

УДК 615.035.4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АТЕРОГЕНЕЗ У КРЫС. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ СТЕНКИ МАГИСТРАЛЬНОЙ АРТЕРИИ ПОЛИСАХАРИДНЫМИ БИОПОЛИМЕРАМИ

Большаков И.Н., Шестакова Л.А., Котиков А.Р., Каптюк Г.И.

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России», Красноярск, e-mail: bol.bol@mail.ru

Проведена морфометрическая оценка воздействия полисахаридных биополимеров на стенку артерий при ранних признаках экспериментальной хронической ишемии задних конечностей. Оценивались следующие морфометрические параметры: диаметр артерии; площадь среднего слоя бедренной артерии; толщина среднего слоя; диаметр просвета артерии; отношение толщины средней оболочки бедренной артерии к диаметру просвета; коэффициент гладкомышечных клеток субинтимальной области; число сосудов в околососудистом пространстве; наличие ксантомных клеток. При имплантации 1% сульфатированного водорастворимого хитозана и 1% геля комплекса аскорбата хитозана и альгината натрия в околососудистое пространство животных, находящихся в течении 60-ти дней на холестеринной диете, выявлено, что уменьшается площадь среднего слоя артерии, отношение толщины среднего слоя к диаметру просвета сосуда, происходит уменьшение коэффициента субинтимальных гладкомышечных клеток и наблюдается увеличение количества микрососудов паравазального пространства. Представленные результаты подтверждают, что природные биополимеры влияют на реконструкцию сосудистой стенки и околососудистое пространство, что можно расценивать как антиатерогенный эффект и формирование механизма терапевтического ангиогенеза.

Ключевые слова: экспериментальное атерогенное воспаление, магистральные артерии, крысы, гиперлипидемия, хитозановые биополимеры, терапевтический ангиогенез

EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS IN RATS. MORPHOLOGICAL RECONSTRUCTION OF THE MAIN ARTERY WALL WITH THE POLYSSACHARIDE BIOPOLYMERS

Bolshakov I.N., Shestakova L.A., Kotikov A.R., Kaptyuk G.I.

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, e-mail: bol.bol@mail.ru

The estimation of influence polysaccharide biopolymers on a wall of arteries at early attributes of an experimental chronic ischemia of the hinder legs. Were estimated following morphological parameters: diameter of an artery; the media area a femoral artery; media thickness; diameter of a gleam of an artery; relation of thickness of an average environment of a femoral artery to diameter of a gleam; factor smooth cells of sub-intima areas; number of micro-vessels in para-adventitial space; presence of fat cells. At implantation of 1% sulfate water-soluble chitosan and 1% gel of a complex ascorbate chitosan with alginate sodium in para-vessels space. The animals received a cholesterol diet within 60 days. The researches have shown, that the area of an average of an artery layer, the relation of the thickness of an average layer to diameter of a vessel gleam decreases, the reduction of smooth cells proliferation, the increase of vessels quantity in para-vessels space is observed. Results confirm significant influence of biopolymers on a vascular wall and para-vessels space that it is possible to regard as anti-cholesterol effect and the formation of the therapeutic angiogenesis mechanism.

Keywords: experimental atherosclerotic inflammation, the main artery, rats, hypercholesterolemia, chitosan polymers, therapeutic angiogenesis

Диагностика, лечение и профилактика атеросклероза остаются важнейшей задачей современной медицины, от решения которой во многом зависит успех борьбы с такими заболеваниями, как инфаркт, инсульт, критическая ишемия нижних конечностей [1, 4, 5].

Введение в клиническую практику технологий локальной реконструкции сосудистой стенки, пораженной атеросклерозом [2, 3, 6, 7], несомненно, внесет весомый вклад в борьбу с этим тяжелым недугом. В качестве средств, способных позитивно воздействовать на интиму и подинтимное пространство крупных артерий, предложены различные варианты биополимеров.

Цель исследования – морфометрическая оценка воздействия имплантированных

ных полисахаридных биополимеров на стенку артерий при ранних признаках экспериментальной хронической ишемии нижних конечностей.

