

© ДОЛГИХ О.А., ГОРБУНОВА В.О.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РЕКОНСТРУКЦИИ МАГИСТРАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ В МОДЕЛИ АТЕРОГЕНЕЗА С ПОМОЩЬЮ ПРИРОДНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ

О.А. Долгих, В.О. Горбунова

Красноярский государственный медицинский университет

им. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов;

кафедра оперативной хирургии с топографической анатомией,

зав. – д.м.н., проф. П.А. Самотесов; кафедра патологической анатомии им.

П.Г. Подзолкова, зав. – д.м.н., проф. Л.Д. Зыкова, научные руководители: д.м.н.,

проф. И.Н. Большаков, д.м.н., проф. А.К. Кириченко.

Резюме. Данное исследование посвящено изучению реконструкции магистральных артерий нижних конечностей при атерогенезе с помощью природных биополимеров у 42 белых беспородных лабораторных крыс, которые в течение 60 дней получали холестериновую диету. Затем, в околососудистое пространство левой конечности помещался один из шести образцов хитозанового биополимера. При помещении биополимера в паравазальное пространство наблюдается реконструкция сосудистой стенки с уменьшением ее толщины и увеличением площади просвета сосуда.

Ключевые слова: экспериментальный атеросклероз, магистральные артерии, околососудистое пространство, реконструкция сосудистой стенки хитозановыми биополимерами, холестериновая диета.

Долгих Олег Анатольевич – клинический ординатор, Городская больница № 6; e-mail: olegdol@mail.ru, тел 8(391)2469406.

Горбунова Виктория Олеговна – студентка 509 группы лечебного факультета КрасГМУ; тел 8(391)2431540.

По современным представлениям, атеросклероз – это хроническая системная воспалительная реакция организма, развивающаяся на фоне дислипидемии и образования одиночных или множественных очагов липидных отложений (атероматозных бляшек) на внутренней поверхности сосудов [2,10]. Установлено, что при гиперхолестеринемии изменяется структура эндотелия: увеличивается содержание холестерина (ХС) и соотношение ХС/фосфолипиды в мембране эндотелиальных клеток, [11,13] что приводит к нарушению барьерной функции эндотелия и повышению его проницаемости для липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [1,5,6]. Клиническое и прогностическое значение атеросклероза определяется в основном количеством бляшек, подвергшихся повреждению (эрозия, трещина, надрыв, разрыв) с последующим формированием пристеночного или окклюзирующего тромба [8,12]. Атеросклероз – процесс, лежащий в основе большинства заболеваний системы кровообращения (ишемия, инфаркт миокарда, тромбоз, инсульт, гангрена нижних конечностей и др.) [4]. Смертность от инсульта и сердечно-сосудистых заболеваний, одной из основных причин которых является атеросклероз, уже давно занимает первое место в мире (в России – немногим более 50%), и, несмотря на все достижения медицины, эта печальная статистика остается неизменной [5,6].

Одним из актуальных вопросов профилактики и лечения атеросклеротических проявлений является восстановление просвета сосудистого русла для полноценного кровоснабжения пораженного атеросклерозом участка. Вопросы реконструкции сосудистой стенки при атерогенезе разработаны крайне недостаточно, а технологии восстановления внутренних слоев сосуда медикаментами практически отсутствуют [8,9,14].

Целью работы явилась разработка в эксперименте на животных малоинвазивных способов реконструкции магистральных сосудов нижних конечностей при атерогенезе с помощью природных биополимеров.

