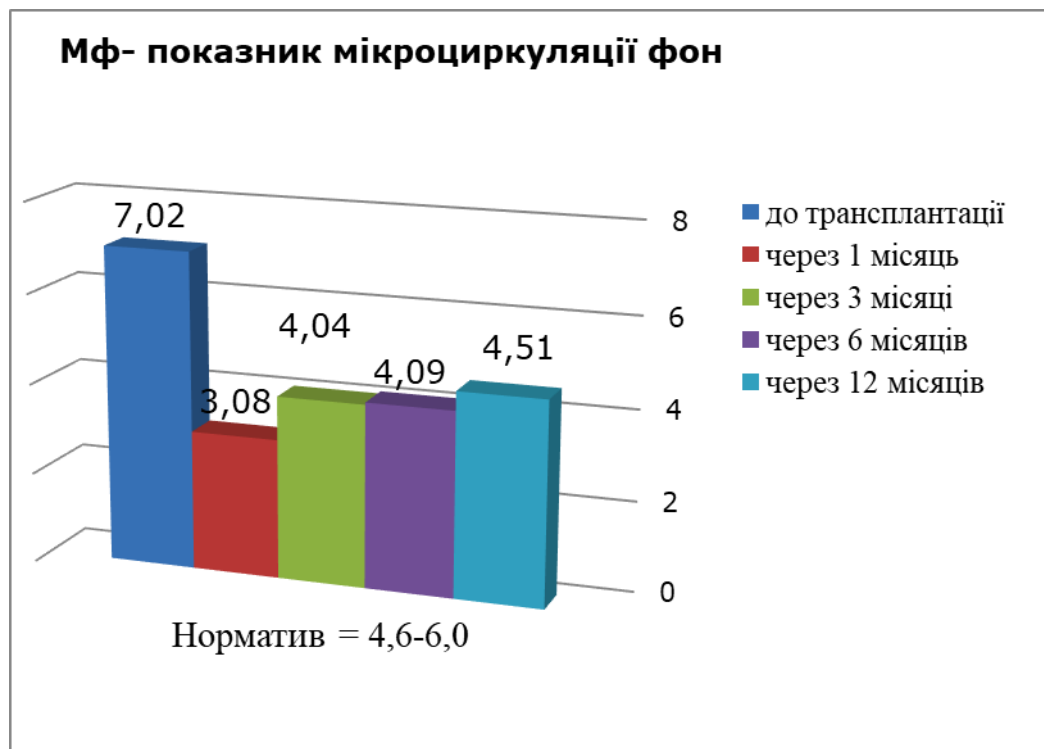


Рис. 4.4. Динаміка показника мікроциркуляції фонового I пальця стопи (Мф.) у пацієнтів до та після трансплантації стовбурових клітин кордової крові.

Спостерігається покращення мікроциркуляторних показників, які відображаються рівнем РККо та РККн, починаючи з кінця першого і до 12 місяця після клітинної трансплантації до $232,4 \pm 21,6$ % ($p < 0,01$) та

352,0±29,0 % ($p<0,01$) відповідно. При цьому значення РККо достовірно збільшувалось на 95 % (рис. 4.5). Такі зміни гемодинаміки свідчать про поліпшення стану мікрогемодинаміки внаслідок покращення венулярного відтоку, а також поліпшення ендотелійзалежної вазодилатації, що відбувається за рахунок посилення впливу на мікрогемодинаміку активних і пасивних механізмів регуляції процесів капілярного кровотоку.

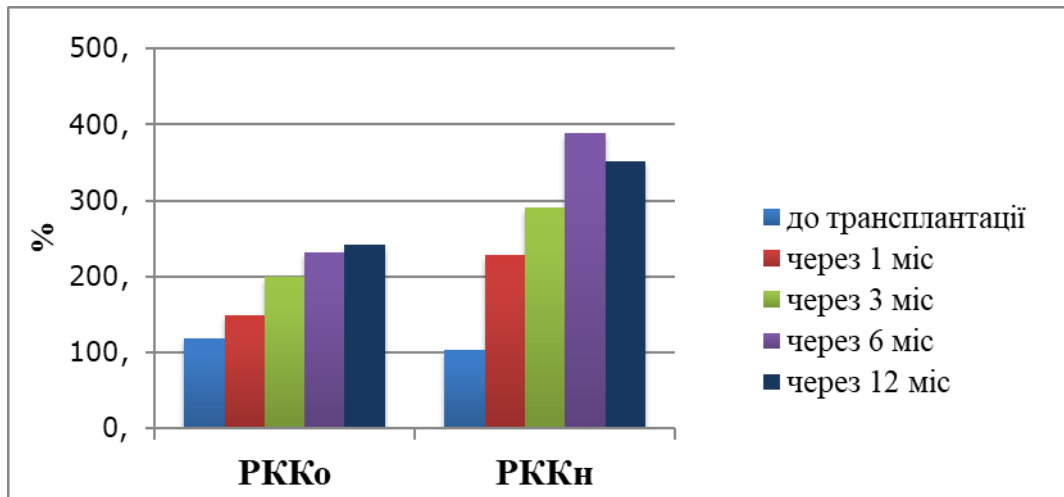


Рис. 4.5. Динаміка показника РККо та РККн у пацієнтів до та після трансплантації стовбурових клітин кордової крові.

Показник шунтування поступово зменшувався від $2,53\pm 0,49$ у.о. ($p<0,01$) при першому зверненні та до кінця 6 місяця набував значення $1,38\pm 0,22$ у.о. ($p<0,001$), фактично не відрізняючись від показників норми (рис. 4.6).



Рис. 4.6. Динаміка показника шунтування тканинного кровотоку у пацієнтів до та після трансплантації стовбурових клітин кордової крові.

Відмічена стійка тенденція до зростання показника мікроциркуляції I-го пальця стопи. Даний показник достовірно збільшувався з $5,57 \pm 2,80$ у.о. ($p < 0,05$) на початку, та до $13,09 \pm 2,19$ у.о. ($p_1 < 0,05$) через 12 місяців після трансплантації (рис. 4.7).

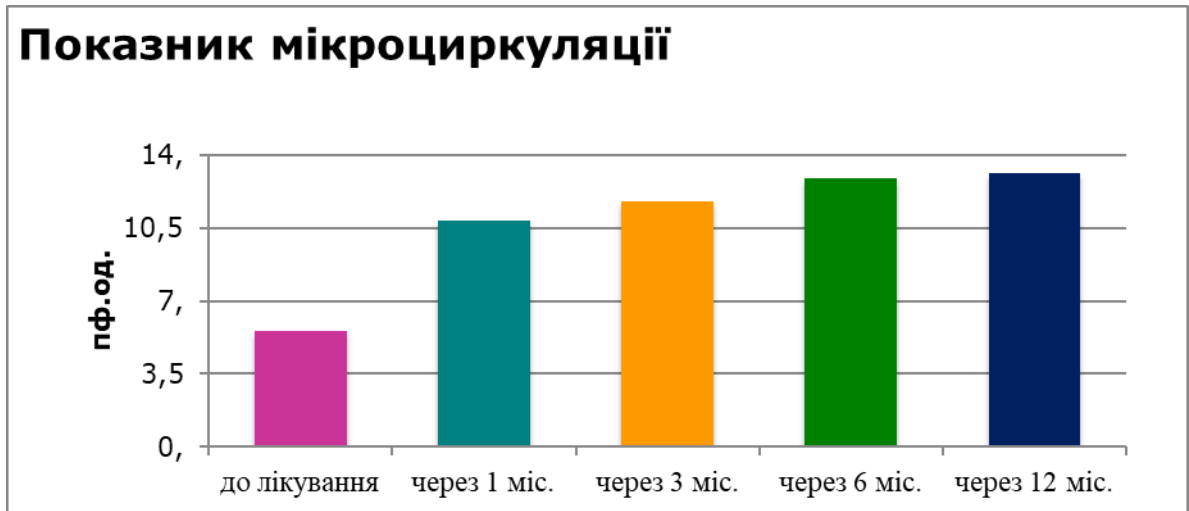


Рис. 4.7. Динаміка показника мікроциркуляції I-го пальця стопи у пацієнтів до та після трансплантації стовбурових клітин кордової крові.

До того ж, починаючи з 3 місяця і надалі, досліджуваний показник не відрізнявся від норми (норматив 12–25 у.о.). Збільшення значення показника шунтування пояснюється загальним покращенням процесів мікроциркуляції у хворих з хронічною ішемією кінцівок після трансплантації клітин кордової крові.

Отже, вже через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові відмічається покращення мікроциркуляції внаслідок дилатації прекапілярних сфінктерів за рахунок зниження нейротонусу, посилення артеріовенозного шунтування, покращення резерву капілярного кровотоку за рахунок поліпшення ендотелійзалежної вазодилатації.

Надалі, через 3-6 місяців спостерігли тенденцію до подальшої нормалізації показників мікроциркуляції за рахунок покращення венулярного відтоку, а також поліпшення ендотелійзалежної вазодилатації, що відбувається за рахунок посилення впливу на мікрогемодинаміку активних і пасивних механізмів регуляції процесів капілярного кровотоку.

Варто відмітити, що через 12 місяців після трансплантації клітин кордової крові спостерігаємо стабілізацію процесів мікроциркуляції, які досягають нормативу та коливаються в межах нижніх значень. Тобто, дані показники мають тенденцію до покращення та нормалізації.

4.3. Гістологічна характеристика ішемізованої м'язової тканини нижньої кінцівки після клітинної трансплантації

За допомогою гістологічного методу проведено дослідження біоптатів м'язової тканини пацієнтів з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу.

Забір матеріалу проводився по медіальній та латеральній поверхні гомілки через 1, 3, 6 та 12 місяців після трансплантації клітин кордової крові.

Аналізуючи результати проведеного гістологічного дослідження через один місяць після трансплантації клітин кордової крові, відмічено мозаїчні зміни структури тканин. На фоні набряку в біоптатах м'язової тканини мають місце скупчення молодих ендотеліоцитів та фібробластів (рис. 4.8), поодинокі новоутворені капіляри з ознаками функціонування – заповнені форменими елементами крові (рис. 4.9).

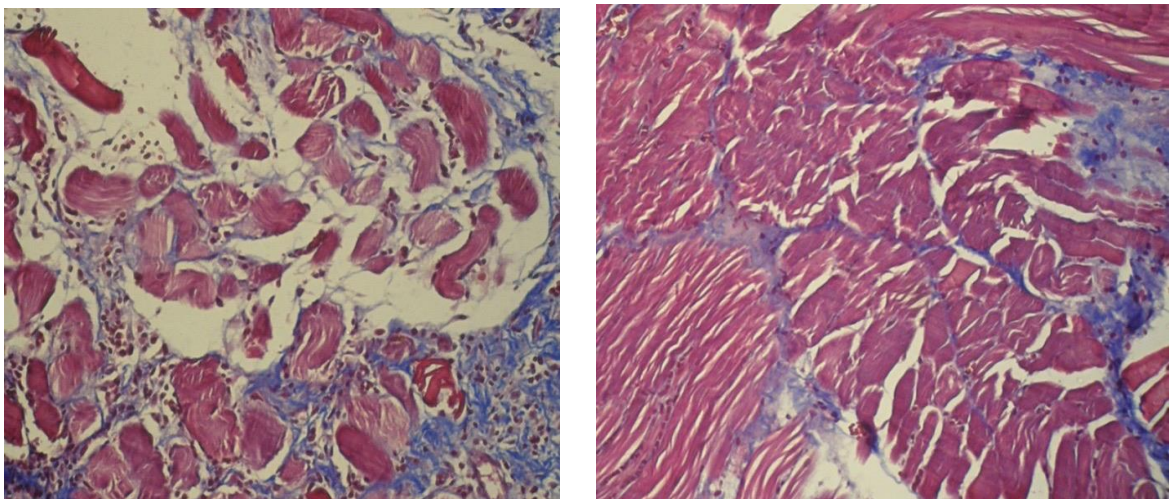


Рис. 4.8. Мікрофотографія. Через один місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Помірний набряк м'язових волокон та вогнища ендотеліальних клітин та фібробластів. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

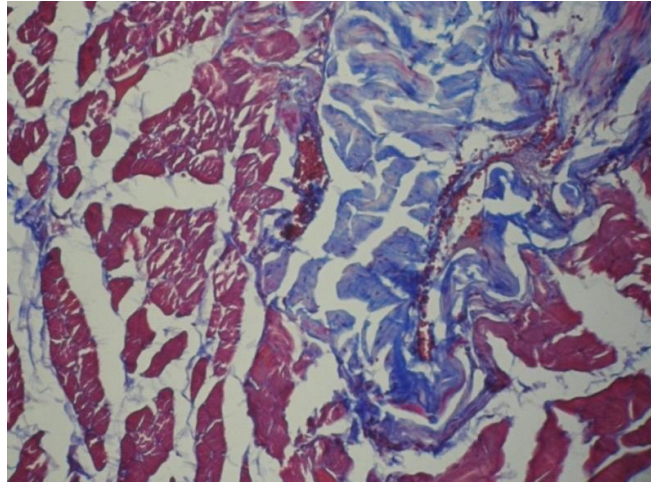


Рис. 4.9. Мікрофотографія. Через один місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Судинні тяжі та поодинокі «активні» капіляри. Зabarвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

Частина некротизованих м'язових клітин заміщуються сполучною тканиною (рис. 4.10).

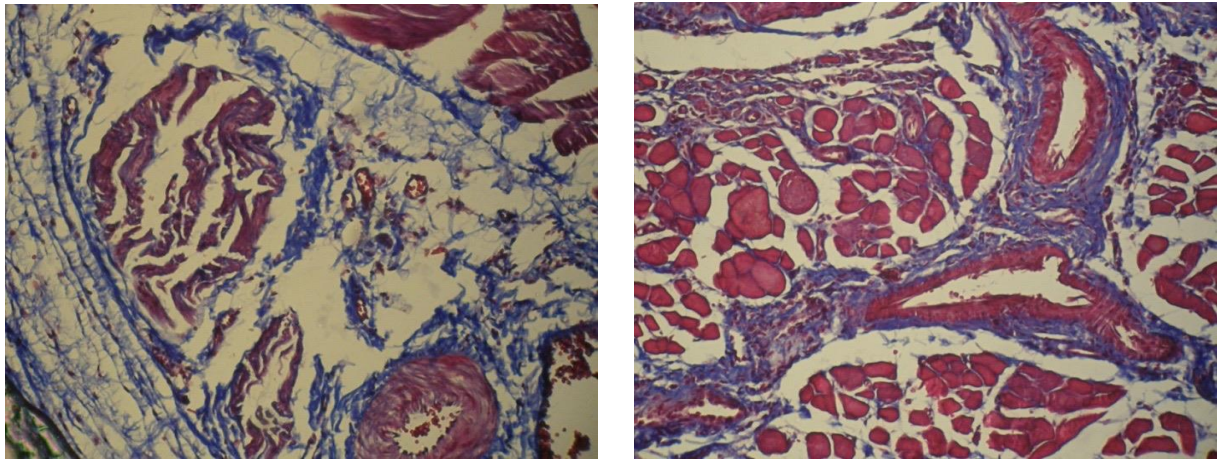


Рис. 4.10. Мікрофотографія. Через 1 місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Сполучнотканинні вогнища з поодинокими ділянками ангиогенезу. Зabarвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

Отже, результати гістологічного дослідження через один місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової вказують на активацію регенераторно-відновних процесів та формування м'язових волокон.

Гістологічне дослідження біоптатів м'язової тканини через три місяці після трансплантації стовбурових клітин кордової крові показало, що структура міосимпласту значно покращилася в порівнянні з попередніми результатами.

У біоптатах переважали ділянки без ознак деструкції, дистрофії та набряку м'язових волокон (рис. 4.11).

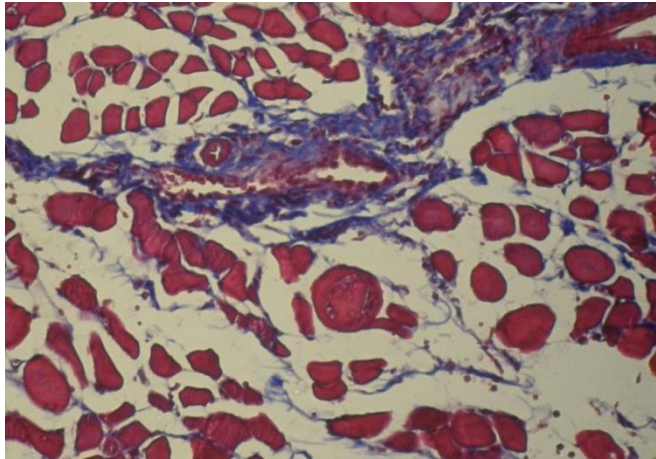


Рис. 4.11. Мікрофотографія. Через три місяці після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Міосимпласт, вогнища судин у перимізії. Зabarвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

Відмічено значне збільшення зон регенерації та новоутворених капілярів, які утворювали добре виражену і розгалужену судинну мережу, де здійснюється кровотік (рис. 4.12).

Отже, на третій місяць після клітинної трансплантації процеси регенерації м'язової тканини та формування новоутворених капілярів яскравіше виражені, ніж у попередній термін дослідження. Крім того, «молоді» капіляри активно анастомозують між собою, утворюючи мережу.

У зразках м'язової тканини на шостий місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової крові, виявляли багаточисельні вогнища регенерації (рис. 4.13; рис. 4.14).

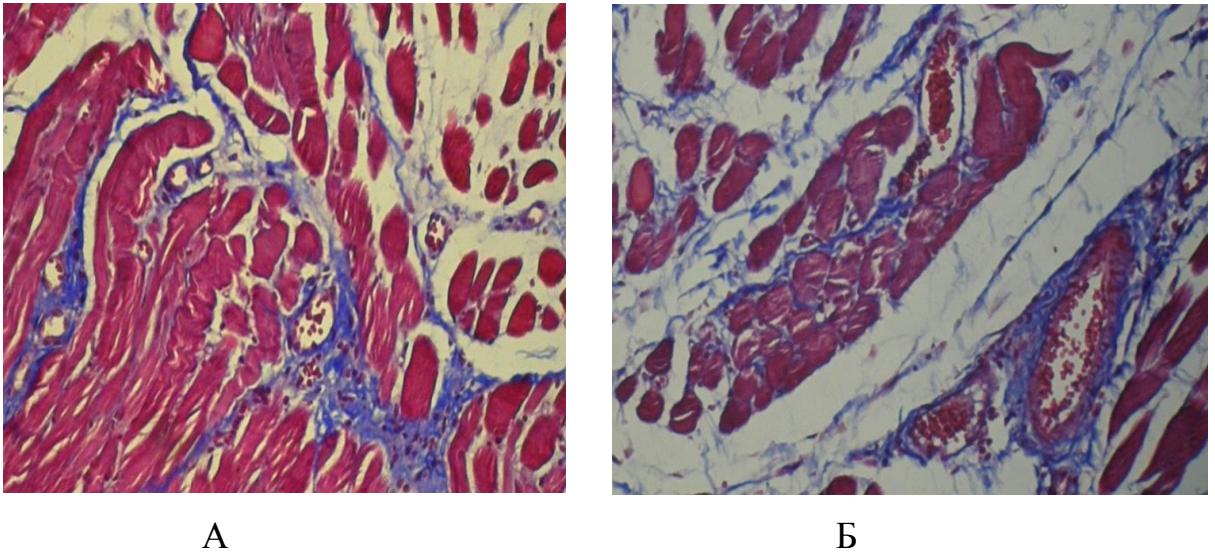


Рис. 4.12. Мікрофотографія. Через 3 місяці після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Кровоносні судини з функціонуючим кровотоком: А – в артеріолах; Б – у венулах. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

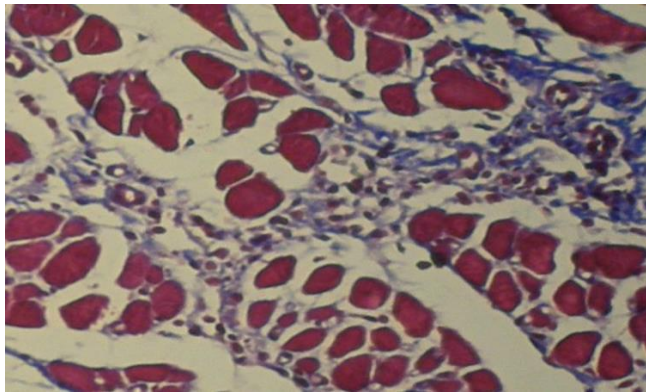


Рис. 4.13. Мікрофотографія. Через 6 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Вогнища регенерації м'язових волокон. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

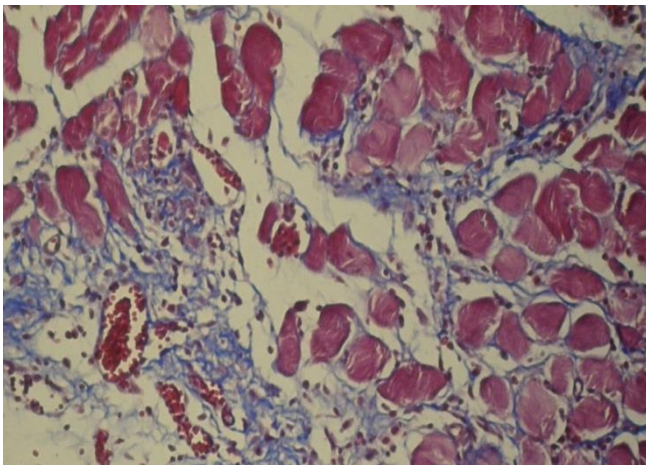


Рис. 4.14. Мікрофотографія. Через 6 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Вогнища регенерації м'язових волокон. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

Відмічено нормалізацію структури міосимпласту – появу поперечної посмугованості м'язових волокон (рис. 4.15) та зменшення ознак дистрофії.