Материалы и методы исследования

В исследовании использованы 48 белых беспородных лабораторных крыс мужского пола, массой 250 ± 15 г, животные были разделены на 8 групп: 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – животные, получавшие только холестеринную диету [8, 9, 10] (30% растительного масла, 2,4% холестерина, 0,12% 6-метил-2-тиоурацила, 0,06% холевой кислоты, 200000 ед. витамина Д₃). С третьей по восьмую группы – животным, получавшим холестеринную диету, в околососудистый фасциальный футляр магистральных артерий левой задней конечности с помощью инъекций инфильтровали один из шести

образцов биополимера: 1% гель хитозана хлоргидрата; 1% гель хитозана аскорбата; 1% гель комплекса аскорбата хитозана и альгината натрия; 1% гель $\beta_1,4$ D-глюкопиранозин-N-метил-сульфатил натрия; 1% раствор каррагинана; 1% раствор полиэтиленгликоля.

Подопытные животные были выведены из эксперимента на 60-е сутки. У всех групп был отпрепарирован комплекс мягких тканей бедра и голени обеих конечностей, включающий магистральный сосудисто-нервный пучок, для выполнения гистологических исследований. Морфометрическое исследование полученных срезов сосудов проводилось при помощи программы «Image Tool». Оценивались следующие морфометрические параметры: диаметр артерии – в мм; площадь средней оболочки бедренной артерии (медии) – в мм^2 ; толщина медии и диаметр просвета артерии – в $\mu\text{м}$; отношение толщины средней оболочки бедренной артерии к диаметру просвета; коэффициент гладких миоцитов субинтимальной области (вычислялся как отношение численной плотности субинтимальных миоцитов к площади средней оболочки бедренной артерии); число сосудов в паравазальном пространстве, исключая крупные магистральные сосуды; наличие ксантомных клеток оценивалось в формате дихотомической переменной (да, нет).

Результаты исследования и их обсуждение

Атеросклеротическая диета в течение 60 дней вызывала у крыс гиперлипидемию, о чем свидетельствует увеличение уровня содержания общих липидов в 2,5 раза ($13,15 \pm 0,04$ г/л против $5,13 \pm 0,02$ г/л у интактных животных), триглицеридов в 2 раза ($2,66 \pm 0,01$ ммоль/л против $1,10 \pm 0,01$ ммоль/л у интактных животных) и НЭЖК в 26 раз ($1,75 \pm 0,01$ ммоль/л против $0,06 \pm 0,01$ ммоль/л соответственно). Уровень общих липидов (ОЛ) в стенке бедренной артерии интактных крыс ($2,68 \pm 0,01$ г/л) достоверно меньше ($P < 0,001$), чем у животных, получавших в течение 60 суток холестериную диету ($8,15 \pm 0,06$ г/л). Во всех группах крыс, которым имплантировались биополимеры (с третьей по восьмую), отмечается снижение уровня ОЛ в стенке опытной левой бедренной артерии по сравнению с группой животных, получавших ХД и не подвергнутых имплантации гелевых полимерных конструкций. Существенное падение уровня общих липидов (ОЛ) в тканях стенки бедренной артерии в опытной конечности (биополимерная «рубашка» в околососудистом пространстве) по сравнению с контрольной (биополимер не вводился) наблюдалось при имплантации 1% геля хитозана хлоргидрата, 1% геля хитозана аскорбата и 1% сульфатированного водорастворимого хитозана. Важным результатом имплантации указанных биополимеров следует считать факт достижения уровня ОЛ в тканях стенки бедренной артерии опытных