Материалы и методы

В эксперименте использованы 48 белых беспородных лабораторных крыс $m=250\pm15$ г. Животные были разделены на 8 групп, по 6 подопытных животных в группе. В первую группу входили интактные животные. Во вторую группу – животные, получавшие холестериновую диету и не подвергавшиеся оперативному вмешательству. С третьей по восьмую группу – животные, получавшие холестериновую диету и в околососудистое пространство магистральных артерий левой конечности, которых помещался один из шести образцов биополимера (патент РФ №2311139, 27.11.2007г.). Для исследований были выбраны шесть образцов биополимеров: третьей группе вводился – хитозан хлоргидрат 1% гель, молекулярная масса (Мм) 100 килодальтон (kDa), степень деацетилирования (СД) 87%; четвертой группе – хитозан аскорбат 1% гель, Мм 700 kDa 98% СД; пятой группе – аскорбат хитозан-альгинат натрия 1% гель, Мм 700 kDa, СД 98%; шестой группе – сульфатированный водорастворимый хитозан Мм 250 kDa, СД 85%; седьмой группе – 1% раствор каррагинана (И.М.Ермак, ТИБОХ); восьмой группе – 1% раствор полиэтиленгликоля.

Модель атерогенеза создавалась на 42 беспородных белых лабораторных крысах, животные со второй по восьмую группы. Крысы в течение 60 дней получали холестериновую диету, состоящую из отрубей, холестерина, витамина D₂, подсолнечного масла, хелевой кислоты. На 40 сутки получения холестериновой диеты крысам на левой конечности, в нижней трети голени, в проекции нервно-сосудистого пучка производилось рассечение кожных покровов и подкожно-жировой клетчатки, в паравазальное пространство вводился один из шести биополимеров (опыт), а правая конечность оставалась контрольной (контроль). Заполнение периаартериального пространства производили на всем протяжении голени и бедра. Продолжалось назначение холестериновой диеты.

На 60 сутки (20 дней после имплантации биополимера) подопытные животные были выведены из эксперимента. У половины крыс всех групп были отпрепарированы магистральные сосуды, начиная от брюшной аорты до

подколенного сегмента обеих конечностей. У животных были взяты образцы крови и сосудистой стенки для определения липидного спектра, у второй половины животных был забран комплекс мягких тканей бедра и голени обеих конечностей, включающий сосудисто-нервный пучок, для выполнения гистологических исследований. Образцы тканей после фиксации в забуференном нейтральном растворе формалина заливались в парафин [3]. Гистологическая проводка тканей и выполнение серийных срезов осуществлялись на автоматизированной системе Leica (Германия). Гистологические срезы для обзорного анализа окрашивались гематоксилином и эозином [3].

С помощью микроскопа марки Leica DMLB, с применением программы цифровой технологии Image Tool, морфометрическим анализом определены: площадь просвета сосудистой стенки (мкм^2) и толщина всех слоев тканей стенки магистральных сосудов (мкм).

Уровень общих липидов крови, триглицеридов, неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) определялся с помощью спектрофотометра СФ-46.

Результаты эксперимента обработаны статистически общепринятыми методами [7] с определением средней арифметической величины (M), и средней ошибки средней арифметической величины (m). Различия считались существенными при вероятности 95% ($P \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Атеросклеротическая диета, примененная животным в течение 60 дней, вызывала у крыс гиперлипидемию, о чем свидетельствует увеличение уровней содержания общих липидов, триглицеридов и НЭЖК в их крови, по сравнению с первой группой животных (табл.1).

Таблица 1

Содержание липидов в крови крыс, получавшие холестериновую диету, без введения биополимера, по сравнению с интактными (г/л).

Параметры	Первая группа	Вторая группа	P
Общие липиды	5,13±0,02	13,15±0,04	P≤0,05
Триглицериды	1,10±0,01	2,66±0,01	P≤0,05
НЭЖК	0,06±0,01	1,75±0,01	P≤0,05

Установлено, что содержание общих липидов в тканях сосудистой стенки бедренной артерии опытной конечности животных третьей, четвертой и шестой групп достоверно меньше ($P \leq 0,05$) по сравнению со второй группой. В третьей и четвертой группе этот показатель был даже ниже, чем у первой. Также отмечено, что падение уровня общих липидов в тканях сосудистой стенки в опытной конечности по сравнению с контрольной наблюдалось во всех группах животных (кроме пятой), которым вводились биополимеры (табл. 2).