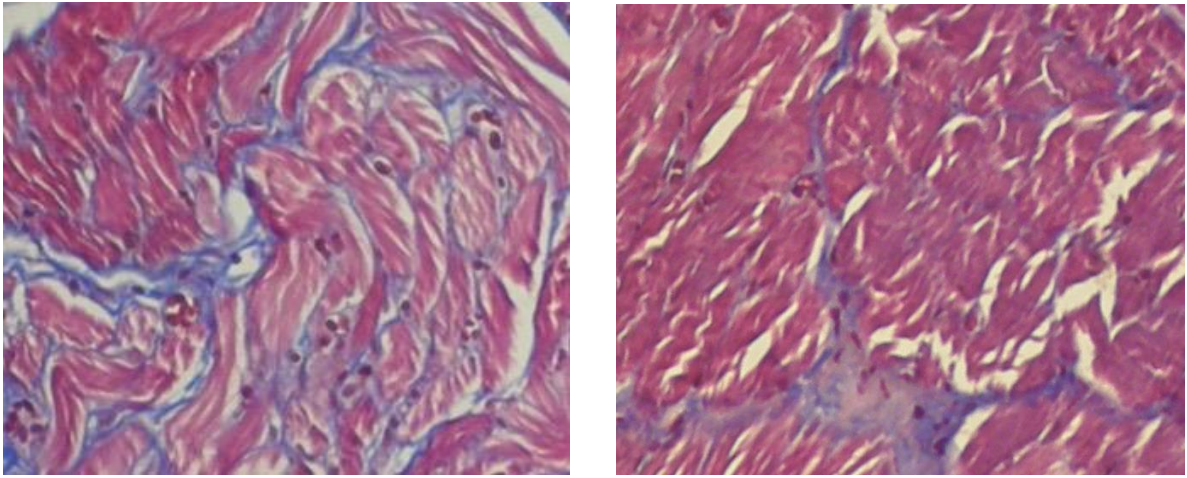


Рис. 4.15. Мікрофотографія. Через 6 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Поперечно-посмуговані м'язові волокна. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

Багаточисельні судинні пучки що виявлялись у міосимпласті, мали незмінену структуру, а сам міосимпласт мав незначні ознаки дистрофії (рис. 4.16).

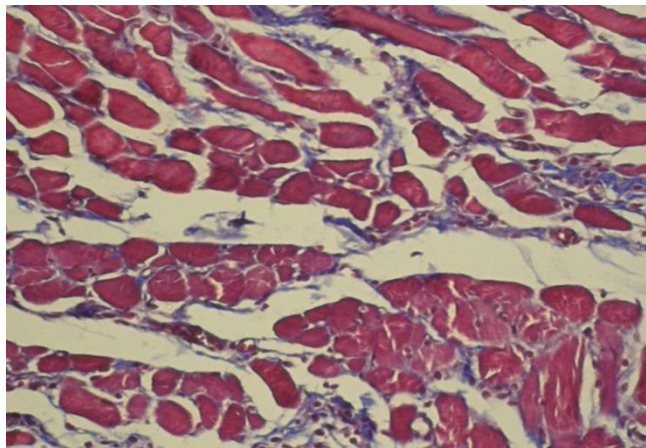


Рис. 4.16. Мікрофотографія. Через шість місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Нормальна структура міосимпласту. Забарвлення за методом Н.З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

Отже, через шість місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові і надалі спостерігаються процеси регенерації міосимпласту,

що проявляється утворенням «нових» судин та формування з них мережі функціонуючих капілярів. Такі дані вказують на пролонгацію процесів ангиогенезу.

За даними гістологічного дослідження біоптатів м'язової тканини, на дванадцятий місяць після трансплантації клітин кордової крові в міосимпласті відмічалися ділянки регенерації та ангиогенні структури (рис. 4.17).

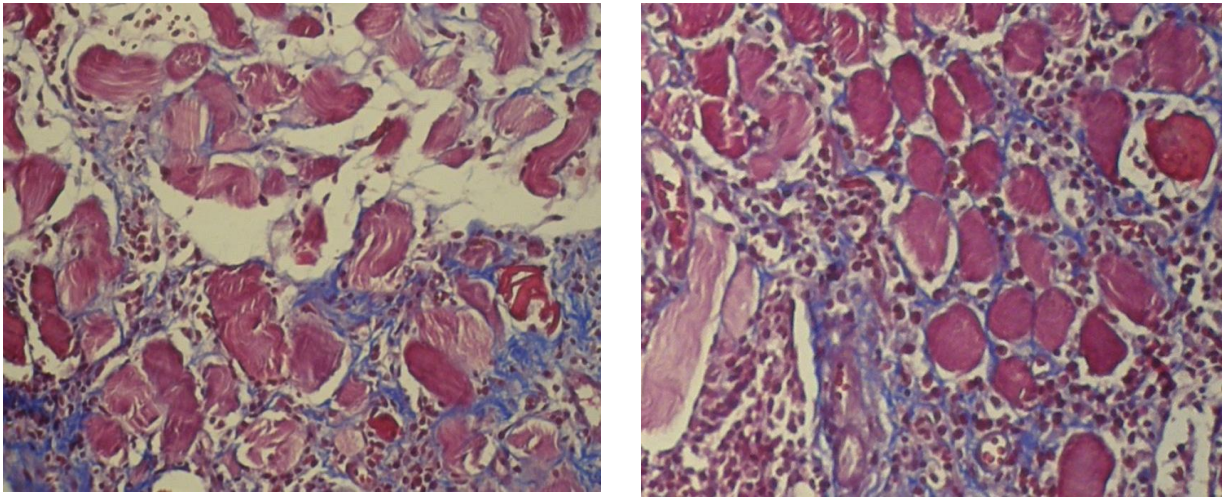


Рис. 4.17. Мікрофотографія. Через 12 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Міосимпласт з сегментами регенерації. Зabarвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

Проте кількість зон регенерації та вогнищ ангиогенезу дещо менша, порівняно з попередніми термінами дослідження (3 та 6 місяць після клітинної трансплантації). До того ж, на тлі процесів регенерації відмічаються поодинокі ділянки набряку перимізію (рис. 4.18) та периваскулярного склерозу (рис. 4.19).

Через 12 місяців після клітинної трансплантації відмічено триваючу регенерацію міосимпласту та процеси васкуло–ангиогенезу, однак ступінь їх проявів дещо менша в порівнянні з попередніми термінами.

Тобто, має місце поступова стабілізація регенераторної реакції та процесу компенсаторного ангиогенезу. У міосимпласті зустрічались лише

поодинокі нерівномірно розташовані набряково–дистрофічні вогнища, а новоутворені капіляри формували активно функціонуючу судинну мережу.

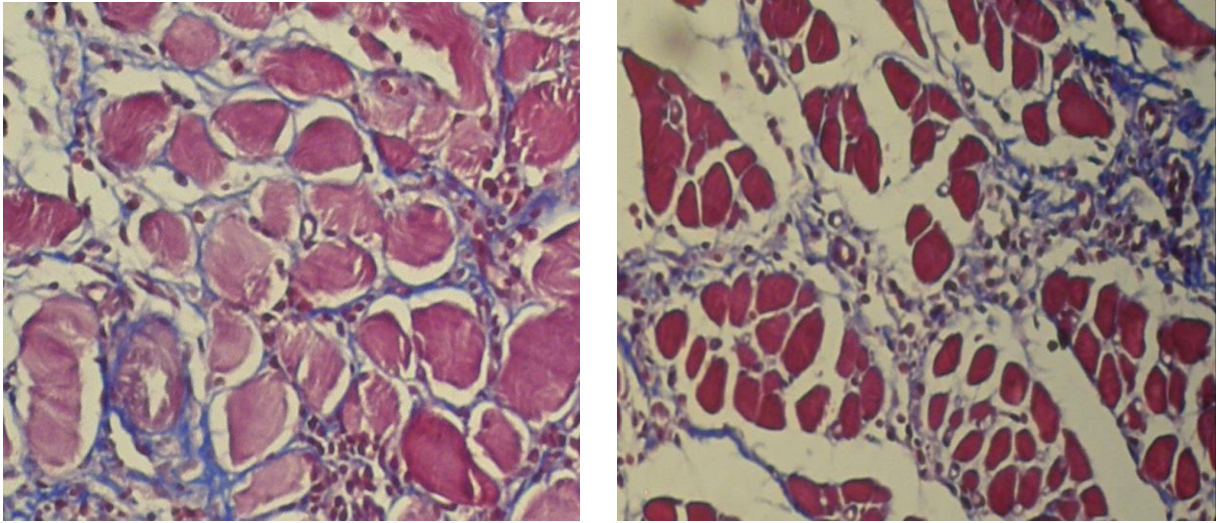


Рис. 4.18. Мікрофотографія. Через 12 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Зони регенерації міосимпласту та ділянки набряку перимізію. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

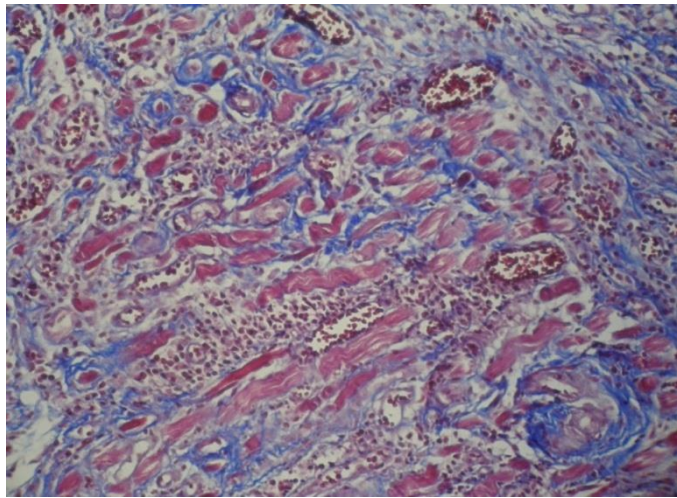


Рис. 4.19. Мікрофотографія. Через 12 місяців після трансплантації клітин кордової крові. Зони регенерації міосимпласту та ділянки периваскулярного склерозу. Забарвлення за методом Н. З. Слінченко. Об.10; Ок. 10.

4.4. Імуногістохімічна характеристика ішемізованої м'язової тканини нижньої кінцівки після клітинної трансплантації

Враховуючи високий рівень чутливості і специфічності та з метою детального вивчення процесів ангіогенезу в нижніх кінцівках після клітинної трансплантації, проводився імуногістохімічний аналіз біоптатів ішемізованої м'язової тканини, де визначалася експресія фактора Віллебранда, а також мезенхімального фактора віментину, що є маркерами ангіогенезу.

Через один місяць після трансплантації клітин кордової крові відмічено активацію регенеративних процесів у тканинах, про що свідчила виражена експресія мезенхімального фактору віментину в перимізії довкола судин (рис. 4.20).

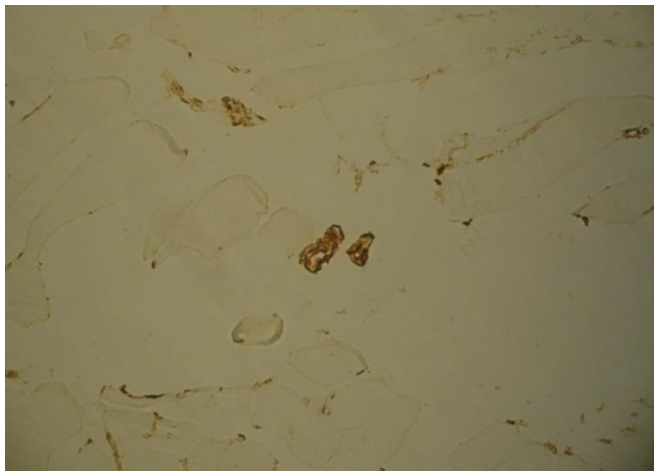


Рис. 4.20. Мікрофотографія. Через один місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Вогнища експресії віментину в перимізії довкола судин. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональні антитіла проти віментину V9) з пероксидажною міткою та детектором пероксидази – діамінобензидином. Ок. 10, Об. 10.

Імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, особливо була виражена вже через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові в ендомізії та перимізії, що свідчить про активність ангіогенезу (рис. 4.21).

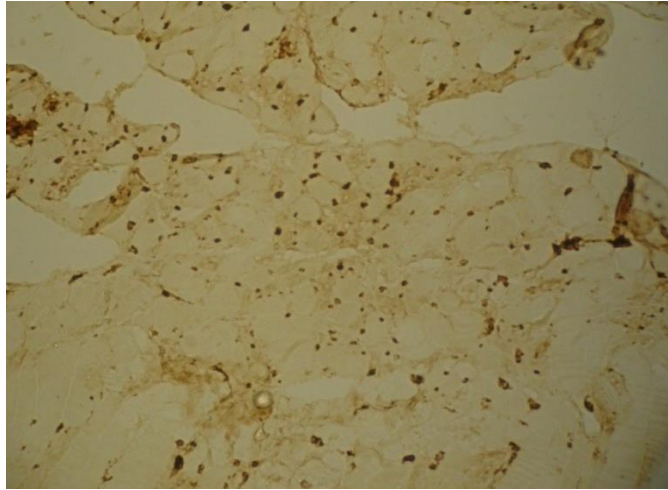


Рис. 4.21. Мікрофотографія. Через один місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія фактору Віллебранда в перимізій новоутвореними ендотеліоцитами. Полімерний метод визначення експресії фактора фон Віллебранда (поліклональне антитіло проти фактора фон Віллебранда) з пероксидажною міткою та детектором пероксидази – діамінобензодинам. Ок. 10, Об. 10.

Отже, вже через один місяць після трансплантації відмічається формування нових капілярів та активне функціонування ендотеліоцитів, про що свідчить виражена експресія мезенхімального фактора віментину та фактора Віллебранда.

Через три місяці після трансплантації експресія мезенхімального фактору віментину була нерівномірно вираженою переважно в судинних пучках та навколо них (рис. 4.22).

В усіх спостереженнях через три місяці після трансплантації при імуногістохімічному аналізі відмічалось активне утворення нових капілярів, що супроводжувалось вираженою експресією фактору Віллебрандата (рис. 4.23).

Через шість місяців експресія мезенхімального фактору віментину вказувала на пролонгацію регенераторно-відновного процесу (рис. 4.24).

Наявність репаративно-відновного процесу та ангіогенезу в ендомізії через 6 місяців після трансплантації підтверджується експресією

мезенхімального фактору віментину, а в перимізії – активною експресією фактору Віллебранда (рис. 4.25).

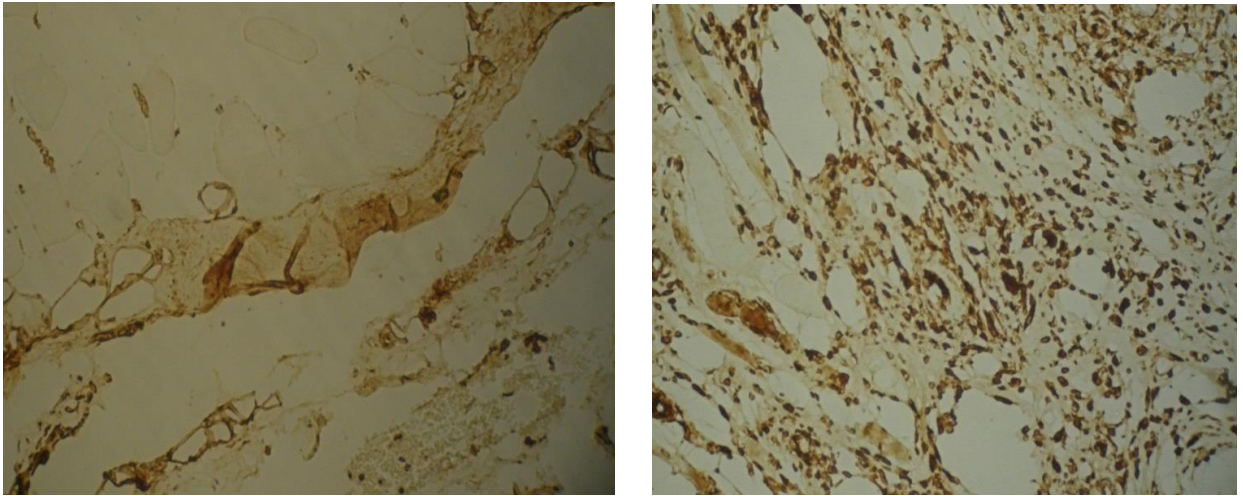


Рис. 4.22. Мікрофотографія. Через три місяці після трансплантації стовбурових клітин кордової крові Вогнища ангіогенезу з множинними судинами. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональні антитіла проти віментину V9) з пероксидажною міткою та детектором пероксидази – діамінобензидином. Ок. 10, Об. 10.