конечностей до уровня интактных животных (1-я группа). Следовательно, эти полимеры при длительном нахождении в параадвентициальном пространстве левой бедренной артерии создают условия для существенно более низкого уровня фракций липидов в стенке сосуда по сравнению с аналогичным сегментом контрольной конечности. Этот результат указывает на признаки реконструкции сосудистой стенки в месте дислокации имплантата. Анализ показывает, что содержание триглицеридов (ТГ) в тканях стенки бедренной артерии интактных животных достоверно меньше ($P < 0,001$), чем у животных, получавших холестериную диету (ХД). Уровень ТГ в правой бедренной артерии (контрольная конечность) не отличался от показателей 2-й группы (животные, получавшие ХД) и составлял соответственно $2,14 \pm 0,25$ и $2,43 \pm 0,84$ ммоль/л, но существенно был выше ($P < 0,001$) значений у интактных животных – $0,95 \pm 0,03$ ммоль/л. Таким образом, имплантация биополимера в левую заднюю конечность не оказывает влияния на уровень ТГ в противоположной конечности. При имплантации 1% геля хитозана хлоргидрата, 1% геля хитозана аскорбата, 1% сульфатированного водорастворимого хитозана и 1% комплексного геля аскорбата хитозана-альгината натрия в околососудистое пространство левой бедренной артерии отмечалось снижение уровня ТГ в тканях артериальной стенки по сравнению с контрольной конечностью, в среднем, в 2,4 раза. Уровни ОЛ в стенке подвздошной артерии контрольной и опытной конечностей были достоверно неразличимы у животных с 4 по 8 группы ($P > 0,05$). Однако при имплантации 1% геля хитозана хлоргидрата в паравазальное пространство левой бедренной артерии (3-я группа) происходило уменьшение уровня ОЛ в стенке подвздошной артерии (соседний с бедренной артерией сегмент) по сравнению с контрольной конечностью ($P < 0,001$). Эта находка указывает на факт непосредственной близости расположения имплантированного полисахаридного полимера к левому сегменту наружной подвздошной артерии. Однако в целом слабое влияние имплантатов на соседний артериальный сегмент указывает на строго локальный эффект морфологической реконструкции.

Микроскопический анализ артериальной стенки контрольных конечностей крыс, находящихся в течение 60-ти дней на холестериновой диете, указывает на наличие классических липидных фиброзных бляшек, выступающих в просвет сосудов (рис. 1, а). В образцах средних

третей левых и правых бедренных артерий выявляется отек различной степени выраженности (от слабо выраженного до выраженного), который оценивался на основании наличия признаков разобщения волокнистого компонента внутренней эла-

стической мембраны (рис. 1, б). В интиме бедренных артерий (между внутренней эластической мембраной и эндотелиоцитами) выявляются ксантомные клетки-макрофаги с наличием липидов в цитоплазме (рис. 2).

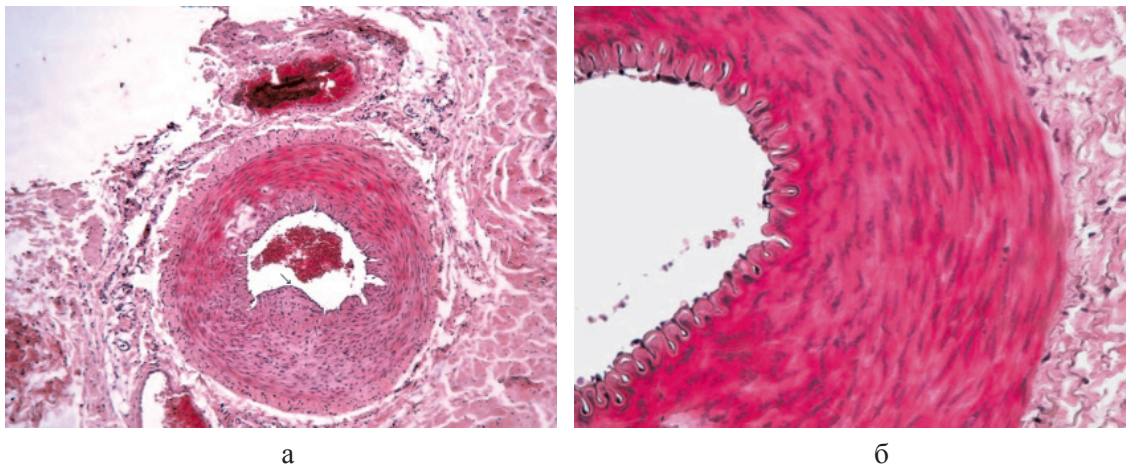


Рис. 1. Гистологический препарат бедренной артерии крысы, содержащейся в течение 60-ти суток на холестериновой диете. Окраска гематоксилином и эозином: а – классическая липидная бляшка в стенке артерии. X 100; б – увеличение численной плотности гладких миоцитов в стенке правой бедренной артерии крысы, получавшей ХД в течение 60-ти суток. X 200