Таблица 2

Содержание общих липидов и триглицеридов в тканях сосудистой стенки бедренной артерии опытной и контрольной конечностей (г/л).

Номер группы	Общие липиды		Триглицериды	
	контроль	опыт	контроль	опыт
1.	2,68±0,01		0,95±0,03	
2.	8,15±0,06		2,43±0,84	
3.	4,98±0,70	2,21±0,70*	2,14±0,25	1,00±0,46*
4.		1,96±0,07*		0,57±0,27*
5.		5,39±2,10**		1,13±0,32*
6.		2,60±0,24*		1,08±0,01*
7.		4,21±0,33**		1,86±0,10**
8.		4,52±0,28**		1,56±0,36**

Примечание: * $P \leq 0,05$; ** $P > 0,05$ - по отношению к показателям контрольной группы.

Содержание триглицеридов в тканях стенки бедренной артерии у животных с третьей по восьмую группы обнаружено сниженным в сравнении со второй группой в обеих конечностях. В стенке бедренной артерии опытной конечности отмечено значительное снижение триглицеридов по сравнению с контрольной при введении всех биополимеров особенно в 3-6 группах (табл. 2).

Содержание общих липидов в тканях стенки подвздошной артерии, расположенной непосредственно выше бедренной артерии с биополимерной рубашкой, было выше показателей первой и второй группы. Однако уровень их отличен, ниже в опытной конечности, чем в контрольной.

Площадь просвета бедренной артерии опытной конечности у третьей и четвертой группы практически не отличается от контрольной и значительно меньше показателей первой группы. Реконструкция просвета бедренной артерии опытной конечности до показателей первой группы наблюдается в пятой группе. В шестой и седьмой группе отмечена реконструкция просвета бедренной артерии опытной конечности приблизительно на 2/3 по сравнению с контрольной, однако эти показатели меньше, чем в первой группе (табл. 3).

Таблица 3

***Площадь просвета артерии в опытной и контрольной конечности
(мм²).***

Номер группы	контроль	опыт	P
1.	30090±319,8		
2.	6372±82,4		
3.	4611±84,4	4343±78,5	P>0,05
4.	6503±93,1	5524±69,3	P>0,05
5.	11369±103,7	29541±276,3	P≤0,05
6.	3352±63,4	18066±181,6	P≤0,05
7.	6306±77,9	19357±124,8	P≤0,05
8.	5317±92,4	3923±59,1	P>0,05

Процесс атерогенеза приводит к увеличению толщины сосудистой стенки бедренной артерии как контрольной, так и опытной конечности у крыс по сравнению с первой группой (P≤0,05). Однако, при введении биополимеров, в третьей, четвертой, пятой и восьмой группах отмечено, что в опытной конечности толщина сосудистой стенки бедренной артерии меньше чем в контрольной (P≤0,05)(рис. 1).

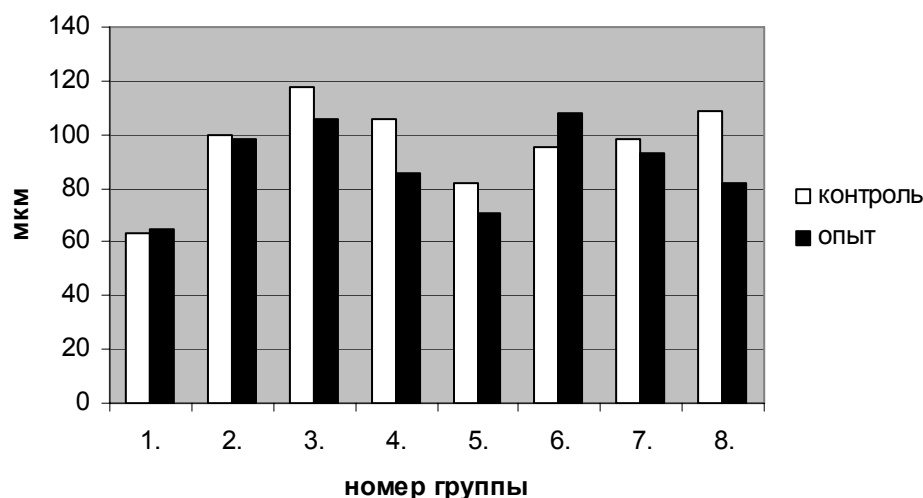


Рис.1 Толщина всех слоев тканей стенки бедренной артерии в опытной и контрольной конечностях.