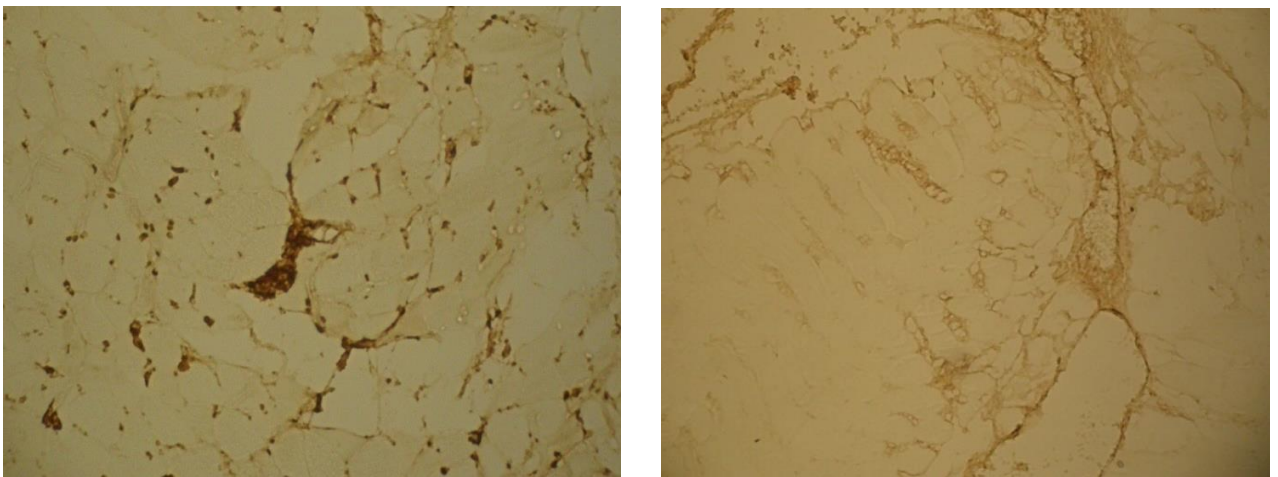


Рис. 4.23. Мікрофотографія. Через три місяці після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія фактору Віллебранда в перимізії з новоутвореними ендотеліоцитами. Полімерний метод визначення експресії фактора фон Віллебранда (поліклональні антитіла проти фактора фон Віллебранда) з пероксидажною міткою та детектором пероксидази – діамінобензидином. Ок. 10, Об. 10.

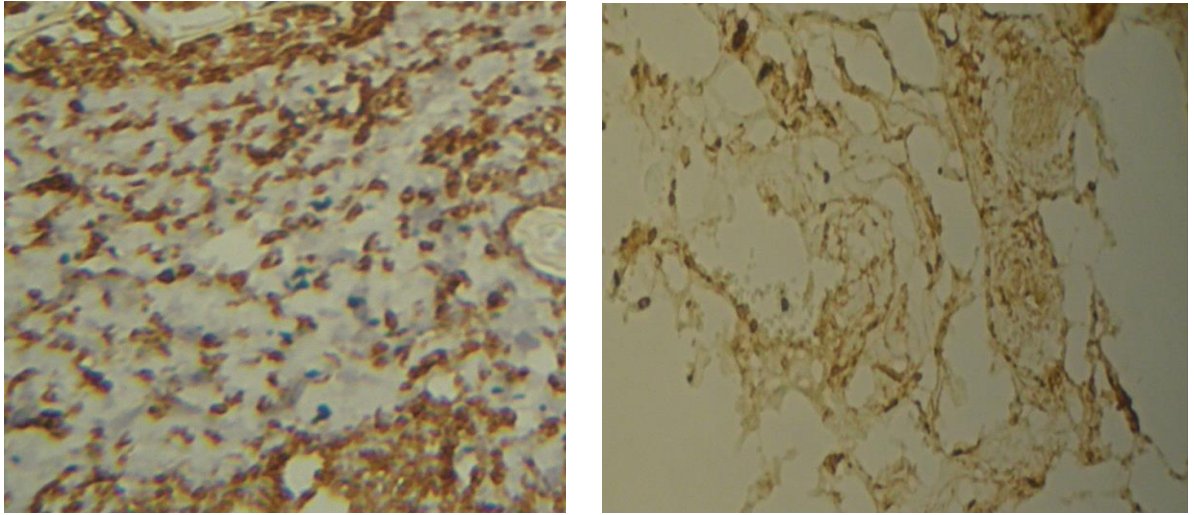


Рис. 4.24 Мікрофотографія. Через шість місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія віментину в міосимпласті. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональні антитіла проти віментину V9) з пероксидазною міткою та детектором пероксидази – діамінобензидином. Ок. 10, Об. 10.

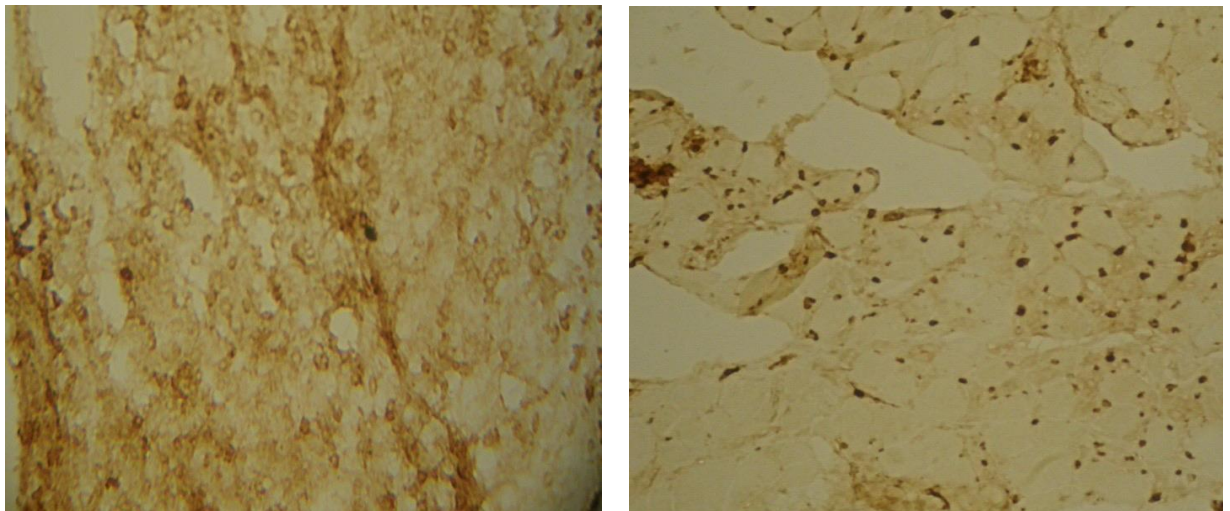


Рис. 4.25. Мікрофотографія. Через 6 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія фактору Віллебранда в новоутворених судинах та ангіогенних вогнищах. Полімерний метод визначення експресії фактора фон Віллебранда (поліклональні антитіла проти фактора фон Віллебранда) з пероксидазною міткою та детектором пероксидази – діамінобензидином. Ок. 10, Об. 10.

Отже, виражена імуногістохімічна експресія фактору Віллебранда в стінках новоутвореної капілярної мережі та локальних вогнищах свідчила про те, що процес ангіогенезу триває.

Через 12 місяців після клітинної трансплантації імуногістохімічний аналіз вказував на зниження експресії мезенхімального фактору віментину (проявлялось у вигляді нерівномірної експресії) (рис. 4.26) та фактору Віллебранда (рис. 4.27), порівняно з 3–6 місяцем після трансплантації.

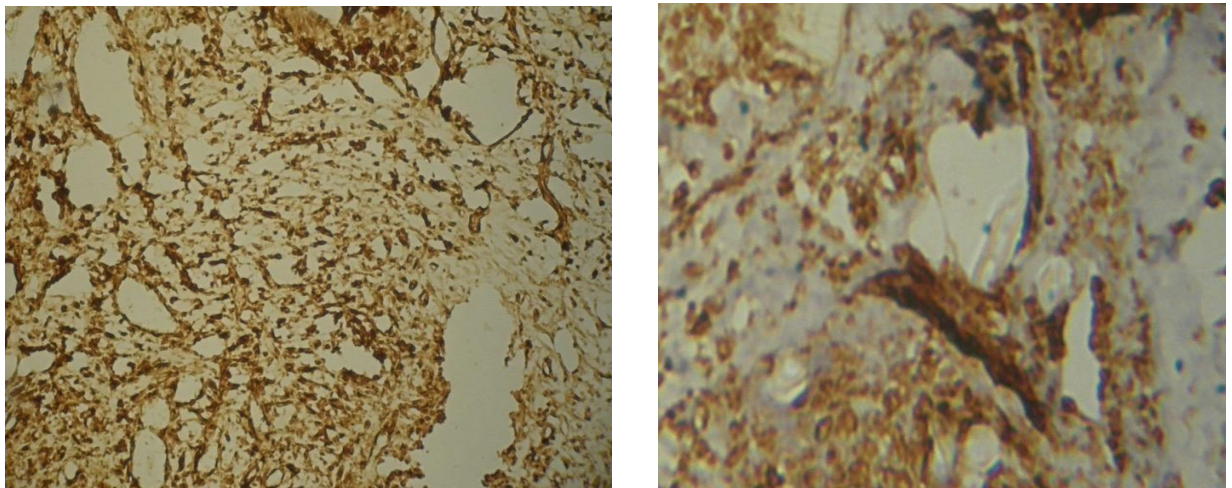


Рис. 4.26. Мікрофотографія. Через 12 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Нерівномірна експресія віментину в міосимпласті. Полімерний метод визначення експресії віментину (моноклональні антитіла проти віментину V9) з пероксидазною міткою та детектором пероксидази – діамінобензидином. Ок. 10, Об. 10.

Отже, при імуногістохімічному дослідженні біоптатів ішемізованої м'язової тканини через 12 місяців після клітинної трансплантації відмічено посилену експресію мезенхімального фактору віментину в периваскулярних структурах та фактору Віллебранда в стінці новоутворених капілярів, пік активності яких припадає на 3-6 місяць дослідження.

Тобто, беручи до уваги та узагальнюючи результати імуногістохімічного, а також вищевказаного гістологічного дослідження, має місце поступова стабілізація регенераторної реакції та процесу компенсаторного ангіогенезу.

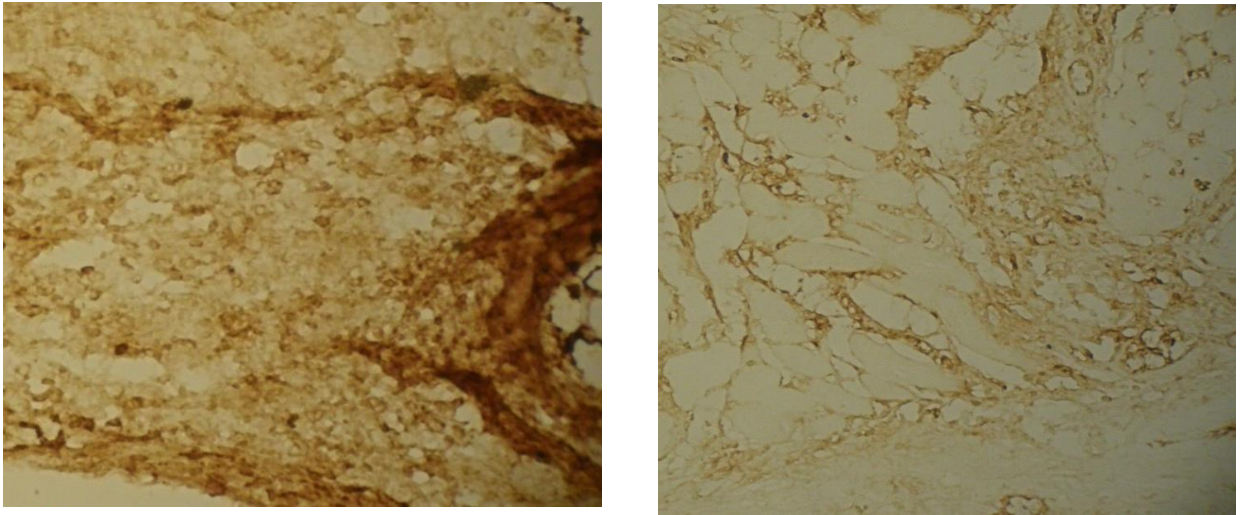


Рис. 4.27. Мікрофотографія. Через 12 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Експресія фактору Віллебранда в ангіогенних вогнищах. Полімерний метод визначення експресії фактора фон Віллебранда (поліклональні антитіла проти фактора фон Віллебранда) з пероксидажною міткою та детектором пероксидази – діамінобензидином. Ок. 10, Об. 10.

4.5. Характеристика якості життя пацієнтів після трансплантації клітин кордової крові

Одним з головних критеріїв оцінки ефективності лікування є характеристика якості життя до та після надання медичної допомоги. Тому, в рамках поведеного клінічного дослідження, з метою оцінки ефективності трансплантації стовбурових клітин кордової крові в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок, нами було використано визначення індексу якості життя, дистанції безболісної ходи та можливої швидкості ходи.

Опитувальник Walking Impairment Questionnaire (WIQ) рекомендований з 2000 року в якості специфічного опитувальника для пацієнтів з переміжною кульгавістю. З його допомогою визначали дистанцію появи перемірної кульгавості та оцінювали функціональний стан кінцівок, про що вказувала швидкість, з якою пацієнт міг пройти певну відстань. За допомогою

крокоміру OMRON (OMRON) HJ-005-E визначали кількість пройдених кроків.

Також для оцінки якості життя використаний опитувальник “Індекс якості життя” (“Quality of Life Index”), запропонований W. O. Spitzer та співавторами. Його критеріями є оцінка пацієнтом рівня особистого благополуччя у фізичному, психічному та соціально–економічному відношенні.

Для порівняння якості життя пацієнтів після трансплантації стовбурових клітин кордової крові (основна I група) використали дані хворих, які отримували курс стандартної консервативної терапії (II група контролю) (рис. 4.28).

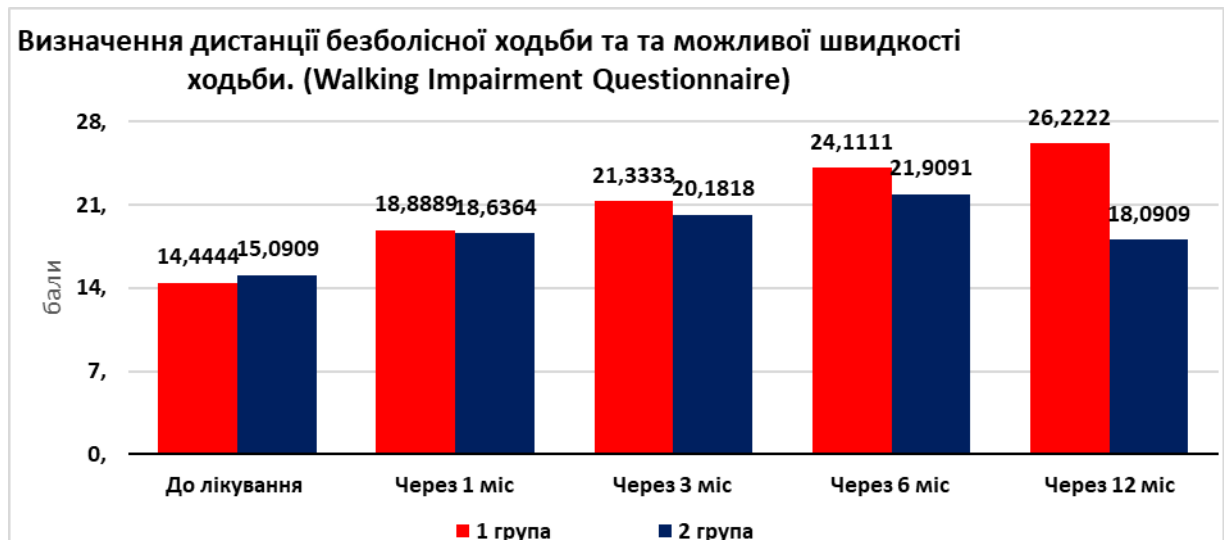


Рис. 4.28. Визначення дистанції безболісної ходи та можливої швидкості ходи в динаміці.

Перед початком лікування сума балів після визначенню дистанції та швидкості проходження відстані в основній групі пацієнтів складала 14.4 бали, що в середньому збігається з даними, отриманими у контрольній групі (15,1 бали).

При дослідженні показників через 1 місяць відмічено поступове збільшення дистанції та швидкості безболісної ходи в обох групах (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

**Визначення дистанції безболісної ходьби та можливої швидкості
ходьби у пацієнтів обох груп**

	До лікування	Через 1 міс	Через 3 міс	Через 6 міс	Через 12 міс
1 група	14,44±0,41	18,89±0,35	21,33±0,24	24,11±0,35	26,22±0,28
2 група	15,09±0,58	18,64±0,53	20,18±0,38	21,91±0,39	18,09±0,58
Відмінності між групами	немає відмінностей ($p>0,05$)	немає відмінностей ($p>0,05$)	достовірна різниця $p<0,05$	достовірна різниця $p<0,01$	достовірна різниця $p<0,01$

Проте збільшення дистанції та швидкості ходи активніше відбувалося у пацієнтів після трансплантації (табл. 4.4) і наприкінці третього місяця перевищувало аналогічний показник контрольної групи на 5.1.

Таблиця 4.4

**Динаміка росту показників ходьби у пацієнтів основної групи до та
після трансплантації**

до лікування	Через 1 міс	Через 3 міс	Через 6 міс	Через 12 міс
14,44±0,41	18,89±0,35	21,33±0,24	24,11±0,35	26,22±0,28
	достовірна різниця $p<0,01$	достовірна різниця $p<0,01$	достовірна різниця $p<0,01$	достовірна різниця $p<0,01$

Через 6 місяців після проведення курсу консервативної терапії, у пацієнтів контрольної групи дистанція ходи та швидкість руху поступово почала зменшуватися і через 12 місяців показники становили 18.1 балів, наближаючись до початкових значень (табл. 4.5).

Проте варто відмітити, що в цей самий період у пацієнтів основної групи дистанція та швидкість безболісної ходи зростали. Так, через 6 місяців

дані показники на 9,1 % були більшими за результати, отримані в групі контролю, а через 12 місяців перевищували аналогічні показники в 1,4 рази (31 %).

Таблиця 4.5

Динаміка росту показників ходи у пацієнтів 2 групи до та після консервативного лікування

до лікування	Через 1 міс	Через 3 міс	Через 6 міс	Через 12 міс
15,09±0,58	18,64±0,53	20,18±0,38	21,91±0,39	18,09±0,58
Відмінності між групами	достовірна різниця p<0,01	достовірна різниця p<0,01	достовірна різниця p<0,01	достовірна різниця p<0,01

Індекс якості життя перед початком лікування становив 5,1 балів у дослідній групі пацієнтів, що в середньому збігається з даними, отриманими у контрольній групі (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Визначення індексу якості життя у пацієнтів обох груп

	До лікування	Через 1 міс	Через 3 міс	Через 6 міс	Через 12 міс
1 група	5,11±0,26	5,78±0,15	6,89±0,26	8,44±0,18	8,89±0,11
2 група	5,18±0,33	5,82±0,18	6,09±0,21	6,55±0,16	6,82±0,23
Відмінності між групами помісячно	немає відмінностей (p>0,05)	немає відмінностей (p>0,05)	достовірна різниця p<0,05	достовірна різниця p<0,01	достовірна різниця p<0,01

У пацієнтів контрольної групи вже через 1 місяць після отримання курсу консервативної терапії відмічено покращення індексу якості життя на 3,4 % порівняно з пацієнтами, котрим виконано трансплантацію клітин корової крові. Однак, вже через 3 місяці і надалі, спостерігаємо зменшення

динаміки росту індексу якості життя у пацієнтів групи контролю, а через 12 місяців після консервативного лікування даний показник відрізнявся у 1,3 від початкових результатів (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Динаміка росту показників якості життя у пацієнтів 2 групи до та після консервативного лікування

до лікування	Через 1 міс	Через 3 міс	Через 6 міс	Через 12 міс
5,18±0,33	5,82±0,18	6,09±0,21	6,55±0,16	6,82±0,23
	немає відмінностей (p>0,05)	достовірна різниця p<0,01	достовірна різниця p<0,01	достовірна різниця p<0,01

У пацієнтів основної групи збільшення індексу якості життя також відмічається через 1 місяць після клітинної трансплантації, та незначно відрізняється від показника групи контролю. Проте, вже через 3 місяці у пацієнтів після трансплантації індекс якості життя становив 6,9 балів, перевищуючи аналогічний показник хворих контрольної групи в 1,13 рази (рис. 4.29).