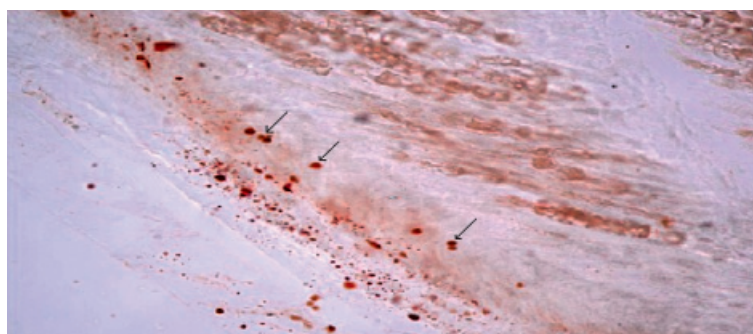


Рис. 2. Наличие ксантомных клеток в субинтимальном слое бедренной артерии крысы, получавшей холестериновую диету в течение 60-ти суток. Окраска судан III. X 400

В препаратах с введением 1% сульфатированного водорастворимого хитозана гистологическая картина в стенке левой бедренной артерии с наличием липидной фиброзной бляшки существенно отличается от таковой в артериях правых конечностей. Параллельно с процессами биологической деградации полимера отмечается резорбция компонентов бляшки под воздействием макрофагов, индуцированных имплантированным полимером (рис. 3, а). Численная плотность гладких миоцитов субинтимально и в медию снижается, липидная фиброзная бляшка уплотняется и уменьшается в размере (рис. 3, б). В паравазальном пространстве отмечается выраженная васкуляризация в средней трети длины левой

бедренной артерии по сравнению с правой (рис. 4).

Результаты морфометрии стенок артерий демонстрируют, что площадь медию средней трети бедренной артерии у интактных животных меньше ($0,16 \pm 0,01 \text{ мм}^2$), чем площадь медию в средней трети длины бедренной артерии (биополимер не вводился) у крыс, получавших холестериновую диету в течение 60 суток ($0,21 \pm 0,02 \text{ мм}^2$, $p < 0,05$), что свидетельствует о прогрессировании атерогенного процесса. При сравнении площади медию в средней трети длины левой бедренной артерии (вокруг которой находился биополимер) и правой (биополимер не вводился) выявлено, что площадь медию уменьшается при введении в паравазальное пространство 1%

сульфатированного водорастворимого хитозана ($0,13 \pm 0,01 \text{ мм}^2$) и при введении 1% геля комплекса аскорбата хитозана и альги-

ната натрия ($0,15 \pm 0,02 \text{ мм}^2$) по сравнению с правой бедренной артерией ($0,21 \pm 0,02 \text{ мм}^2$, $p < 0,05$) (табл. 1).

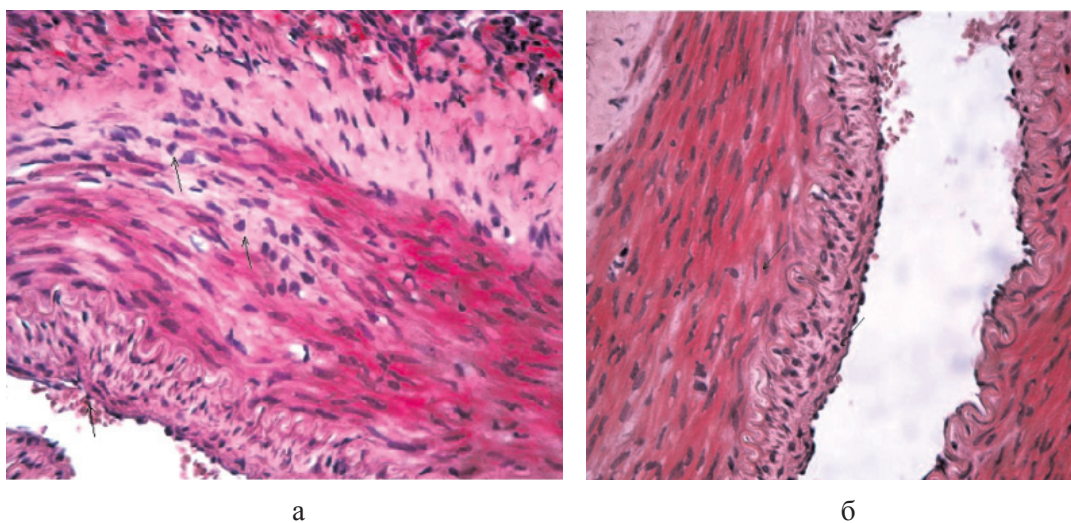


Рис. 3. Гистологический препарат бедренной артерии крысы, содержащейся в течение 60-ти суток на холестериновой диете в условиях имплантации 1% геля сульфатированного водорастворимого хитозана. Окраска гематоксилином и эозином. а – X 300; б – X 200