Таким образом, холестериновая диета в течение 60 дней у белых беспородных лабораторных крыс формирует модель атерогенеза с выраженной гиперлипидемией.

Толщина всех слоев тканей стенки бедренной артерии при холестериновой диете увеличивается, а площадь просвета – уменьшается.

Создание паравазальной биополимерной рубашки за счет кислых солей Хитазана и сульфатированной его формы снижает уровень общих липидов в тканях стенки бедренной артерии контактировавшей с биополимером, по сравнению с магистральным сосудом противоположной конечности, где контакт с биополимером отсутствовал.

Введение в околососудистое русло 1% геля хлоргидрата хитозана, аскорбата хитозана и сульфатированного хитозана приводит к снижению толщины всех слоев тканей стенки бедренной артерии и увеличению площади ее просвета.

Паравазальная имплантация хитозановых биополимеров может рассматриваться как перспективное направление в изучении молекулярных основ в патоморфологии и в реконструкции сосудистой стенки любой локализации при атерогенезе.

Литература

1. Андожская Ю.С., Гирина М.Б., Васина Е.Ю. Современные методы оценки микроциркуляции в эфферентной терапии при лечении больных с атеросклерозом // Регионар. Кровообращ. и микроциркуляция. – 2002. – № 1. – С. 47-60.
2. Аронов Д.М. Лечение и профилактика атеросклероза. – М.: Триада -Х, 2000. – С . 9-18; 367-373.
3. Граменицкий Е.Н. Прижизненная окраска клеток и тканей в норме и патологии. М.: Медицина, 1963. – 152 с.
4. Дзяк Г.В., Коваль Е.Л. Атеросклероз и воспаление // Пробл. стар. и долголетия.– 1999.– №3.– С. 316–326.
5. Карпов Ю.А., Сорокин Е.В. Интенсивное медикаментозное лечение больных с атеросклерозом // Кардиология. – 2005. – №8. – С.4-7.
6. Климов А.Н., Никуличева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения.– Санкт-Петербург: Питер, 1999.– 505 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Медицина, 1980. – 297 с.
8. Лопухин Ю .М ., Арчаков А .И ., Владимиров Ю .А ., и др. Холестериноз. – М.: Медицина, 2003. –246 с.
9. Орехов А.Н., Пивоварова Е.М. Поиск антисклеротических лекарств прямого действия // Ангиол. и сосуд. хирургия. – 1995. – №3. – С. 126-135.
10. Тарасенко Г.А. Экспериментальное обоснование гипохолестеринемического действия хитозана из панциря Камчатского краба. Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана. – М.: Щелково, 1999. – С. 198-199.
11. Троцкий А.В., Лысенко Е.Р., Хабазов Р.И. и др. Результаты реконструктивных операций у больных с поражением артерий голени //Ангиол. и сосуд. хирургия. – 2003. – Т.9, №1. – С.102-108.
12. Fayad Z.A., Fuster V. Clinical Imaging of the High-Risk or Vulnerable Atherosclerotic Plaque // Circulation Research. – 2001. – Vol. 89. – P. 305.

13. Ormrod D.J., Holmes C.C., Miller T.E. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis // *Atherosclerosis*. – 1998. – Vol. 138, N 2. – P. 329-334.

14. Gamzazade A.I., Nasibov S.M., Rogozhin S.V. Study of lipoprotein sorption by some sulfoderivatives of chitosan // *Carbohydrate Polymer*. – 1997. – Vol. 31. – P.1–4.