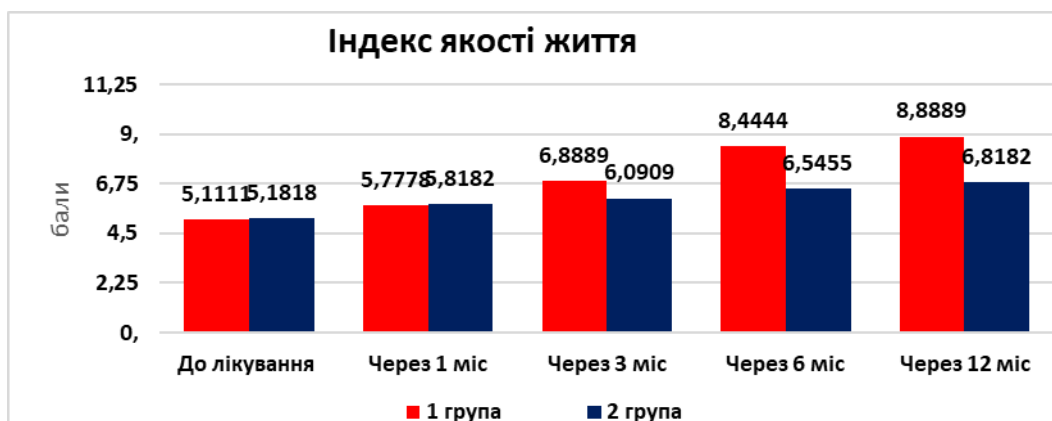


Рис. 4.29. Визначення індексу якості життя в динаміці.

Через 6 місяців після трансплантації клітин кордової крові відмічається збільшення індексу якості життя в 1,3 рази, порівняно з контрольною

групою. А через 12 місяців після трансплантації даний показник становив 9,1 бали, перевищуючи аналогічний показник хворих контрольної групи на 24 % та збільшуючись від початкових даних у 1,8 рази (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

Динаміка росту показників якості життя у пацієнтів 1 групи до трансплантації та після проведеного лікування

до лікування	Через 1 міс	Через 3 міс	Через 6 міс	Через 12 міс
5,11±0,26	5,78±0,15	6,89±0,26	8,44±0,18	8,89±0,11
Відмінності між групами	немає відмінностей ($p>0,05$)	немає відмінностей ($p>0,05$)	достовірна різниця $p<0,01$	достовірна різниця $p<0,01$

Отже, після трансплантації клітин кордової крові пацієнтам з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок при облітеруючому атеросклерозі спостерігаємо збільшення дистанції та швидкості безболісної ходи внаслідок покращення якості життя, що значно відрізняються від аналогічних показників у пацієнтів яким проведено лише курс консервативної терапії.

Основні положення розділу 4 опубліковані в роботах автора: [2], [5], [8], [9], [11], [12], [13], [14], [17], [19], [20], [21].

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

На сьогоднішній день актуальною та невирішеною залишається проблема лікування пацієнтів з оклюзійно-стенотичним ураженням артерій гомілки (так званого дистального русла). Оптимальним методом лікування хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок залишається адекватна реваскуляризація кінцівки – шунтуючі операції, хірургічні та ендоваскулярні ангіопластики.

Однак результати хірургічної реваскуляризації на сьогоднішній день не можна визнати задовільними, адже відмічено чітку тенденцію до зростання кількості хворих із мультифокальним ураженням, із незадовільними дистальним руслом. Прямі реконструкції в таких умовах можливо виконати лише в 49,5–58 % випадків.

При відсутності «приймаючого» судинного русла або наявності протипоказань до реконструктивної операції єдиним методом лікування залишається ампутація або непряма реваскуляризація.

Тому, проблема комплексного лікування хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок, яким неможлива пряма реваскуляризація, на тлі облітеруючого атеросклерозу є однією з найбільш актуальних у судинній хірургії, вирішення якої дозволить не тільки зберегти неоперабельним пацієнтам кінцівку та поліпшити якість їх життя, а й істотно продовжити термін життя.

Проведено багато рандомізованих досліджень з використанням стовбурових клітин у світі. У численних наукових дослідженнях показано, що завдяки величезній біологічній цінності кордову кров розглядають як джерело стовбурових клітин на рівні з іншими джерелами: кістковим мозком, периферійною кров'ю, плацентою, жировою тканиною та ін. Клітини кордової крові мають здатність диференціюватися в різні типи клітин і відновлювати тканини пошкоджених органів: печінки, серця, шкіри, кісток та ін. Проте в літературі немає даних щодо ведення наукових пошуків можливості

застосування клітинних технологій для лікування пацієнтів з дистальним ураженням артерій нижній кінцівок, обумовлених облітеруючим атеросклерозом.

У зв'язку з вищенаведеним, розробка нових методів реваскуляризації зі стимулюванням ангиогенезу та моделюванням капілярного русла у хворих з атеросклерозом при хронічній ішемії нижніх кінцівок на фоні дистального ураження артерій є актуальним напрямком, який може стати альтернативою ампутацій.

Для покращення результатів лікування хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок, на тлі облітеруючого атеросклерозу із дистальним ураженням, яким неможливе виконання прямих реконструктивних операцій, ми вирішили дослідити дію клітин кордової крові після її трансплантації в зону ішемії.

Існує нормативна база, що регулює клінічне дослідження, застосування клітинних та тканинних трансплантатів в Україні.

Чернівецька обласна клінічна лікарня входить до переліку закладів охорони здоров'я, які мають право проводити діяльність, пов'язану з трансплантацією (постанова Кабінету Міністрів України № 164 від 2006 р.)

Згідно законодавчої бази, яка існує на сьогоднішній день, проводити клінічні дослідження, з використанням клітинної трансплантації, можливо лише після проведення доклінічних досліджень.

Дане дослідження містить дві частини: експериментальну та клінічну.

Метою експериментального дослідження було вивчення впливу трансплантації клітин кордової крові на процеси ангиогенезу у тварин із змодельованою ішемією кінцівки за допомогою гістологічних та імуногістохімічних методів дослідження а також проведенні проб з фізичним навантаженням.

У якості дослідних тварин використані 30 білих нелінійних щурів середньою масою $240,4 \pm 4,56$ г, віком $6 \pm 1,2$ міс. Експериментальні втручання проводились під кетаміновим знеболенням з дотриманням умов асептики та

антисептики. Експериментальні тварини були поділені на 2 групи: I група – тварини, у яких змодельована ішемія кінцівки; II група – тварини, яким на тлі ішемії кінцівки вводились клітини кордової крові. Моделювання ішемії задньої кінцівки щура проводилось за методом Т.А. Князевої у модифікації О.М. Горбатука (1984). Для поглиблення ішемічних явищ у кінцівці одномоментно перев'язували стегову артерію, вену та нерв вище місця відходження *a. circumflexa femoris lateralis*. Перші прояви ішемічного стану фіксували на 2–3-тю добу після моделювання.

У якості трансплантату використано кріоконсервовану суспензію клітин кордової крові, яку отримували з банку пуповинної крові ТОВ «Інститут клітинної терапії» при температурі $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Доза введення клітинної суспензії становила $1\pm 0,1$ мл одній тварині, в якому містилося 0,18 мл клітин кордової крові, 0,01 мл гепарину та 0,8 мл 0,9 % розчину NaCl. Клітинний трансплантат вводили в ішемізовані кінцівки на 3-тю добу моделювання ішемії підфасціальну, тонкою смужкою на медіальній та латеральній поверхні стегна. Контрольній групі аналогічно вводили 0,9% розчину NaCl 1 мл.

Тваринам обох експериментальних груп проводили дослідження функціональних параметрів з визначенням рухової активності та морфологічним дослідженням тканин зони ішемії. Після закінчення терміну експериментальних дослідів, виконання функціональних проб та забору біопсійного матеріалу всіх лабораторних тварини виводили з експерименту шляхом глибокого наркозування, відповідно Закону України № 3446-IV від 21.02.2006 року "Про захист тварин від жорстокого поводження".

З метою визначення ефективності використання клітин кордової крові в клінічному етапі були проведені гістологічні та імуногістохімічні дослідження отриманих біоптатів м'язової тканини ураженої кінцівки. Візуалізацію та оцінювання результатів гістологічного дослідження експериментальної та клінічної частини проводили за допомогою мікроскопа Delto Optical Evolution 100 (РП) з об'єктивом 10^{\times} (планохромт) та окуляром 10^{\times} . За допомогою цифрової фотокамери Olympus SP-550UZ оптичні зображення з мікроскопа

переводили в цифрові. Для дослідження зрілості сполучнотканинних волокон та чіткого оптичного орієнтування у структурах тканин було застосовано забарвлення "хромотропом 2В" – "водним блакитним" за методикою Н. З. Слінченко (1964).

Також в обох етапах дослідження визначали експресію антигенів до фактора Віллебранда та віментину імуногістохімічним методом, оскільки вищезазначені фактори є характерними показниками процесів новоутворення судин. Імуногістохімічне дослідження проводили за протоколами, рекомендованими виробником реактивів "DAKO", за допомогою наборів реактивів на основі полімерної системи детекції з пероксидажною міткою та візуалізацією за допомогою діамінобензодину із використанням системи "UltraVision Quanto Detection System HRP Діамінбензидином – DAB Chromogen" (Thermo Fisher Scientific). Дофарбовували гематоксиліном Маєра. Інтенсивність забарвлення ендотеліоцитів у судинах мікроциркуляторного русла та окремих скупчень фібробластів обраховували в одиницях відносної оптичної густини. Після порівняння результатів у групах дослідження встановлювали значення, яке найкраще вказувало на відмінність між групами дослідження.

Після проведення експериментального етапу дослідження отримані наступні результати: при гістологічному дослідженні в обох групах експериментальних тварин на 1–3 добу ішемії спостерігали розлади кровообігу. На 3-тю добу експерименту у тварин I групи виражене вогнищеве повнокров'я і стаз еритроцитів у судинах. Наявний нерівномірний набряк, при цьому частина ендотеліоцитів некротизована та злущена. М'язові волокна втратили посмугованість. На 7–14-ту добу експерименту в тварин I групи деструктивні зміни морфоструктури м'язової тканини посилювались. Прогресує наростання деструктивних процесів у м'язових волокнах з наявністю вогнищ некрозу, ліпідної дистрофії, вакуолізації та набряку, на тлі останнього мають місце вогнища крововиливів та поодинокі мультипотентні клітини. На 21–25-ту добу експерименту поступово зменшувались розлади

кровообігу (повнокров'я та стаз крові) в судинах м'язової тканини. З'являються фібропластичні зміни стінки судин, а також потовщення та фіброз стінки артеріол і периваскулярне збільшення сполучної тканини. У той же час у тварин II групи на 1–2-гу добу після трансплантації стовбурових клітин кордової крові (4–6-та доба ішемії), мали місце мозаїчні зміни міосимпласту, які відповідали тканинним характеристикам тварин I групи. На 5 добу в біоптатах з'являються молоді ендотеліоцитоподібні клітини. На 10–14-ту добу ендотеліальні клітини густо заселяють інтерстицій, відмічається збільшення числа фібробластів. На 21–25-ту доби виявлені вогнища ангиогенезу і регенерації, відмічено грануляційну тканину на етапі дозрівання у рубець із великою кількістю переважно фібробластів та судин, в яких здійснюється кровотік.

При імуногістохімічному дослідженні у I групі тварин експресія фактора Віллебранда в ендотеліальних структурах судин, особливо виражена в повнокровних судинах, в ендомізії та перимізії на 2 і 7 добу ішемії, що свідчить про активацію первинного тромбоцитарно-судинного гемостазу, а пік імуногістохімічної реакції на віментин відмічено на 10-14-ту добу змодельованої ішемії. У II групі дослідних тварин починаючи з 5, особливо з 10–14-ої доби після введення клітин кордової крові в ішемізовану кінцівку, ознаки характерні для гіпоксії поступово зникали. Інтерстицій густо заселений віментин-позитивними мультипотентними клітинами. Спостерігали наявність макрофагів та формування первинних судинних структур. На 21-у добу визначались осередки ангиогенезу і регенерації з множинними дрібними судинами, розташованими в сполучнотканинних і фіброзних вогнищах. Виявлено зрілі віментин-позитивні ендотеліоцити кровоносних судин, як показник стимульованого ангиогенезу.

Спостереження за тваринами II групи показали збільшення дистанції пробігу вже на 7-у добу після введення клітин кордової крові в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$). Після проведення аналізу тесту примусового

плавання відмічається суттєве збільшення часу примусового плавання в дослідній групі вже на 14-ту добу після введення клітин кордової крові, тоді як у групі контролю показники змінювались несуттєво ($p < 0,05$).

Позитивні результати після проведеного експериментального дослідження дозволили перейти на наступний етап – вивчення процесів ангиогенезу після трансплантації клітин кордової крові в ішемізовану кінцівку в клінічних умовах.

Для проведення клінічної частини дослідження брали участь 46 пацієнтів з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу, які перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні хірургії судин Чернівецької обласної клінічної лікарні.

Ступінь, локалізацію та розповсюдженість ураження артеріального русла нижніх кінцівок визначали на основі аналізу результатів ультразвукової доплерографії та рентгенконтрастної ангиографії.

Після обстеження у 22-х пацієнтів констатовано наявність локальних ділянок оклюзії артерій нижніх кінцівок та задовільне дистальне русло, що було показом до виконання прямих оперативних втручань. Даним хворим виконано прямі реконструктивні операції. У подальшому клінічному дослідженні брали участь 24 пацієнта з облітеруючим атеросклерозом та дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок, яким не можливо виконати прямі реконструктивні операції.

Основну клінічну групу склали 13 пацієнтів, яким проводили трансплантацію клітин кордової крові, з проявами хронічної ішемії та дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу, з них 10 чоловіків ($76,9 \pm 11,7$ %) та 3 жінки ($23,1 \pm 11,7$ %). До групи контролю увійшли 11 пацієнтів (9 чоловіків та 2 жінки) з облітеруючим атеросклерозом та дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок, яким не проводили трансплантацію клітин кордової крові.

Основну групу формували пацієнти з болями в стані спокою – категорія 4 по Rutherford (III ступень ішемії по Fontaine) та обмеженими некрозами

тканин – категорія 5 по Rutherford (IV ступінь по Fontaine), при умові відсутності онкопатології в анамнезі та негативних тестах на онкомаркери.

Критеріями виключення з основної групи були пацієнти, які мали покази до прямих реконструктивних операцій. Також виключались пацієнти з поширеними некрозами нижніх кінцівок – категорія 6 по Rutherford (IV ступінь по Fontaine), хворі з цукровим діабетом, з обтяженим онкологічним анамнезом або позитивних онкомаркерах, що включало для чоловіків ПСА загальний, α -фетопротеїн, раково-ембріональний антиген, онкомаркери підшлункової залози, жовчного міхура, шлунку, ШКТ та для жінок раково-ембріональний антиген, тиреоглобулін, онкомаркер яєчників, молочної залози, підшлункової залози, жовчного міхура, шлунку, ШКТ.

Наявність дистального ураження в обох групах підтверджувалось даними ультразвукової доплерографії, лазерною доплерівською флоуметрією, рентгенконтрасною ангіографією. Більшості хворих основної групи в анамнезі проводили прямі оперативні втручання які в подальшому не призвели до відновлення магістрального кровотоку гомілки.

Хворі основної та контрольної групи були схожими за наявністю клінічних симптомів, отримували консервативну терапію терміном 10–14 діб, що включало введення стандартних доз спазмолітиків, периферичних вазодиліаторів та препарати L-аргініну. Пацієнти отримували антиагрегантну терапію, анальгетики, кратність та форма прийому яких варіювала.

В основній групі в якості трансплатату використовували кріоконсервовану суспензію клітин кордової крові, отриману з банку пуповинної крові ТОВ «Інститут клітинної терапії». Дозу (4-6 кріоампул по 1,5 мл) розводили в 40 мл 0,9 % розчину NaCl з 0,5 мл гепарину.

Після спинномозкового (або епідурального) знеболення, клітинний трансплантат вводили в ішемізовану м'язову тканину у верхній третині гомілки по медіальній та латеральній поверхні. Загальна кількість введеної суспензії, що містила стовбурові клітини кордової крові, в одну ішемізовану

кінцівку становила 50 ± 5 мл (вміст ядровмісних клітин – від 47×10^6 до 356×10^6 , життєздатність клітин – $\geq 87 \pm 5$ % від початкової).

Після проведення консервативного лікування в обох групах та трансплантації клітин кордової крові в основній групі використовували уніфікований опитувальник Walking Impairment Questionnaire (WIQ) в якості специфічного опитувальника для пацієнтів з переміжною кульгавістю. Він складається з двох таблиць, проаналізувавши дані яких, ми визначали дистанцію безболісної ходьби та можливу швидкість ходьби у пацієнтів з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. За допомогою крокоміру OMRON HJ-005-E визначали кількість пройдених кроків.

Використовуючи опитувальник хворий відповідав на стандартні запитання для визначення відстані безбольової ходьби, тобто появу переміжної кульгавості, та для визначення можливої швидкості ходьби, що характеризує функціональний стан кінцівок. Після проведення опитування сума балів по визначенню дистанції та швидкості проходження відстані складалась. Максимальна кількість балів складала 33 бали, мінімальна – 11 балів. Дослідження проводились через 3, 6 та 12 міс. після трансплантації.

Оцінку якості життя здійснювали за опитувальником Quality of Life Index, при первинному зверненні та через шість місяців після проведення клітинної трансплантації.

Статистичну обробку отриманих результатів дослідження проводили за допомогою електронних таблиць Microsoft Excel та програми для статистичного «BioStat».

У ході клінічного дослідження при гістологічному обстеженні біоптатів м'язової тканини у пацієнтів з хронічною ішемією нижніх кінцівок основної групи через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові, відмічено мозаїчні зміни структури тканин. На фоні набряку в біоптатах м'язової тканини мають місце скупчення молодих ендотеліоцитів та фібробластів, поодинокі новоутворені капіляри з ознаками функціонування – заповнені форменими елементами крові. На 3 місяць після клітинної трансплантації

процеси регенерації м'язової тканини та формування новоутворених капілярів яскравіше виражені, ніж у попередній термін дослідження. Крім того, відмічено значне збільшення зон регенерації та новоутворених капілярів, які утворювали добре виражену і розгалужену судинну мережу, де здійснюється кровотік. У зразках м'язової тканини на шостий місяць після трансплантації стовбурових клітин кордової крові, виявляли багаточисельні вогнища регенерації, появу поперечної посмугованості м'язових волокон та зменшення ознак дистрофії. Через 12 місяців після клітинної трансплантації відмічено триваючу регенерацію міосимпласту та процеси васкуло-ангіогенезу, однак ступінь їх проявів дещо менша в порівнянні з попередніми термінами, тобто, має місце поступова стабілізація регенераторної реакції та процесу компенсаторного ангіогенезу. У міосимпласті зустрічались лише поодинокі нерівномірно розташовані набряково-дистрофічні вогнища, а новоутворені капіляри формували активно функціонуючу судинну мережу.