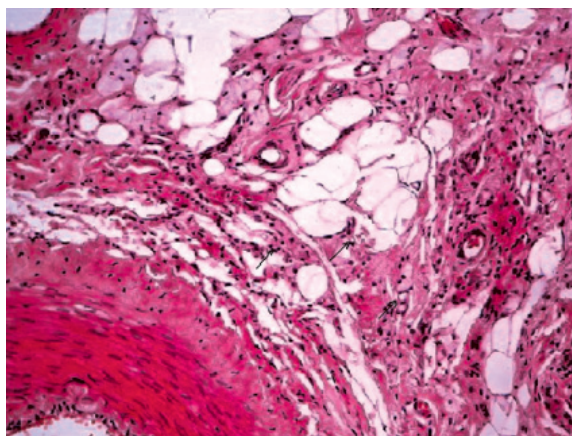
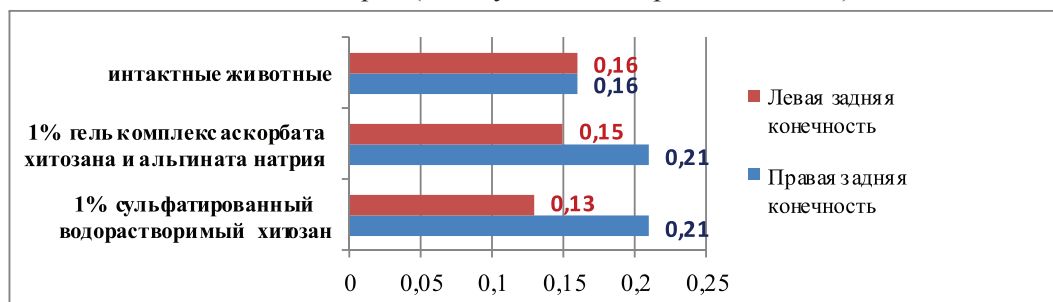


Рис. 4. Выраженная васкуляризация в паравазальном пространстве левой бедренной артерии крыс, получавших ХД в течение 60-ти суток, в условиях имплантации 1% геля сульфатированного водорастворимого хитозана. Окраска гематоксилином и эозином. X 200

Таблица 1

Площадь поперечного сечения меди средней трети бедренной артерии (мм^2) у интактных животных и на 20-е сутки после имплантации различных биополимеров (60-е сутки холестериновой диеты)