Імуногістохімічна реакція на фактор Віллебранда, який експресувався в ендотеліальних структурах судин, особливо була виражена вже через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові в ендомізії та перимізії. Наявність репаративно-відновного процесу та ангіогенезу в ендомізії через 6 місяців після трансплантації підтверджується експресією мезенхімального фактору віментину, а в перимізії – активною експресією фактору Віллебранда. Через 12 місяців після клітинної трансплантації імуногістохімічний аналіз вказував на зниження експресії мезенхімального фактору віментину (проявлялось у вигляді нерівномірної експресії) та фактору Віллебранда, порівняно з 6 місяцем після трансплантації.

При аналізі показників лазерної доплерівської флоуметрії (ЛДФ) у хворих із хронічною ішемією нижніх кінцівок до трансплантації клітин кордової крові було достовірно ($p < 0,01$) більшим значення показника мікроциркуляції на фоновому запису з передпліччя лівої руки (Мф) $7,02 \pm 1,04$ в порівнянні з нормою 4,6-6,0, що вказує на зміни в судинному руслі. Значення параметрів резерву капілярного кровотоку оклюзивної проби (РККо) було

достовірно ($p < 0,01$) меншим у хворих до лікування ($119,2 \pm 14,0$). Значення показника мікроциркуляції мало тенденцію до зниження ($5,57 \pm 2,80$). За даними вейвлет-аналізу у всіх хворих максимальна амплітуда ендотеліальних флаксмоцій та нейрогенних флаксмоній була достовірно ($p < 0,01$) більшою ($0,84 \pm 0,12$ та $0,90 \pm 0,11$) порівняно з нормою. Зростає артеріоло-венулярне шунтування, як компенсаторний перерозподільний механізм, що підтверджується отриманими нами даними показника шунтування, який був вищим ($2,53 \pm 0,49$ у.о. ($p < 0,01$)), порівняно з нормою – $1,13 \pm 0,14$.

При порівнянні параметрів ЛДФ у динаміці лікування через 1 місяць після трансплантації клітин кордової крові відмічається достовірно ($p < 0,01$) зменшення Мф на 56%. При цьому значення резерву капілярного кровотоку нітрогліцеринової проби (РККн) достовірно ($p < 0,01$) збільшувалось на 39,0 %. Відмічена тенденція до збільшення значень показника мікроциркуляції до $10,84 \pm 0,8$ пф.од. ($p < 0,01$). Через 3 місяці після трансплантації можна відмітити нормалізацію Мф до $4,06 \pm 0,79$ пф.од. Цікавим фактом виявилась тенденція до зниження показника шунтування тканинного кровотоку на пальцях нижніх кінцівок до $1,87 \pm 0,12$ у.о. ($p < 0,01$). При цьому значення РККо достовірно ($p < 0,01$) збільшувалось на 62,5%, у порівнянні з вихідними даними. За даними вейвлет-аналізу мала місце тенденція до збільшення значення максимальної амплітуди ендотеліальних та респіраторних флаксмоцій до $1,12 \pm 0,03$ пф.од. та $0,39 \pm 0,04$ пф. од відповідно ($p < 0,01$). Через 12 місяців після трансплантації стовбурових клітин кордової крові, відмітили нормалізацію Мф до $4,51 \pm 0,75$ пф.од. Відмічається покращення рівня РККо та РККн, до $232,4 \pm 21,6$ % ($p < 0,01$) та $352,0 \pm 29,0$ % ($p < 0,01$).

Показник шунтування тканинного кровотоку поступово зменшувався та до кінця 6 місяця набував значення $1,38 \pm 0,22$ у.о. ($p < 0,01$), фактично не відрізняючись від показників норми. Відмічена стійка тенденція до зростання показника мікроциркуляції I-го пальця стопи до $13,09 \pm 2,19$ у.о. ($p < 0,01$) через 12 місяців після трансплантації

Ангіографічне дослідження виконували до лікування в обох групах та не

раніше ніж через 6-12 міс після клітинної трансплантації в основній групі. За його результатами у 92,3 % пацієнтів після трансплантації клітин кордової крові діагностовано покращення дистального кровотоку завдяки розвинутій колатеральній мережі вздовж облітерованих магістральних артерій гомілки

У пацієнтів, які брали участь у клінічному дослідженні, упродовж місяця після клітинної трансплантації, спостерігалось покращення самопочуття: зменшувався, а надалі був відсутнім біль спокою, зменшувались трофічні розлади та загоювались крайові некрози, збільшувалась дистанція безбольової ходи та її швидкість. Через 3 міс після клітинної трансплантації відмічено збільшення дистанції безбольової спокійної ходи до 150 м у 22,2 % пацієнтів, до 200 м у 77,8 % пацієнтів. Болі спокою в нижніх кінцівках та парестезії відсутні у всіх пацієнтів. Через 6 місяців після клітинної трансплантації загальна дистанція безбольової ходи становила близько 250 м у 53,8 % пацієнтів та близько 300 м у 46,2 % пацієнтів. Усі пацієнти працездатні, ведуть активне соціальне та побутове життя. Відсутній біль у спокої та значно зменшилися парестезії в кінцівках. Через 12 місяців після клітинної трансплантації стан пацієнтів стабільно добрий. 92,3% пацієнтів працездатні, соціально та побутово адаптовані. Дистанція безбольової ходи у помірному темпі стабільна: близько 300 м у 38,4 % пацієнтів та до 350 м у 53,8 % пацієнтів. Шкіра нижніх кінцівок (гомілка, стопа) – волога, тургор задовільний, тепла на дотик, без трофічних розладів. У більшості пацієнтів протягом року після трансплантації спостерігали зменшення ступеню ішемії.

Для порівняльної оцінки якості життя пацієнтів після трансплантації стовбурових клітин кордової крові (основна група) використали дані групи контролю.

Збільшення дистанції та швидкості безболісної ходи активніше відбувалося у пацієнтів основної групи, яким проводилась трансплантація клітин кордової крові, що через 6 місяців були більшими на 9,1% за результати групи контролю, а через 12 місяців перевищували аналогічні показники в 1,4 раза.

У пацієнтів контрольної групи через 1 місяць відмічено невірогідне покращення індексу якості життя на 3,4%, порівняно з пацієнтами, котрим виконано трансплантацію клітин корової крові. Однак уже через 3 місяці і надалі спостерігали зниження динаміки росту індексу якості життя у пацієнтів групи контролю. Через 12 місяців після консервативного лікування даний показник відрізнявся у 1,3 рази від початкових результатів.

У пацієнтів основної групи збільшення індексу якості життя відмічається через 1 місяць після трансплантації та незначно відрізняється від показника групи контролю. Проте, вже через 3 місяці у пацієнтів після трансплантації індекс якості життя становив 6,9 балів, перевищуючи аналогічний показник хворих контрольної групи в 1,13 рази. Через 6 місяців після трансплантації клітин кордової крові відмічається зростання індексу якості життя в 1,3 рази, порівняно з контролем. Через 12 місяців після трансплантації даний показник становив 9,1 бали, перевищуючи аналогічний показник хворих контрольної групи на 24 % та збільшуючись від початкових даних у 1,8 рази.

За період проведення дослідження обох груп одному з пацієнтів основної групи (7,7%) через 6 місяців після клітинної трансплантації була виконана ампутація кінцівки. Незважаючи на покращення клінічного стану та переходу ступеня ішемії з 4 класу по Рутерфорду на 3 клас, на тлі гострого порушення мозкового кровообігу зафіксували гострий артеріальний тромбоз підколінної артерії. Хвора не підлягала проведенню реконструктивних операцій (враховуючи важкість загального стану пацієнта обумовленого порушенням мозкового кровообігу та ураженням дистального артеріального русла хворої кінцівки), а призначена консервативна терапія мала недовготривалий результат. У зв'язку з погіршенням загального стану та появою вираженого больового синдрому кінцівка була ампутувана. Пацієнтка вибула з основної групи, проте її результати, отримані в попередні терміни, враховуються в нашому дослідженні. Смертність за час проведення дослідження в обох групах була відсутня.

Підсумовуючи вищесказане, варто зазначити що у хворих із дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок , на фоні облітеруючого атеросклерозу із неможливістю проведення прямих реконструктивних операцій, завдяки застосуванню методу непрямой реваскуляризації шляхом трансплантації клітин кордової крові та, як наслідок стимуляції ангиогенезу, був отриманий тривалий позитивний клінічний ефект, який проявлявся покращенням стану мікроциркуляторного русла (що підтверджувався гістологічними та імуногістохімічними методами, даними ультразвукової доплерографії, лабораторними методами, лазерною доплерівською флоуметрією, рентгенконтрасною ангиографією, клінічною симптоматикою) та проявляється у вигляді збільшення дистанції та швидкості безбольової ходьби, завдяки зниженню ступеня ішемії, покращення працездатності, поліпшення особистого благополуччя пацієнтів у фізичній, психологічній та соціально-економічній сфері, та, як наслідок, покращення взаємовідносин у сім'ї.

Отже, клінічно доведено, що використання методу трансплантації клітин кордової крові пацієнтам з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок на тлі облітеруючого атеросклерозу, яким не можливо виконати прямі реконструктивні втручання, розширює можливості успішного лікування та може стати останнім порятунком для хворих, які знаходяться на межі ампутації

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі викладене теоретичне узагальнення, наукове обґрунтування та нове практичне вирішення актуального завдання судинної хірургії – покращення результатів лікування хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок шляхом розробки та впровадження нових методів реваскуляризації зі стимулюванням ангіогенезу та моделюванням капілярного русла із застосуванням трансплантації клітин кордової крові. Дисертаційна робота присвячена оптимізації хірургічної тактики та вибору методу лікування і післяопераційної реабілітації у хворих з атеросклерозом при хронічній ішемії нижніх кінцівок на фоні дистального ураження артерій, покращення клінічного перебігу і результатів лікування, що знижує частоту післяопераційних ускладнень і покращує якість життя таких пацієнтів.

1. Встановлено, що після проведення оцінки результатів лікування хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок, особливі труднощі виникають при лікуванні пацієнтів з дистальним типом ураження артерій. Незадовільні результати існуючих методів лікування даної категорії хворих потребують розробки нових непрямих методів реваскуляризації, одним з яких є трансплантація клітин кордової крові.

2. В експерименті після моделювання ішемії та введення клітин кордової крові, встановлено постійну структурну стимуляцію регенераторних процесів і ангіогенезу внаслідок збільшення експресії фактору Віллебранда та експресії віментину, які є маркерами утворення ендотеліоцитів та стимуляції ангіогенезу, що підтверджується гістологічними та імуно-гістохімічними дослідженнями. При проведенні проб з фізичним навантаженням у дослідній групі тварин відмічено збільшення дистанції одномоментного пробігу в 1,3 рази ($p < 0,05$) та часу примусового плавання на 21 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою.

3. На основі отриманих даних експериментального дослідження розроблено методику лікування пацієнтів з дистальним ураженням артерій

нижніх кінцівок, яка полягає у використанні трансплантації клітин кордової крові у хворих на хронічну ішемію кінцівок, що призводить до стимуляції ангиогенних процесів зі стабілізацією регенераторної реакції, проявляється формуванням мережі функціонуючих капілярів що підтверджується посиленням експресії мезенхімального фактору віментину в периваскулярних структурах та фактору Віллебранда в стінці новоутворених капілярів, пік активності цих процесів припадає на 3-6 місяць дослідження.

4. Через 12 місяців після трансплантації клітин кордової крові встановлено, що активація процесів ангиогенезу характеризувалась нормалізацією показника мікроциркуляції фонового до $4,51 \pm 0,75$ ($p < 0,01$), збільшенням показників резерву капілярного кровотоку на 95 % ($p < 0,01$), зростанням показника мікроциркуляції I-го пальця стопи у 2,4 рази ($p < 0,01$), порівняно з початковими даними, у 88,9 % пацієнтів діагностовано покращання дистального кровотоку завдяки розвинутій колатеральній мережі що підтверджується нормалізацією основних показників лазерної доплерівської флоуметрії.

5. Встановлено збільшення індексу якості життя у пацієнтів основної групи на 24 % ($p < 0,01$), порівняно з контрольною групою та у 1,8 разу ($p < 0,01$) від початкових даних. Дистанція та швидкість безбольової ходьби у пацієнтів основної групи через 12 місяців після трансплантації в 1,4 разу ($p < 0,01$) вищі за результати групи контролю. Використання методу трансплантації клітин кордової крові у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок призводить до стійкого зростання якості життя завдяки зниженню ступеня ішемії та, як наслідок, покращення працездатності, поліпшення особистого благополуччя пацієнтів у фізичній, психологічній та соціально-економічній сфері.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Трансплантацію клітин кордової крові слід використовувати для лікування хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок з дистальним ураженням, як метод непрямой реваскуляризації, що дає можливість збільшити дистанцію безболісної ходи, зменшити ступінь ішемії кінцівки та покращити результати лікування.

2. Доцільно застосовувати лазерну доплерівську флоуметрію, як метод моніторингу стану мікроциркуляторного русла у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок, яким проводились непрямі методи реваскуляризації.

3. Для зменшення травматизації ішемізованої кінцівки при проведенні непрямой реваскуляризації рекомендовано застосувати запропоновану методику введення клітин кордової крові.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Корсак В.В. Хірургічне лікування критичної ішемії нижніх кінцівок із використанням методів поєднаної прямої та непрямой реваскуляризації. Науковий вісник Ужгородського університету. 2016. № 2 (54). С. 95–100.
2. Мишалов В.Г., Литвинова Н.Ю. Місце клітинної терапії в лікуванні пацієнтів з важкими формами ішемії нижніх кінцівок. Науковий вісник Ужгородського університету, Серія «Медицина». 2012. Вип. 3. С. 55–58.
3. Гардубей Є.Ю. Диференціальний підхід до лікування пацієнтів з атеросклеротичним оклюзійно-стенотичним ураженням аорто-клубового сегмента. Є.Ю. Гардубей, І.С. Полінчук, Ю.В. Сидорко. Серце і судини. 2014. № 1. С. 119–123.
4. Літвінова Н.Ю. Методи непрямой реваскуляризації при критичній ішемії нижніх кінцівок. Н.Ю. Літвінова, В.А. Черняк, О.В. Панчук. Серце і судини. 2015. № 1. С. 110 – 115.3.
5. Кутовий О.Б. Хірургічне лікування критичної ішемії нижніх кінцівок на тлі атеросклерозу. Медичні перспективи. 2012. Т. 17, №3. С. 64– 69.
6. Предикторы прогрессирующего течения облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей. С.С. Дунаевская, Е.С. Подрезенко, А.А. Никифорова [и др.]. В мире научных открытий. 2015. №2 (62). С. 95 – 108.
7. Казанцев А.В., Корымасов Е.А. Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей: возможности диагностики прогрессирующего типа течения. Кубанский научный медицинский вестник. 2010. №8. С. 88–92.
8. Hinchliffe M. Guideline on diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease among people with diabetes (IWGDF 2019 update). Diab Metab Res Rev. 2020. e3276.
9. Dormandy J.A., Rutherford R.B. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). J. Vasc. Surg. 2000. Vol. 31. №1. S1–S296.

10. Русин В.І., Корсак В.В., Попович Я.М., Русин В.В. Можливості поєднання реконструкційних втручань та методів непрямой ревазуляризації при критичній ішемії нижніх кінцівок. Архів клінічної медицини. 2014. №2. С. 104–107.

11. Кузнецов М.Р. Хирургическое лечение хронической артериальной недостаточности нижних конечностей: современное состояние проблемы. М.Р. Кузнецов, А.И. Евграфов, П.А. Туркин. Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2002. №2. С. 56–59.

12. Савельев В.С., Кошкин В.М., Каралкин А.В. Патогенез и консервативное лечение тяжелых стадий облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. Руководство для врачей. М.: МИА, 2010. 216 с.

13. Гудз О.І. Інтраоперативна корекція мікроциркуляторної складової периферичного опору у пацієнтів із хронічною критичною ішемією нижніх кінцівок. Галицький лікарський вісник. 2012. Т.19. № 3 (ч.1). С. 120–122.

14. Поляков П.И., Горелик С.Г., Железнова Е.А. Облитерирующий атеросклероз нижних конечностей у лиц старческого возраста. Вестник новых медицинских технологий. 2013. Т. 10. №1. С. 98–101.

15. Пиптюк О.В., Сабадош Р.В., Пиптюк В.О. Непряма ревазуляризація в комплексному лікуванні хворих з облітерацією дистального артеріального русла. Практична медицина. 2008. Т. XIV. №5. С. 194–197.

16. Салютин Р.В., Буслович Е.В., Сирман В.М., Борис Р.Н., Комарова Л.С., Паляница С.С. Использование клеточных технологий при лечении хронической ишемии нижних конечностей. Український медичний часопис. 2013. № 4. С. 27–29.

17. Antoniou GA., Chalmers N, Georgiadis GS. A meta-analysis of endovascular versus surgical reconstruction of femoropopliteal arterial disease. Journal of Vascular Surgery. 2013. Vol. 57. P. 242–253.

18. Owens C.D., Kim J.M., Hevelone N.D. An integrated biochemical prediction model of all-cause mortality in patients undergoing lower extremity

bypass surgery for advanced peripheral artery disease. *J. Vasc. Surg.* 2012. Vol 56. P. 686–695.

19. Abu Dabrh AM, Steffen MW, Asi N. Bypass surgery versus endovascular interventions in severe or critical limb ischemia. *Journal of Vascular Surgery.* 2016. Vol. 63. P. 244–253.

20. Rollins KE, Jackson D, Coughlin PA. Meta-analysis of contemporary short- and longterm mortality rates in patients diagnosed with critical leg ischaemia. *British Journal of Surgery.* 2013. Vol. 100. P. 1002–1008.

21. Sobel M., Verhaeghe R. Antithrombotic therapy for peripheral artery occlusive disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest.* 2008. №133. P. 815S–843S.

22. Рекомендації Європейського товариства кардіологів з діагностики та лікування захворювань периферичних артерій. Частина I. Серце і судини.– 2011. № 4. С. 19–35.

23. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2011. Vol. 32. №22. P. 2851–906.

24. Abou-Zamzam A., Gomez N., Molkara A. A prospective analysis of critical limb ischemia: factors leading to major primary amputation versus revascularization. *Ann. Vasc. Surg.* 2007. Vol. 21. №4. P. 458–463.

25. Baars E., Emmelot C., Geertzen J. Lower leg amputation due to critical limb ischaemia: morbidity, mortality and rehabilitation potential. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* 2007. Vol. 151, №49. P. 2751–2752.

26. Ткаченко А.Н., Бахтин М.Ю., Жарков А.В., Антонов Д.В., Хачатрян Е.С., Сидоренко В.А. Прогноз летальных исходов при проведении ампутаций нижней конечности у больных пожилого и старческого возраста. *Фундаментальные исследования.* 2011. № 9. С. 304–308.

27. Wukich DK, Ahn J, Raspovic KM, La Fontaine J, Lavery LA. Improved Quality of Life After Transtibial Amputation in Patients With Diabetes Related Foot Complications. *Int J Low Extrem Wounds*. 2017 Jun; 16(2):114–121.
28. Ryan SP, DiLallo M, Klement MR, Luzzi AJ, Chen AF, Seyler TM. Transfemoral amputation following total knee arthroplasty. *Bone Joint J*. 2019 Feb; 101-B (2):221–226.
29. Wurdeman SR, Stevens PM, Campbell JH. Mobility Analysis of Amputees (MAAT 4): Classification tree analysis for probability of lower limb prosthesis user functional potential. *Disabil Rehabil Assist Technol*. 2019 Feb 11:1–8.
30. Hashimoto H, Kobayashi T, Gao F, Kataoka M, Orendurff M, Okuda K. The effect of transverse prosthetic alignment changes on socket reaction moments during gait in individuals with transtibial amputation. *Gait Posture*. 2018 Sep; 65:8–14.
31. Roepke A.M., Turner A.P., Henderson A.W., Goldberg S.B., Norvell D.C., Czerniecki J.M., Williams R.M. A Prospective Longitudinal Study of Trajectories of Depressive Symptoms after Dysvascular Amputation. *Arch. Phys. Med. Rehabil*. 2019. Vol.100. №8. P.1426–1433.
32. Manning BJ. Lower Extremity Amputation: Analysis by Postcode. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2018 Dec 28. P. 115.
33. Антощук РЯ. Цукровий діабет: етіологія захворювання. Молодий вчений. 2016; 6(33):277–280
34. Русин В.І., Корсак В.В., Русин В.В. Результати непрямих способів реваскуляризації нижніх кінцівок при хронічній критичній артеріальній ішемії. Харківська хірургічна школа. 2015. № 2. С. 79–82.
35. Long-Term, Zeller Th., Sixt S., Schwarz Th. Results After Directional Atherectomy of Femoro-Popliteal Lesions. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2006. № 48 (8). P. 1573–1578.

36. Fernandez N., McEnaney R., Marone L. K. Predictors of failure and success of tibial interventions for critical limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* 2010. № 52 (4). P. 834–842.

37. Heidrich H., Schmidt T., Fahrig C. Are there predictors for the outcome of a PGE1 treatment in peripheral arterial disease with critical limb ischaemia. *Vasa.* 2005. Vol. 34, № 2. P. 101–107.

38. Norgren L., Hiatt W. R., Dormandy J. A. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal of Vascular Surgery.* 2007. N 1. P. 63.

39. Директива комісії 2006/17/єс від 8 лютого 2006 року про імплементацію Директиви Європейського Парламенту і Ради 2004/23/єс у частині деяких технічних вимог до донації, заготівлі та тестування людських тканин та клітин. *Офіційний вісник.* 2012. №327. 24 с.

40. Badorff C., Brandes R.P., Popp R. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation.* 2003. Vol. 107. P. 1024–1031.

41. Поляченко Ю.В., Дрюк М.Ф., Домбровський Д.Б. Трансплантація мультипотентних стромальних клітин жирової тканини, як метод клітинної стимуляції ангиогенезу у хворих на хронічну ішемію кінцівок. *Український морфологічний альманах.* 2010. Том 8. №2. С. 152–155.

42. Stashower M., Smith K., Williams J. Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin. *Dermatol. Surg.* 1999. № 25. P. 945–952.

43. Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г. Стромальные клетки предшественники жировой ткани: выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства при монослойном культивировании. *Акад. мед. наук України.* 2008. Т. 14, № 2. С. 354–365.

44. Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal cells. *Stem cells.* 2005. Vol. 23. P. 412–423.

45. Andrews R.G., Singer J.W., Bernstein I.D. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood*. 1986. Vol. 67. P. 842–849.

46. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. 8. P.315–317.

47. Papadaki H.A., Kritikos H.D., Gemetzi C., Koutala H., Marsh J.C., Boumpas D.T., Eliopoulos G.D. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alphamediated effect. *Blood*.2002. 99. P. 1610–1619.

48. Papadaki H.A., Tsagournisakis M., Mastorodemos V., Pontikoglou C., Damianaki A., Pyrovolaki K., Stamatopoulos K., Fassas A., Plaitakis A., Eliopoulos G.D. Normal bone marrow hematopoietic stem cell reserves and normal stromal cell function support the use of autologous stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant*. 2005. 36. P.1053–1063.

49. Ra J., Kang S., Shin S. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of cultureexpanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J. Transl. Med*. 2011. 9. P.181–198.

50. Ra J.C., Shin I.S., Kim S.H., Kang S.K., Kang B.C., Lee H.Y., Kim Y.J., Jo J.Y., Yoon E.J., Choi H.J., Kwon E. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev*. 2011. 20. P.1295–1296.

51. Чурилова Т.М. Правове регулювання ксенотрансплантації та трансплантації фетальних матеріалів. *Юридичний науковий електронний журнал*. 2018. №6. С. 119–122.

52. Насадюк Х.М. Клітинні технології з використанням пуповинної крові в терапії невиліковних захворювань. Здоров'я України. 2010. № 4 (31). С. 22–25.

53. Петренко АЮ, Хунов ЮА, Иванов ЭН. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения: монография. Луганск: ООО «Прессэкспресс»; 2011. 368 с.

54. Newman MB, Willing AE, Manressa JJ, Sanberg CD, Sanberg PR. Cytokines produced by cultured human umbilical cord blood (HUCB) cells: implications for brain repair. *Experimental Neurology*. 2006;199(1):201–8.

55. Goodwin H, Bicknese A, Chien S, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(11):581–8.

56. Lee OK, Kuo TK, Chenet W.-M, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103(5):1669–75.

57. Achyut B.R., Varma N.R.S., Arbab A.S. Application of umbilical cord blood derived stem cells in diseases of the nervous system. *J Stem Cell Res Ther*. 2014; 4. P. 15–24.

58. Jaing TH. Umbilical cord blood: a trustworthy source of multipotent stem cells for regenerative medicine. *Cell Transplant*. 2014;23(4–5):493–6.

59. Kern S., Eichler H., Eichler H., Stoeve J. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294–301.

60. Sun T, Ma Q-H. Repairing neural injuries using human umbilical cord blood. *Mol Neurobiol*. 2013;47(3):938–45.

61. Lu X, Alshemali S, Wynter EA, Dickinson AM. Mesenchymal stem cells from CD34(-) human umbilical cord blood. *Transfus Med*. 2010; Jun 23;20(3):178–84.

62. Habich A, Szablowska-Gadomska I, Zayat V, Buzanska L, Domańska-Janik K. Epigenetic and molecular signature of human umbilical cord blood-derived neural stem cell (HUCB-NSC) neuronal differentiation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73:143–56.

63. Buzanska L, Jurga M, Domanska-Janik K. Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegener Dis*. 2006;3:19–26.

64. Olinic D.M., Spinu M., Olinic M., Homorodean C., Tataru D.A., Liew A., Schernthaner G.H., Stanek A., Fowkes G., Catalano M. Epidemiology of peripheral artery disease in Europe: VAS Educational Paper. *Int. Angiol*. 2018. №37. P. 327–334.

65. Olinic D.-M., Stanek A., Tătaru D.-A., Homorodean C., Olinic M. Acute Limb Ischemia: An Update on Diagnosis and Management. *J. Clin. Med*. 2019. №8(8). P. 1215.

66. Lawall, H.; Huppert, P.; Rūmenapf, G. S3-Leitlinien zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. *Vasa* 2016. №45. P. 11–82.

67. Abd Moain Abu Dabrh, Mark W Steffen, Chaitanya Undavalli, Noor Asi, Zhen Wang, Mohamed B Elamin, Michael S Conte, Mohammad Hassan Murad. The natural history of untreated severe or critical limb ischemia. *J. Vasc. Surg*. 2015;62(6):1642–1651.

68. Michael S Conte, Dennis F Bandyk, Alexander W Clowes, Gregory L Moneta, Lynn Seely, Todd J Lorenz, Hamid Namini, Allen D Hamdan, Sean P Roddy, Michael Belkin, Scott A Berceli, Richard J DeMasi, Russell H Samson, Scott S Berman. Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery. Michael S Conte. *J. Vasc. Surg*. 2006 Apr;43(4):742–751.

69. Colini B.G., Carlizza A. Spinal Cord Stimulation: Predictive Parameters of Outcome in Patients Suffering from Critical Lower Limbs Ischemia. A Preliminary Study. *Neuromodulation*. 2011. Vol. 14. P. 530–533.

70. Dohmen A., Eder S., Euringer W. Chronic Critical Limb Ischemia. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2012. Vol 109 (6). P. 95–101.

71. Clair D., Shah S., Weber J. Current state of diagnosis and management of critical limb ischemia. *Curr. Cardiol. Rep.* 2012. Vol. 14 (2). P. 160–170.

72. Суковатых Б.С., Князев В.В. Влияние различных способов непрямой реваскуляризации на качество жизни больных с критической ишемией нижних конечностей. *Вестн. хирургии им. И.И. Грекова.* 2008. №2. С. 44–47.

73. Chaudhuri A. Endobypass using a heparin – bonded covered stent to treat upper limb claudication due to axillary artery occlusion following axillofemoral bypass. *Eur J Vasc Endovasc.* 2012. Vol. 43, № 6. P. 733–734.

74. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011. Vol. 473. № 7347. P. 298–307.

75. Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2007. №33. (Suppl 1). P. S5–S75.

76. Jeffrey A., Kalish M.D. Factors associated with surgical site infection after lower extremity bypass in the Society for Vascular Surgery (SVS) Vascular Quality Initiative (VQI). *Journal of vascular surgery.* 2014. Vol 60. P. 1239–1246.

77. Reinecke H., Unrath M., Freisinger E. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *European Heart Journal.* 2015. Vol. 36. P. 932–938.

78. O'Neill WC, Han KH, Schneider TM. Prevalence of non-atheromatous lesions in peripheral arterial disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2015. Vol. 35. P. 439–447.

79. McDermott MM, Carroll TJ, Kibbe M. Proximal superficial femoral artery occlusion, collateral vessels, and walking performance in peripheral artery disease. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2013. Vol. 6. P. 687–694.

80. Абышов Н. С., Закирджаяев Э. Д. Ближайшие результаты «больших» ампутаций у больных с окклюзионными заболеваниями артерий нижних конечностей. Хирургия. 2005. № 11. С. 15–19.

81. Алехин Д. И. Новые возможности ревазуляризации конечностей при хронической ишемии – неоангиогенез, индцированный воздействием высокоинтенсивного лазерного излучения. Ангиол. и сосуд. хирург. 2003. Т. 9, № 4. С. 21–25.

82. Беленцов С. М., Иванин С. Л., Калашников А. Л., Попов А. Н. Артериализация венозного русла при критической ишемии нижних конечностей. Материалы 15-й международной конференции российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. Петрозаводск; Кодопога, 2004. С. 34–36.

83. Бувальцев В. И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Междунар. мед. журн. 2001. № 3. С. 202–209.

84. Гавриленко А. В. Ближайшие и отдаленные результаты использования генно-инженерных конструкций с проангиогенными генами в лечении больных с хронической ишемией нижних конечностей. Тез. докл. XI Ежегодной сессии научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых, Москва, 13–15 мая 2007 г.. НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. М., 2007. 284 с.

85. Karanth V.K., Karanth T.K., Karanth L. Lumbar sympathectomy techniques for critical lower limb ischaemia due to non-reconstructable peripheral arterial disease. Cochrane Database Syst Rev. 2016. 2016(12). P. 24–33.

86. Cronenwett JL, Lindenauer SM. Direct measurement of arteriovenous anastomotic blood flow after sympathectomy. Surgery 1977;82(1):82–9.

87. Sen I, Agarwal S, Tharyan P. Lumbar sympathectomy versus prostanoids for critical limb ischaemia due to non-reconstructable peripheral arterial disease. Cochrane Database Syst Rev. 2018. 4(4). P. 16.

88. Sen I, Agarwal S, Tharyan P. Lumbar sympathectomy versus prostanoids for critical limb ischaemia due to non-reconstructable peripheral arterial disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Apr; 2018(4): CD009366.

89. Aronow W.S. Management of peripheral arterial disease of the lower extremities. *Compr Ther*. 2007. №33. P. 247–256.

90. Matarazzo A., Rosati-Tarulli V., Sassi O., Florio A., Tatafiore M., Molino C. Possibilities at present for the application of lumbar sympathectomy in chronic occlusive arterial disease of the lower limbs. *Minerva Cardioangiol*. 2002. №50. P. 363–369.

91. Bel'kov IuA., Kyshtymov SA, Bogdanova MG, Dudnik AV. Revascularizing osteotrepation in combined surgical treatment of chronic lower limb ischemia. *Khirurgiia (Mosk)*. 2004;(9):14–6.

92. Sukovatykh BS, Belikov LN, Shcherbakov AN, Magomedalieva KS, Pashkov DV, Kniazev VV. Experimental and clinical grounds of revascularizing osteomyoplasty for treatment of critical ischemia of the lower extremities. *Vestn Khir Im I I Grek*. 2006;165(6):21–4.

93. Ерошкин СН, Сачек МГ, Криштопов ЛЕ, Федянин СД, Ерошкина ЕС. Возможности повторной реваскуляризирующей остеотрепанации большеберцовой кости в лечении пациентов с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы. *Новости Хирургии*. 2016;24(3):249–53

94. Owens CD, Kim JM, Hevelone ND, Casper WJ, Belkin M, Creager MA, et al. An integrated biochemical prediction model of all-cause mortality in patients undergoing lower extremity bypass surgery for advanced peripheral artery disease. *J Vasc Surg*. 2012 Sep;56(3):686–95.

95. Alizadegan S. Old Tradition of Prophylactic Fasciotomy Could Be Avoided. S. Alizadegan. *J.of Vasc. Surg*. Vol. 68, №3. P. 57.

96. Hofmeister E.P., Shin A. Y. The role of prophylactic fasciotomy and medical treatment in limb ischemia and revascularization. *Hand Clin*. 1998;14(3):457–65.

97. Barshes N.R., Pisimisis G., Kougiass P. Compartment syndrome of the foot associated with a delayed presentation of acute limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* 2016 Mar;63(3):819–22.
98. Blaisdell F.W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg.* 2002;10(6):620–30.
99. Percival T.J., Patel S., Markov N.P., Morrison J.J., Spencer J.R., Ross J.D., Rasmussen T.E. Prophylactic fasciotomy in a porcine model of extremity trauma. *J. Surg. Res.* 2015;193(1):449–57.
100. Meyer A., Goller K., Horch R. E., Beier J. P., Taeger C. D., Arkudas A., Lang W. Results of combined vascular reconstruction and free flap transfer for limb salvage in patients with critical limb ischemia. *J. of Vasc. Surg.* Vol. 61, № 5. P. 1239–1248.
101. Randon C, Jacobs B, De Ryck F, Van Landuyt K, Vermassen F. A 15-year experience with combined vascular reconstruction and free flap transfer for limb-salvage. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;38:338–45.
102. Horch RE, Lang W, Arkudas A, Taeger C, Kneser U, Schmitz M. Nutrient free flaps with vascular bypasses for extremity salvage in patients with chronic limb ischemia. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2014;55(Suppl 1):265–72.
103. Horch RE, Horbach T, Lang W. The nutrient omentum free flap: revascularization with vein bypasses and greater omentum flap in severe arterial ulcers. *J Vasc Surg* 2007;45:837–40.
104. Mimoun M, Hilligot P, Baux S. The nutrient flap: a new concept of the role of the flap and application to the salvage of arteriosclerotic lower limbs. *Plast Reconstr Surg* 1989;84:458–67.
105. Eweida AM, Lang W, Schmitz M, Horch RE. Salvage of a free radial forearm flap by creation of an arteriovenous fistula at the distal arterial pedicle. *Microsurgery* 2013;33:391–5.
106. Engelke C, Morgan RA, Quarmby JW, Taylor RS, Belli AM. Distal venous arterialization for lower limb salvage: angiographic appearances and interventional procedures. *RadioGraphics* 2001;21(5):1239–48.

107. Gasparis AP, Noor S, Silva MS, Tassiopoulos AK, Semel L. Distal venous arterialization for limb salvage: a case report. *Vascular and Endovascular Surgery* 2002;36(6):469–72.

108. Higgins JP, Green S, editor(s). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1* (updated March 2011). The Cochrane Collaboration, 2011.

109. Lu X, Idu M, Ubbink D, Legemate D. Meta-analysis of the clinical effectiveness of venous arterialization for salvage of critically ischaemic limbs. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2006;31(5):493–9.

110. Litvinova N.Yu., Amosova K., Mishalov V. Safety and effect of autologous cultured adipose-derived stem cells in patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Vasc. Medicine*. 2018. Vol. 71. № 11. P. 13–20.

111. Qayyum A. A., Haack-Sorensen M., Mathiasen A. B., Jorgensen E., Ekblond A., Kastrup J. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia (MyStromalCell Trial): study design. *Regen. Med*. 2012 May;7(3):421–8.

112. Panfilov I.A., de Jong R., Takashima S., Duckers H.J. Clinical study using adipose-derived mesenchymal-like stem cells in acute myocardial infarction and heart failure. *Methods. Mol. Biol*. 2013;1036:207–12.

113. Konno M., Hamabe A., Hasegawa S., Ogawa H., Fukusumi T., Nishikawa S., Ohta K., Kano Y., Ozaki M., Noguchi Y., Sakai D., Kudoh T., Kawamoto K., Eguchi H., Satoh T., Tanemura M., Nagano H., Doki Y., Mori M., Ishii H. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Dev. Growth. Differ*. 2013 Apr;55(3):309–18.

114. Mazini L., Rochette L., Amine M., Malk G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Int. J. Mol. Sci*. 2019. №20. P. 2523.

115. Lee H.C., An, S.G.; Lee, H.W.; Park, J.S.; Cha, K.S.; Hong, T.J.; Park, J.H.; Lee, S.Y.; Kim, S.P.; Kim, Y.D., S.W. Chung, Y.C.Bae, Y.B. Shin, J.L.

Kim, J.S. Jung. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: A pilot study. *Circ. J.* 2012. №76. P. 1750–1760.

116. Amann B, Luedemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke JA. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant.* 2009;18:371–380.

117. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease: meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis.* 2010;209:10–17.

118. Powell R.J., Comerota A.J., Berceli S.A., Guzman R., Henry T.D., Tzeng E., et al. Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2011;54:1032–1041.

119. Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet.* 2002;360:427–435.

120. Franz R.W., Shah K.J., Johnson J.D., Pin R.H., Parks A.M., Hankins T. Short- to mid-term results using autologous bone-marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease. *Vasc Endovascular Surg.* 2011;45:398–406.

121. Talwar S., Choudhary S.K. Omentopexy for limb salvage in Buerger's disease: indications, technique and results. *J Postgrad Med.* 2001;47:137–142.

122. Ala-Kulju K., Virkkula L. Use of omental pedicle for treatment of Buerger's disease affecting the upper extremities. A modified technique. *Vasa.* 1990;19:330–333.

123. Agarwal V.K., Bindal J., Bhargava S. Omental Transplant for Revascularization in Critical Ischemic Limbs and Tissues. *Critical Limb Ischemia*. 2016. P. 469–481.

124. Nishimura A., Sano F., Nakanishi Y., Koshino I., Kasai Y. Omental transplantation for relief of limb ischemia. *Surg. Forum*. 1977;28:213–5.

125. Vachev A.N., Mikhaïlov M.S., Novozhilov A.V. Microsurgical autotransplantation of the greater omentum to a lower limb in patients with critical ischaemia accompanying thromboangiitis obliterans. *Angiol. Sosud. Khir.* 2008;14(3):107–10.

126. Затевахин И.И., Комраков В.Е. Инфекция в сосудистой хирургии. Москва: 1998. 208 с.

127. Francois Franck A. «Note a propos de la communication de M. Raymond Potit sur la suture arterio-veineuse». *Compt. rend. Soc. biol.* 1896. Vol.10. P. 150–156.

128. San Martin, Satrustegui A. Anastomose arterio-veineuse pour remedier a obturation des arteries des membres. *Bull. Med.* 1902. Vol. 16. P. 451.

129. Wieting, Julius. Die angiosklerotische Gangrän und ihre operative Behandlung durch arteriovenöse Intubation *Deutsche med. Wochenschr., Leipz. u. Berl.* 1908. Vol.34. P.1217–1221.

130. Lu X.W., Idu M.M., Ubbink D.T., Legemate D.A. Meta-analysis of the Clinical Effectiveness of Venous Arterialization for Salvage of Critically Ischaemic Limbs. *Eur. J. of Vasc. and Endovasc. Surg.* 2006. Vol. 31. №5. P. 493–499.