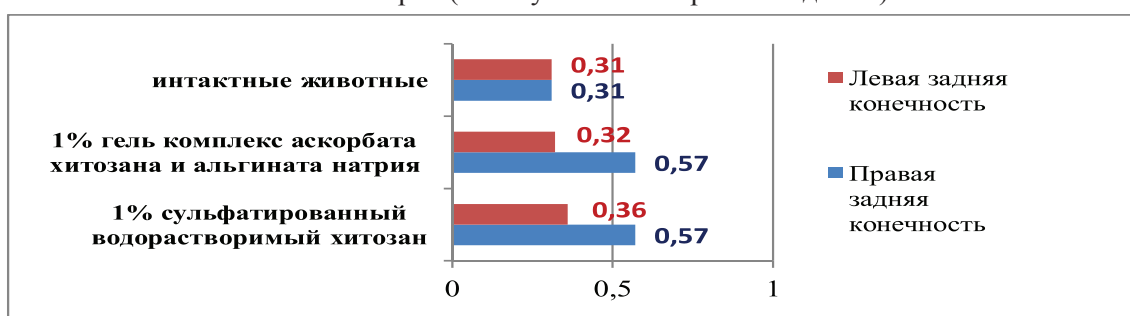


Отношение толщины меди к диаметру просвета сосуда в средней трети длины бедренной артерии интактных животных меньше, чем в средней трети длины правой бедренной артерии и составляет соответственно $0,31 \pm 0,10$ против $0,57 \pm 0,08$ ($p < 0,05$). Таким образом, холестериновая диета в течение 60 суток приводит к увеличению толщины меди и уменьшению диаметра просвета сосуда, общий диаметр сосуда остается неизменным. Следует отметить, что при имплантации 1% сульфатированного водорастворимого хитозана это отношение уменьшается в левой конечности по сравнению с показателями правой бедренной артерии (биополимер не вводился) и составляет соответственно $0,36 \pm 0,06$ против $0,57 \pm 0,08$ ($p < 0,05$). Такое же уменьшение вышеуказанного отношения в левой конечности происходит при имплантации 1% геля комплекса аскорбата хитозана и альгината натрия ($0,32 \pm 0,08$) по сравнению с правой бедренной артерией ($0,57 \pm 0,08$) ($p < 0,05$) (табл. 2).

фатированного водорастворимого хитозана это отношение уменьшается в левой конечности по сравнению с показателями правой бедренной артерии (биополимер не вводился) и составляет соответственно $0,36 \pm 0,06$ против $0,57 \pm 0,08$ ($p < 0,05$). Такое же уменьшение вышеуказанного отношения в левой конечности происходит при имплантации 1% геля комплекса аскорбата хитозана и альгината натрия ($0,32 \pm 0,08$) по сравнению с правой бедренной артерией ($0,57 \pm 0,08$) ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2

Отношение толщины меди к диаметру просвета в средней трети длины бедренной артерии у интактных животных и на 20-е сутки после имплантации различных биополимеров (60-е сутки холестериновой диеты)

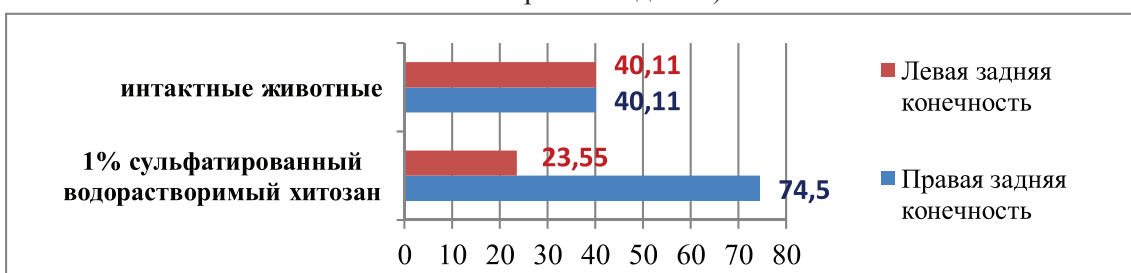


Коэффициент субинтимальных миоцитов верхней трети правой бедренной артерии крыс, получавших в течение 60 суток холестериновую диету, больше, чем у крыс, содержащихся на стандартном рационе вивария и составляет соответственно $74,50 \pm 8,06$ против $40,11 \pm 13,81$, ($p < 0,05$).

Вышеуказанный коэффициент уменьшается у группы животных, которым в области средней трети левой бедренной артерии производилась имплантация 1% сульфатированного водорастворимого хитозана ($23,55 \pm 1,68$) по сравнению с правой конечностью ($74,50 \pm 8,06$), ($p < 0,05$) (табл. 3).

Таблица 3

Коэффициент субинтимальных миоцитов верхней трети бедренной артерии у интактных животных и на 20-е сутки после имплантации различных биополимеров (60-е сутки холестериновой диеты)



На 60-е сутки холестериновой диеты количество сосудов паравазального пространства правой бедренной артерии крыс соответствующих групп и интактных животных статистически не различается и составляет $25,52 \pm 5,67$ против $21,33 \pm 3,42$ соответственно ($p > 0,05$). На 20-е сутки после имплантации 1% геля аскорбата хитозана и 1% сульфатированно-

го водорастворимого хитозана происходит увеличение количества сосудов паравазального пространства ($38 \pm 4,13$ и $37,17 \pm 6,59$) по сравнению с правой бедренной артерией ($25,52 \pm 3,63$) ($p < 0,05$) (табл. 4).