131. A.V. Pokrovsky, V.N. Dan, A.G. Khorovets, A.V. Chupin. Arterialization of venous blood flow in the foot in the treatment of severe ischeamia in patients with crural arterial occlusions and non-functioning plantar arch *Khirurgiia (Mosk)*. 1990. №5. P. 35–42.

132. Gasparis A.P., Noor S., Da Silva M.S., Tassiopoulos A.K., Semel L. Distal venous arterialization for limb salvage—a case report. *Vasc Endovascular Surg.* 2002. №36. P. 469–472.

133. Szilagyi D.E., Jay G.D., Munnell E.D. Femoral arteriovenous anastomosis in the treatment of occlusive arterial disease. Arch. Surg. 1951. №63. P. 435–51.

134. Акулова Р.Ф. Хронические нарушения кровообращения и трофики конечностей. М.: «Медицина». 1965. 396 с.

135. Мирский, М.Б. Сосудистая хирургия в России. М.Б. Мирский. Ангиология и сосуд, хирургия. 2001. Т.7. №2. С.114–119.

136. Напалков П. Н. Оппель Владимир Андреевич. Большая медицинская энциклопедия. Главный редактор А. Н. Бакулев. 2-е издание. М.: Советская энциклопедия, 1961. Т. 21. Новорожденный – Органотерапия. С. 973–974.

137. Оппель, Владимир Андреевич. Новый энциклопедический словарь. Под редакцией К. К. Арсеньева. Петроград: Типография Акционерного общества «Брокгауз – Ефрон», 1916. Т. 29. Ньюфаундленд – Отто. С. 547. 960 с.

138. Байтингер В. Ф. Владимир Андреевич Оппель (К 130-летию со дня рождения). Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. Томск: Научно-исследовательский институт микрохирургии Томского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 2003. № 2 (5). С. 52–55.

139. Глянцев С. П. История сосудистой хирургии в России. Часть 1. Хронология основных событий и фактов (1710–2008 гг.). М.: ЗАО «Инфомедиа Паблишерз», 2011. № 1. С. 4–8.

140. Ефременко А. А. Коллатерали сосудистые. Большая медицинская энциклопедия: В 30 томах. Главный редактор Б. В. Петровский. 3-е издание. М.: Советская энциклопедия, 1979. Т. 11. Коамид – Криотерапия. С. 140–143.

141. Зайцев Е. И. Владимир Андреевич Оппель (1872–1932). Вестник хирургии им. И. И. Грекова. СПб.: Эскулап, 1997. Т. 156, № 2. С. 9–10.

142. Бондарчук А.В. Заболевания периферических сосудов. Л.: Медицина, 1969. 519 с.

143. Диб'як Ю.М. Актуальні питання реконструктивної хірургії гомілкових артерій. Буковинський медичний вісник. 2014. Т. 18, № 3. С. 192–195.
144. Кохан Е.П., Пинчук О.В., Кохан В.Е. ПСЭК при облитерирующем атеросклерозе артерий нижних конечностей и возраст пациентов. Хирургия. 2000. №9. С. 41–44.
145. Гавриленко А. В., Кохан Е. П., Абрамян А. В. Применение поясничной симпатэктомии в лечении облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей – современный взгляд на проблему. Ангиол. и сосуд. хир. 2004. Т. 10, № 3. С. 90–95.
146. Дибиров М.Д. Влияние поясничной симпатэктомии на результаты дистальных реконструкций. Ангиол. и сосуд. хир. 2001. Т. 7, №3. С. 48–49.
147. Кохан Е.П., Пинчук О.В. Современные аспекты поясничной симпатэктомии в лечении облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. Ангиол. и сосуд. хир. 1999. Т.5. №1. С. 12–16.
148. DeBakey M.E., Crawford E.S., Morris G.C. Late results of vascular surgery in the treatment of atherosclerosis. J. Cardiovasc. Surg. (Torino) 1964;5:473–80.
149. Литтманн И. Оперативная хирургия. Из-во Академии наук Венгрии. Будапешт, 1981. С. 718–720.
150. Tay VK, Fitridge R, Tie ML. Computed tomography fluoroscopy-guided chemical lumbar sympathectomy: Simple, safe and effective. Australas Radiol 2002;46:163–6.
151. Bhattarai BK, Rahman TR, Biswas BK, Sah BP, Agarwal B. Fluoroscopy guided chemical lumbar sympathectomy for lower limb ischaemic ulcers. JNMA J Nepal Med Assoc 2006;45:295–9.
152. Antao B, Rowlands TE, Singh NP, McCleary AJ. Pelviureteric junction disruption as a complication of chemical lumbar sympathectomy. Cardiovasc Surg 2003;11:42–4.

153. Wijeyaratne SM, Seneviratne LN, Umashankar K, Perera ND. Minimal access is not maximal safety: Pelviureteric necrosis following percutaneous chemical lumbar sympathectomy. *BMJ Case Rep.* 2010. № 20. P. bcr1220092538.
154. Bartel M. Retroperitoneoscopy. *Ztbl. f. Chir.* 1969. №12. P. 377–383.
155. Elliott T.B., Royle J.P. Laparoscopic extraperitoneal lumbar sympathectomie: technique and early results. *Aust. N. Z. J. Surg.* 1996. Vol. 66. №6. P. 400–402
156. Hourlay P., Vangertruyden G., Verduyck F. Endoscopic extraperitoneal lumbar sympathectomy. *Surg. Endosc.* 1995. Vol. 9. №5. P. 530–533.
157. Karanth V. K, Karanth T.K., Karanth L. Lumbar sympathectomy techniques for critical lower limb ischaemia due to non-reconstructable peripheral arterial disease. *Coch. Database Syst. Rev.* 2016. №12. P. CD011519.
158. Jin, H.J.; Bae, Y.K.; Kim, M.; Kwon, S.J.; Jeon, H.B.; Choi, S.J.; Kim, S.W.; Yang, Y.S.; Oh, W.; Chang, J.W. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. №14. P. 17986–18001.
159. Криворучко І.А., Гоні С.-К.Т., Лодяна І.М. Результати лікування хворих на хронічну критичну ішемію нижніх кінцівок. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Медицина.* 2014. № 1 (49). С. 115–117.
160. Криворучко І.А., Гоні С.-К.Т. Перші дані з оцінки якості життя хворих на хронічну критичну ішемію нижніх кінцівок з дистальною формою ураження при лікуванні з та без стимуляції ангіогенезу. *Харківська хірургічна школа.* 2016. № 3. С. 94–96.
161. Крицак М.Ю. Лікування хронічної ішемії нижніх кінцівок у хворих із синдромом стопи діабетика. *Вісник наукових досліджень.* 2013. № 4. С. 36–38.
162. Кутовий О.Б., Амро Аммар О.М. Хірургічне лікування критичної ішемії нижніх кінцівок на тлі атеросклерозу. *Медичні перспективи.* 2012. Т. 17. №3. С. 64–69.

163. Літвінова Н.Ю. Використання пуповинної крові в лікуванні ішемії нижніх кінцівок. Хірургія України. 2015. № 2. С. 112–116.

164. Никоненко А.С., Губка А.В., Волошин А.Н. Ppr-терапия и регулярная физическая нагрузка в комплексе лечения пациентов по поводу дистальной формы артериальной окклюзии. Клінічна хірургія. 2013. № 10. С. 33–37.

165. Никульников П.И., Ратушнюк А.В., Ликсунов А.В. Консервативное лечение пациентов по поводу критической ишемии нижних конечностей. Клінічна хірургія. 2013. №7. С.76–77.

166. Никульников П.И. Опыт применения генного индуктора фактора роста эндотелия сосудов в лечении пациентов по поводу ишемии тканей нижних конечностей атеросклеротического генеза. Клінічна хірургія. 2015. № 5. С. 41–43.

167. Поляченко Ю.В., Салютін Р.В., Паляниця С.С. Перші результати трансплантації мононуклеарних клітин кордової крові як методу стимуляції ангиогенезу у хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок. Клінічна хірургія. 2012. №4. С. 40–41.

168. Салютін Р.В. Лікування хронічної ішемії нижніх кінцівок із застосуванням методу клітинної непрямой реваскуляризації. Буковинський медичний вісник. 2014. Т. 18. № 1. С. 95–98.

169. Салютін Р.В., Домбровський Д.Б., Панченко Л.А. Стан мікроциркуляції у хворих на облітеруючі захворювання судин нижніх кінцівок за умов трансплантації мультипотентних стромальних клітин жирової тканини. Сучасні медичні технології. 2014. № 2. С. 101–104.

170. Park K.W., Kang S-H., Park J.J. Adjunctive Cilostazol Versus Double-Dose Clopidogrel After Drug-Eluting Stent Implantation: The HOST-ASSURE Randomized Trial (Harmonizing Optimal Strategy for Treatment of Coronary Artery Stenosis-Safety & Effectiveness of DrugEluting Stents & Anti-platelet Regimen). JACC: Cardiovasc. Intervent. 2013. Vol. 6, № 9. P. 932–942.

171. Поляченко Ю.В., Салютін Р.В. Ультраструктурні зміни ендотеліоцитів капілярів м'язової тканини у хворих з хронічною ішемією кінцівок після трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки. Клінічна хірургія. 2011. №6. С. 41–45.

172. Дєєв Р.В., Бозо І.Я., Мжаванадзе М.Д. Фаза 2б-3 клінічного дослідження геноопосередкованого терапевтичного ангиогенезу (vegf 165) та відстрочене спостереження за пацієнтами з хронічною ішемією нижніх кінцівок Па-III стадії. Серце і судини. 2013. № 3. С. 77–86.

173. Siracuse JJ, Huang ZS, Gill HL. Defining risks and predicting adverse events after lower extremity bypass for critical limb ischemia. *Vascular Health and Risk Management*. 2014. Vol. 10. P. 367–374.

174. Фомин А.А., Першаков Д.Р., Худояров Т.А. Ангиосомальная теория диагностики заболеваний магистральных сосудов, выбор способа ангиохирургической коррекции и оценка эффективности реваскуляризирующих операций. Материалы 9 международной конференции «Микроциркуляция и гемореология от ангиогенеза до центрального кровообращения». Ярославль, 2013. С. 42–43.

175. Фомин А.А., Новиков Ю.В., Першаков Д.Р. Микроциркуляция в коже нижних конечностей с учетом ангиосомной теории. *Морфология*. 2014. № 6. С. 51–54.

176. Kalish J.A., Farber A., Homa K. Factors associated with surgical site infection after lower extremity bypass in the Society for Vascular Surgery (SVS) Vascular Quality Initiative (VQI). *Journal of vascular surgery*. 2012. Vol. 60 (5). P. 1238–1246.

177. Folkman J. Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.* 2006; 57: 1–18.

178. Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors. In: Hellman S, Rosenberg S. *Important Advances in Oncology*. Philadelphia: JB Lippincott, 1985. P. 42–62.

179. Folkman J. Angiogenesis therapy of human heart. *Circulation*. 1998. №97. P. 628–629.

180. Hershey J. Vascular endothelial growth factor stimulates angiogenesis without improving collateral blood flow following hindlimb ischemia in rabbits. *Heart Vessels*. 2003. №18. P. 142–149.

181. Isner J.M. Myocardial gene therapy. *Nature*. 2002. №415. P. 234–239.

182. Isner J.M., Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* 1999; 103(9), 1231–1236.

183. Kawamura, A. Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J. Artif. Organs*. 2006; 9; 226–233.

184. Kipshidze N, Chekanov V, Chawla P. Angiogenesis in a patient with ischemic limb induced by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor and fibrin platform. *Tex Heart Inst J*. 2000;27(2): 196–200.

185. Masaki I., Yonemitsu Y. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia. *Circulation Research*. 2002. №90. P. 966.

186. Nugent H., Edelman E. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2003; 92(10), 1068–1078.

187. Rajagopalan S., Mohler III E.R., Lederman RJ. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003; 108: 1933–1938.

188. Sellke F., Ruel M. Vascular growth factors and angiogenesis in cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 2003; 75(2), S685–690.

189. Vale PR, Isner JM, Rosenfeld K. Therapeutic angiogenesis in critical limb and myocardial ischemia. *J Interv Cardiol.* 2001 Oct;14(5):511–28.

190. Isner J, Pieczek A, Schainfeld R et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996; 348:370–372.

191. Isner J.M. Angiogenesis for revascularization of ischaemic tissues. 1997; *Eur. Heart J.* 18(1), 1–2.

192. Azuma N., Uchida H., Kokubo T. Factors Influencing Wound Healing of Critical Ischaemic Foot after Bypass Surgery: Is the Angiosome Important in Selecting Bypass Target Artery? *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2012. Vol 43. P. 322–328.

193. Kusumanto Y.H., vanWeel V., Mulder N.H. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther* 2006; 17: 683–691.

194. Поляченко Ю.В., Ніконенко О.С., Салютін Р.В. Клітинна трансплантація: нормативно-правові аспекти, перспективи та напрямки клінічного використання. *Клітинна та органна трансплантологія.* 2013. Т. 1. №2. С. 28–34.

195. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови. *Вопросы онкологии.* 2000. Т. 46. С. 513–520.

196. Смолянинов А.Б. Основы клеточной и генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. М., 2005. 192 с.

197. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15:109–116.

198. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:12846–12851.

199. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. 998:Vol. 282, Issue 5391. P. 1145–1147.

200. Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Oct; 10(10): 724–735.

201. Moore, K.L., T.V.N. Persaud, and A.G. Torchia. *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects*. Philadelphia, PA: Saunders, Elsevier. 2013. 213 p.

202. Jaing T.H. Umbilical cord blood: a trustworthy source of multipotent stem cells for regenerative medicine. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):493–6.

203. Дунаева М.В., Мельничук Ю.В., Мора Т.В. Стволовые клетки и их применение в офтальмологии. *Новини і перспективи медичної науки : зб. мат. XIV конф. студ. та мол. учених : [під ред. проф. І. В. Твердохліба]*. Дніпропетровськ, 2014. 200 с.

204. Хидиров М.А., Якубова М.М., Ганиев Н.Х., Иргашева Д.З., Мироджов Г.К., Миршохи М. Стволовые клетки и регенерация органов. *Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. Биология, медицина*. 2015. №2 (190), 2. С. 63–71.

205. Taguchi T., Suita S., Nakamura M. The efficacy of autologous cord-blood transfusions in neonatal surgical patients. *Journal of Pediatric Surgery*. 2003. Vol. 38, № 4. P. 604–607.

206. Gluckman E., Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica*. 2009. № 94 (4). P. 451–454.

207. Watt S., Contreras M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential. *Sem in. Fetal Neonat. Med*. 2005. Vol. 209, №10. P. 201–207.

208. <https://www.theworldcounts.com/>

209. Arien-Zakay H., Lazarovici P., Nagler A. Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. *Best Pract. Res. Clin. Haematol*. 2010. 23(2): 291–303.

210. Harris, D. T., Rogers, I. Umbilical cord blood: A unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther*. 2(4): 301–309.

211. Theilgaard-Mönch K., Raaschou-Jensen K., Schjødt K., Heilmann C., Vindeløv L., Jacobsen N., Dickmeiss E. Pluripotent and myeloid-committed

CD34+ subsets in hematopoietic stem cell allografts. *Bone Marrow Transplant.* 2003. Vol. 32. №.12. P. 1125–1133.

212. Brink J. G., Hassoulas J. The first human heart transplant and further advances in cardiac transplantation at Groote Schuur Hospital and the University of Cape Town. *Cardiovasc J Afr.* 2009 Feb; 20(1): 31–35.

213. Broxmeyer H. E. Hematopoietic stem cells. In: Trubowitz, S.; Davis, S. *The human bone marrow.* Baton Rouge, FL. CRC Press; 1982:77–123.

214. Gluckman E, Broxmeyer H A, Auerbach A D, Friedman H S, Douglas G W, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989 Oct 26;321(17):1174–8.

215. Ballen K. K., Gluckman E., Broxmeyer H. E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood.* 2013 Jul 25; 122(4): 491–498.

216. Lauber S, Latta M, Klüter H, Müller-Steinhardt M. The Mannheim Cord Blood Bank: experiences and perspectives for the future. *Transfus Med Hemother.* 2010 Apr;37(2):90–7.

217. Welte K, Foeken L, Gluckman E, Navarrete C. International exchange of cord blood units: the registry aspects. *Bone Marrow Transplant.* 2010 May;45(5):825–31.

218. Henning R.J., Dennis S., Sawmiller D. Human umbilical cord blood mononuclear cells activate the survival protein Akt in cardiac myocytes and endothelial cells that limits apoptosis and necrosis during hypoxia. *Translational Research.* 2012. Vol. 159. № 6. P. 497–506.

219. Laufs U., Werner N., Link A. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004. № 109 (2). P. 220–226.

220. Seals D.R., Desouza C.A., Donato A.J., Tanaka H. Habitual exercise and arterial aging. *J Appl Physiol.* 2008. № 105 (4). P. 1323–1332.

221. Schmidt D., Hoerstrup S.P. Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Med Wkly*. 2007. Vol.137. № 2. P. 80–85.

222. Mansour S., Roy D.C., Lemieux B. Stem cell therapy for the broken heart: mini-organ transplantation. *Transplant Proc*. 2009. №8. P. 3353–3357.

223. Shafy A., Lavergne T., Latremouille C. Association of electrostimulation with cell transplantation in ischemic heart disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009. № 138 (4). P. 994–1001.

224. Genovese J, Cortes-Morichetti M., Chachques E. Cell based approaches for myocardial regeneration and artificial myocardium. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2007. № 2 (2). P. 121–127.

225. Антипкін Ю.Г., Книшов Г.В., Авраменко Т.В. Сучасні проблеми вроджених вад серця та їх корекція у новонароджених дітей. *Перинатологія і педіатрія*. 2009. № 1 (37). С. 23–28.

226. Матеріали VI Форуму вроджених вад серця, 22–23 вересня 2011 р. інформ. бюл. К.: Науково-практичний центр дитячої кардіології і кардіохірургії МОЗ України, 2011. 152 р.

227. Fedevych O., Chasovskyi K., Vorobiova G. Open cardiac surgery in the first hours of life using autologous umbilical cord blood. *European Journal of Cardio Thoracic Surgery*. 2011. Vol. 40, № 4. P. 985–989.

228. Насадюк Х.М. Клітинні технології з використанням пуповинної крові в терапії невиліковних захворювань. *Здоров'я України*. 2010. № 4 (31). С. 22–25.

229. Chiang J.L., Haller M.J., Schatz D.A. Update on Global Intervention Studies in Type 1 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2012. Vol. 41. № 4. P. 695–712.

230. Бобро М.С., Нечипуренко К.О., Ковалькова Г.О. Розповсюдженість патології печінки у хворих з ендокринними захворюваннями. *Питання експериментальної та клінічної медицини. Збірник статей*. 2012. № 16. Т. 3. С. 37–42.

231. Snarski E., Milczarczyk A., Torosian T. Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type. *Bone Marrow Transplantation*. 2011. №46. P.562–566.

232. Селезньова О.В. Вплив трансплантації культур клітин підшлункової залози і стовбурових клітин на патогенез експериментального цукрового діабету: дис. канд. наук: 14.03.04. К., 2008. 18 с.

233. Arien-Zakay H., Lecht S., Bercu M. M. Neuroprotection by cord blood neural progenitors involves antioxidants, neurotrophic and angiogenic factors. *Experimental Neurology*. 2009. Vol. 216, № 1. P. 83–94.

234. Freedman M.S., Bar-Or A., Atkins H.L. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis: consensus report of the International MSCT Study Group. *Mult Scler*. 2010. Vol. 16. №4. P. 503–510.

235. Min K, Song J, Kang J.Y. Umbilical cord blood therapy potentiated with erythropoietin for children with cerebral palsy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Department of Rehabilitation Medicine, CHA University, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea. *Stem Cells*. 2013. №31 (3). P. 581–91.

236. Costantine M.M., Weiner S.J., Rouse D.J. Umbilical cord blood biomarkers of neurologic injury and the risk of cerebral palsy or infant death. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2011. Vol, №8. 29. P. 917–922.

237. Zwart I., Hill A.J., Al-Allaf F. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Experimental Neurology*. 2009. Vol. 216. № 2. P. 439–448.

238. Petrovic A., Dorsey M., Miotke J. Hematopoietic stem cell transplantation for pediatric patients with primary immunodeficiency diseases at All Children's Hospital University of South Florida. *Immunol Res*. 2009. № 44 (1-3). P. 169–178.

239. Spanholz J., Tordoir M., Eissens D. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One*. 2010. № 5 (2). P. 205–209.
240. Pinto F.O., Roberts I., *Haematol Br. J.* Cord blood stem cell transplantation for haemoglobinopathies. 2008. № 3. P. 309–324.
241. Haller M.J. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp. Hematol*. 2008. № 36 (6). P.710–715.
242. Iyer S.S., Co C., Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med*. 2009. № 1. P. 5–16.
243. Sullo N., Maione S. Stem cell therapy: the great promise in lung disease. *Ther Adv Respir Dis*. 2008. № 3. P.173–177.
244. Ying-Nan Z., Pu-Chang L., Xing W. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*. 2009. Vol. 11. № 5. P. 548–558.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

Стаття у науковому фаховому виданні України:

1. Домбровський Д. Б., Пшиборовська Ю. Р., Яковець К. І., **Савін В. В.**, Оліник Ю. В., Максим'юк В. В. Характеристика та шляхи використання стовбурових клітин кордової крові. Буковинський медичний вісник. 2014. Т. 18. №1(69). С. 151–155. *(Здобувачем досліджено результати використання клітин кордової крові при різних нозологіях, написано статтю).*

2. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р. Трансплантація клітин кордової крові як метод лікування хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2018. №22(3). С. 450–455. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із хронічною ішемією, написано статтю).*

Статті у наукових фахових виданнях України,

включені до міжнародних наукометричних баз даних:

3. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Оліник Ю. В., Пшиборовська Ю. Р., Максим'юк В. В. Імуногістохімічна характеристика диференціації клітин кордової крові за різних умов трансплантації в експерименті. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2013. №12(4). С. 32–37. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

4. Домбровський Д. Б. **Савін В. В.**, Максим'юк В. В. Морфологічна та імуногістохімічна характеристика трансплантації стовбурових клітин пуповинної крові за умов ішемії кінцівок в експерименті. Клінічна та експериментальна патологія. 2015. Т. XIV. №1(51). С. 51–54. *(Здобувачем*

досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).

5. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.** Оцінка стану мікрогемодинаміки за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії у хворих із хронічною ішемією нижніх кінцівок після трансплантації клітин кордової крові. Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука. 2016. №1(73). С. 34–37. *(Здобувачем проведено оцінку даних лазерної доплерівської флоуметрії після трансплантації клітин кордової крові, написано статтю).*

6. Савін В. В. Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов експериментальної ішемії. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016. №15(3). С. 81–86. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

7. Dombrovsky D. B., **Savin V. V.**, Maksymyuk V.V ., Transplantation of the cord blood stem cells under conditions of experimental ischemia. Morphological and immunohistochemical characteristics. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2017. №16(1). С. 65–69. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

**Стаття у науковому виданні іншої держави,
яка входить до Європейського Союзу:**

8. Dombrovskyi D. B., **Savin V. V.**, Oliynyk Yu. V., Sheremet M. I., Pshyborovska Yu.R. Clinical and functional aspects of cord blood cell transplantation in patients with distal lesion of lower limb arteries. Letters in Applied NanoBioScience. 2020. Vol. 9(2). P. 952–955. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із дистальним ураженням, написано статтю).*

Статті у інших наукових виданнях України:

9. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Пшиборська Ю. Р. Клініко-функціональні аспекти трансплантації клітин кордової крові у хворих із

дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Медицина. 2020. №1. С. 38–44. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із хронічною ішемією, написано статтю).*

10. Домбровський Д. Б., Салютін Р. В., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р. Імуногістохімічна характеристика процесів після трансплантації клітин кордової крові при ішемії кінцівок в експерименті. Клінічна флебологія. 2013. №6(1). С. 29–33. *(Здобувачем запропоновано трансплантацію клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано статтю).*

11. Домбровський Д. Б., Давиденко І. С., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р., Масний О. І. Клініко-експериментальні аспекти клітинної трансплантації при хронічній ішемії кінцівок. Клінічна флебологія. 2014. №7(1). С. 150–151. *(Здобувачем досліджено результати експериментальних та клінічних досліджень використання клітин кордової крові при хронічній ішемії, написано статтю).*

12. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Масний О. І. Стимуляція ангіогенних процесів за умов ішемії кінцівок в експерименті та в клініці після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. Клінічна флебологія. 2015. №8(1). С. 94–95. *(Здобувачем досліджено результати експериментальних та клінічних досліджень використання клітин кордової крові при хронічній ішемії, написано статтю).*

13. Домбровський Д. Б., Салютін Р. В., **Савін В. В.** Непряма реваскуляризація як метод вибору в лікуванні хворих з ураженням артеріального дистального русла. Клінічна флебологія. 2016. №9(1). С. 69–70. *(Здобувачем досліджено ефективність непрямих методів при хронічній ішемії, написано статтю).*

14. **Савін В. В.**, Домбровський Д. Б., Пшиборовська Ю. Р. Трансплантація клітин кордової крові у хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Клінічна флебологія. 2017. №10(1). С. 53–54.

(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із дистальним ураженням, написано статтю).

Тези наукових доповідей:

15. Dombrovsky D. B., Olinyk Ju. V., **Savin V. V.**, Pshiborovska Ju. R. Ultrastructural changes of vascular endothelial during transplantation of mesenchymal stem cells of fatty tissue at term of ischemia in experiment. Medicine of the republic of Moldova: The XIX session of Balkan medical days and the second congress of emergency, Moldova, September 22–24, 2013: abstracts book. Archives of the Balkan Medical Union. 2013. Vol. 48(3). P. 109. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано тези).*

16. Домбровський Д. Б., Салютін Р. В., Олійник Ю. В., **Савін В. В.** Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов ішемії в експерименті. Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 22–23 листопада 2013 року: тези доповіді. Київ, 2013. С. 40–45. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано тези).*

17. Домбровський Д. Б., Пшиборовська Ю. Р., **Савін В. В.** Клініко-експериментальні аспекти клітинної трансплантації при хронічній ішемії кінцівок. XV конгрес Світової Федерації Українських Лікарських Товариств, м. Чернівці, 16–18 жовтня 2014 року: тези доповіді. Чернівці, 2014. С. 271–272. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із хронічною ішемією, написано тези).*

18. Домбровський Д. Б., Салютін Р. В., **Савін В. В.**, Олійник Ю. В. Стимуляція процесів ангиогенезу за умов ішемії кінцівок в експерименті. 95 підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького персоналу Буковинського державного медичного університету, присвячена 70-річчю, м. Чернівці, 17–21 лютого 2014 року: тези доповіді. Чернівці, 2014.

С. 111–112. *(Здобувачем досліджено вплив клітин кордової крові в експериментальній моделі ішемії, написано тези).*

19. **Савін В. В.**, Домбровський Д. Б., Масний О. І. Стимуляція ангиогенних процесів за умов ішемії кінцівок в експерименті та в клініці після трансплантації стовбурових клітин кордової крові. 97 підсумкова наукова конференція професорсько-викладацького складу Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці, 15–22 лютого 2016 року: тези доповіді. Чернівці, 2016. С. 156–157. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із хронічною ішемією, написано тези).*

20. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р. Трансплантація кордової крові у лікуванні пацієнтів з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Сухаревські читання – ангиологія та судинна хірургія сьогодні: Конгрес асоціації судинних хірургів, флебологів та ангиологів України, м. Київ, 11–12 квітня 2019 року: тези доповіді. Клінічна флебологія. 2019. №11(1). С. 53–55. *(Здобувачем запропоновано та виконано трансплантацію клітин кордової крові у хворих із дистальним ураженням, написано статтю).*

Патент на корисну модель:

21. Домбровський Д. Б., **Савін В. В.**, Пшиборовська Ю. Р. Патент на корисну модель №131176 Україна, МПК А61В 17/00. Спосіб лікування хворих з ішемією нижніх кінцівок; власник Вищий державний навчальний заклад «Буковинський державний медичний університет» МОЗ України; № u201806800; заявлено 15.06.2018; опубліковано 10.01.2019. Бюл. №1. *(Здобувачем запропоновано спосіб лікування хворих з ішемією нижніх кінцівок шляхом трансплантації стовбурових клітин в зону ішемізованої м'язової тканини гомілки у вигляді стрічкової доріжки вздовж облітерованих судин за допомогою довгої канюлі та оформлено патент).*

ВПРОВАДЖЕННЯ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної роботи
 Вінницького національного медичного
 університету ім. М.І. Пирогова
 проф. Гумінський Ю.Й.



_____ 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
2. **Установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові автора:** Буковинський державний медичний університет, кафедра хірургії №1, 58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2. Домбровський Дмитро Борисович, Савін Володимир Васильович.
3. **Джерела інформації:**
 1. Домбровський Д.Б., Савін В.В., Пшиборовська Ю.Р. Трансплантація стовбурових клітин кордової крові в умовах експериментальної ішемії, морфологічна та імуногістохімічна характеристика. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2017; 16(1):65-69.
 2. Савін В. В. Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов експериментальної ішемії. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016; 15(3):81-86.
4. **Де впроваджено** в навчальний процес кафедри ендоскопічної та серцево-судинної хірургії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.
5. **Термін впровадження:** з вересня по грудень 2020 р.
6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелах інформації про впровадження (п.3):** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
7. **Зауваження, пропозиції:** оформити авторське право на дану пропозицію

Відповідальний за впровадження,
 завідувачка кафедри ендоскопічної та
 серцево-судинної хірургії Вінницького
 національного медичного університету
 ім. М.І. Пирогова, д.мед.н., професор



Петрушенко В.В.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Декан медичного факультету
ДВНЗ «Жгородського національного
університету»

д.мед.н., професор Болдіжар О.О.

«02» серпня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
2. **Установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові автора:** Буковинський державний медичний університет, кафедра хірургії №1, 58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2. Домбровський Дмитро Борисович, Савін Володимир Васильович.
3. **Джерела інформації:**
 1. Домбровський Д.Б., Савін В.В., Пшиборовська Ю.Р. Трансплантація стовбурових клітин кордової крові в умовах експериментальної ішемії, морфологічна та імуногістохімічна характеристика. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2017; 16(1):65-69.
 2. Савін В. В. Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов експериментальної ішемії. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016; 15(3):81-86.
4. **Де впроваджено:** в навчальний процес кафедри хірургії №1 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.
5. **Термін впровадження:** з вересня по грудень 2020 р.
6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелах інформації про впровадження (п.3):** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
7. **Зауваження, пропозиції:** оформити авторське право на дану пропозицію

Відповідальна за впровадження:
зав. кафедрою хірургічних
хвороб медичного факультету,
д.мед.н., професор



Болдіжар П.О.

“ЗАТВЕРДЖУЮ” *Степанюк*
 В.о. директора ОКНП
 "Чернівецька обласна клінічна
 лікарня"
 Цинтар С.А.
 “26” *січня* 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
2. **Ким запропоновано, адреса, виконавці:** Буковинський державний медичний університет, кафедра хірургії №1, 58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2. Домбровський Дмитро Борисович, Савін Володимир Васильович.
3. **Джерело інформації:** Домбровський Д.Б., Салютін Р.В., Савін В.В., Пшиборовська Ю.Р. Трансплантація клітин кордової крові у хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Клінічна флебологія. 2017; 10 (1): 53-54.
4. **Впроваджено в обласне комунальне неприбуткове підприємство «Чернівецька обласна клінічна лікарня».**
5. **Термін впровадження:** з січня 2020р. по січень 2021р.
6. **Загальна кількість спостережень 9.**
7. **Ефективність впровадження порівняно з критеріями, викладеними в джерелі інформації**

ПОКАЗНИКИ	За даними розробників	За даними організації, яка впроваджує
Зменшення переміжної кульгавості за 6 міс.	Збільшення дистанції безболісної ходьби на 9.1%	Збільшення дистанції безболісної ходьби на 8.5%

8. **Зауваження, пропозиції:** Впровадити трансплантацію стовбурових клітин кордової крові в комплексне лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок.

“26” січня 2021 року

Відповідальний за впровадження:
 завідувач відділення хірургії судин,
 д.мед.н., проф.

Домбровський Д.Б.
 Домбровський Д.Б.



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор комунального
некомерційного підприємства
"Вінницька обласна клінічна
лікарня ім. М.І. Пирогова
Вінницької обласної ради"

Жупанов О. Б.

“20” січня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
2. **Ким запропоновано, адреса, виконавці:** Буковинський державний медичний університет, кафедра хірургії №1, 58000, м. Чернівці, пл.Театральна, 2. Домбровський Дмитро Борисович, Савін Володимир Васильович.
3. **Джерело інформації:** Домбровський Д.Б., Салютін Р.В., Савін В.В., Пшиборовська Ю.Р. Трансплантація клітин кордової крові у хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Клінічна флебологія. 2017; 10 (1): 53-54.
4. **Впроваджено в** комунальне некомерційне підприємство «Вінницька обласна клінічна лікарня ім. М.І. Пирогова Вінницької обласної ради».
5. **Термін впровадження:** з березня 2020 р. по січень 2021 р.
6. **Загальна кількість спостережень** 8.
7. **Ефективність впровадження порівняно з критеріями, викладеними в джерелі інформації**

ПОКАЗНИКИ	За даними розробників	За даними організації, яка впроваджує
Зменшення переміжної кульгавості	Збільшення безбольової ходьби на 9.1%	Збільшення безбольової ходьби на 8.5%

8. **Зауваження, пропозиції:** Впровадити трансплантацію стовбурових клітин кордової крові в комплекс лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок.

“20” січня 2021 року

Відповідальний за впровадження:
Завідувач відділенням хірургії судин

Скупий О.М.

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор комунального
некомерційного підприємства
"Олександрівська клінічна лікарня
м. Києва" Київської міської
державної адміністрації
Антоненко Л.П.

“ 26 ” _____ 20__ р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Клітинна стимуляція ангіогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
2. **Ким запропоновано, адреса, виконавці:** Буковинський державний медичний університет, кафедра хірургії №1, 58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2. Домбровський Дмитро Борисович, Савін Володимир Васильович.
3. **Джерело інформації:** Домбровський Д.Б., Салютін Р.В., Савін В.В., Пшиборовська Ю.Р. Трансплантація клітин кордової крові у хворих з дистальним ураженням артерій нижніх кінцівок. Клінічна флебологія. 2017; 10 (1): с. 53-54.
4. **Впроваджено в** КНП "Олександрівська клінічна лікарня м. Києва" виконавчого органу Київської міської ради (Київської міської державної адміністрації).
5. **Термін впровадження:** з березня 2020р. по січень 2021р.
6. **Загальна кількість спостережень** 6.
7. **Ефективність впровадження порівняно з критеріями, викладеними в джерелі інформації**

ПОКАЗНИКИ	За даними розробників	За даними організації, яка впроваджує
Зменшення переміжної кульгавості за 6 міс.	Збільшення дистанції безбольової ходьби на 9.1%	Збільшення дистанції безбольової ходьби на 8.3%

8. **Зауваження, пропозиції:** Впровадити трансплантацію стовбурових клітин кордової крові в комплексне лікування хворих на хронічну ішемію кінцівок.

“ 25 ” 01 2021 року

Відповідальний за впровадження
(посада, підпис)

Київська міська державна адміністрація
Київська міська лікарня №1
Київська міська лікарня №1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної та
навчальної роботи
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця
Доктор медичних наук,
професор, полковник медичної служби
Власенко О.М.
« 29 » 01 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
2. **Установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові автора:** Буковинський державний медичний університет, кафедра хірургії №1, 58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2. Домбровський Дмитро Борисович, Савін Володимир Васильович.
3. **Джерела інформації:**
 1. Домбровський Д.Б., Савін В.В., Пшиборовська Ю.Р. Трансплантація стовбурових клітин кордової крові в умовах експериментальної ішемії, морфологічна та імуногістохімічна характеристика. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2017; 16(1):65-69.
 2. Савін В. В. Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов експериментальної ішемії. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016; 15(3):81-86.
4. **Де впроваджено** в навчальний процес кафедри хірургії з курсом невідкладної та судинної хірургії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.
5. **Термін впровадження:** з вересня по грудень 2020 р.
6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелах інформації про впровадження (п.3):** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
7. **Зауваження, пропозиції:** оформити авторське право на дану пропозицію

Відповідальний за впровадження,
Кафедра хірургії з курсом невідкладної
та судинної хірургії
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця, д.мед.н., професор

Сусак Я.М.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І.Горбачевського, д.мед.н., професор
Шульгай А.Г.
« 23 » 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
2. **Установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові автора:** Буковинський державний медичний університет, кафедра хірургії №1, 58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2. Домбровський Дмитро Борисович, Савін Володимир Васильович.
3. **Джерела інформації:**
 1. Домбровський Д.Б., Савін В.В., Пшиборовська Ю.Р. Трансплантація стовбурових клітин кордової крові в умовах експериментальної ішемії, морфологічна та імуногістохімічна характеристика. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2017; 16(1):65-69.
 2. Савін В. В. Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов експериментальної ішемії. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016; 15(3):81-86.
4. **Де впроваджено в навчальний процес кафедри хірургії №2 Тернопільського національного медичного університету імені І.Горбачевського**
5. **Термін впровадження:** з вересня по грудень 2020 р.
6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелах інформації про впровадження (п.3):** Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.
7. **Зауваження, пропозиції:** оформити авторське право на дану пропозицію

Відповідальний за впровадження,
завідувач кафедри хірургії №2
д.мед.н., професор

Венгер І.К.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник директора з наукової роботи
ДУ «Національний інститут хірургії та
трансплантології ім.О.О.Шалімова НАМН України»
Костилен М.В.

« 25 » 01 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція до впровадження: Клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.

2. Установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по-батькові автора: Буковинський державний медичний університет, кафедра хірургії №1, 58000, м. Чернівці, пл. Театральна, 2. Домбровський Дмитро Борисович, Савін Володимир Васильович.

3. Джерела інформації:

1. Домбровський Д.Б., Савін В.В., Пшиборовська Ю.Р. Трансплантація стовбурових клітин кордової крові в умовах експериментальної ішемії, морфологічна та імуногістохімічна характеристика. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2017; 16(1):65-69.

2. Савін В. В. Зміни гістологічної структури м'язової тканини за умов експериментальної ішемії. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016; 15(3):81-86.

4. Де впроваджено в практичну діяльність відділу хірургії магістральних судин ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім.О.О.Шалімова НАМН України».

5.

6. Термін впровадження: з вересня по грудень 2020 р.

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелах інформації про впровадження (п.3): клітинна стимуляція ангиогенезу в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок.

8. Зауваження, пропозиції: оформити авторське право на дану пропозицію.

Завідувач відділу хірургії
магістральних судин ДУ
«Національний інститут хірургії та
трансплантології ім. О.О. Шалімова
НАМН України», д.мед.н., професор

Нікульніков П.І.