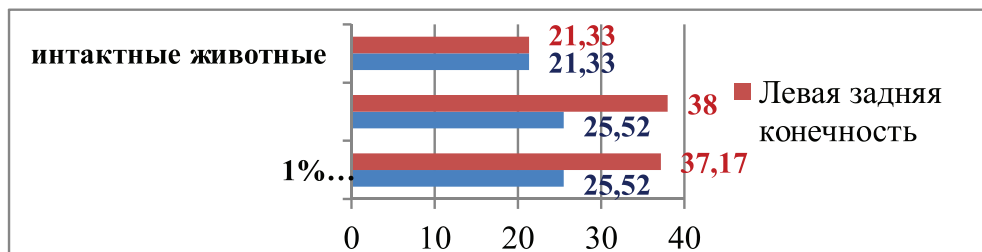
Представленные результаты свидетельствуют о значимом влиянии сульфатированного водорастворимого хитозана на

уменьшение коэффициента субинтимальных миоцитов и увеличение числа сосудов паравазального пространства, что можно

расценивать как антиатерогенный эффект и формирование механизма терапевтического ангиогенеза.

Таблица 4

Сосуды паравазального пространства в средней трети длины бедренной артерии у интактных животных и на 20-е сутки после имплантации различных биополимеров (60-е сутки холестериновой диеты)



Выводы

Хроническая холестериновая диета у экспериментальных крыс является адекватной моделью формирования ранних признаков атерогенного воспаления в стенках магистральных сосудов конечностей. Модельное атерогенное воспаление у экспериментальных животных вызывает выраженный отек интимы в виде разобщения волокнистого компонента внутренней эластической мембраны, появление ксантомных клеток, пролиферацию гладких миоцитов субинтимально и в меди с неравномерным её утолщением и формированием типичной липидной («мягкой») бляшки, покрытой фиброзной оболочкой, приводящие к уменьшению диаметра просвета сосуда. Имплантация ряда гелевых форм биополимеров (хитозан аскорбат, хитозан сульфатированный, хитозан хлоргидрат) со свойствами поликатионных или полианионных полисахаридов способна создавать в ограниченных сегментах стенок артериальных сосудов более низкий (а в ряде случаев, и соответствующий норме) уровень липидных фракций. С позиции ранней профилактики или раннего лечения сосудистых поражений при атеросклерозе у человека эти находки являются весьма важной составляющей, поскольку анализ прицельной перестройки сосудистой стенки при атеросклерозе с использованием известных методов лечения отражен явно недостаточно в научных публикациях. Имплантация в фасциальное ложе магистральных артерий крыс кислых протонированных форм хитозана, а также его сульфатированной формы демонстрирует локальное восстановление толщины среднего слоя на 29–38%, снижая отношение толщины меди к диаметру просвета сосуда на 37–44%. Такой эффект имеет место и в вышележащем

сегменте магистрального сосуда. Дислокация в паравазальном пространстве сульфатированной формы хитозана в течение 20 суток обеспечивает снижение коэффициента субинтимальных миоцитов в среднем сегменте артерии на 27%, усиливая эффект реконструкции в верхнем сегменте сосуда на 68%. Введение в паравазальное пространство магистральной артерии гелевой формы сульфатированного хитозана и кислых протонированных его форм стимулирует новообразование микрососудистого ложа на месте резорбции полимеров, увеличивая число новых сосудов у крыс на 22–49%. Более высокий эффект терапевтического ангиогенеза ясно прослеживается и при имплантации хитозановых конструкций в ткани интактного животного, составляя прирост через 30 дней постимплантационного периода 85%.

Список литературы

1. Андожская Ю.С., Гирина М.Б., Васина Е.Ю. Современные методы оценки микроциркуляции в эфферентной терапии при лечении больных с атеросклерозом // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2002. – № 1. – С. 47–60.
2. Липидный спектр и микроциркуляция при использовании биополимеров в модели атерогенеза / И.Н. Большаков, О.А. Долгих, А.К. Кириченко, А.Р. Котиков, В.О. Горбунова // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 7. – С. 41–42.
3. Реконструкция сосудистой стенки при атерогенезе с помощью хитозановых биополимеров / И.Н. Большаков, О.А. Долгих, А.К. Кириченко, А.Р. Котиков, В.О. Горбунова // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 7. – С. 42–43.
4. Бочаров А.В., Вишнякова Т.Г., Тусуева А.Н. Характеристика ЛПВП-связывающих белков на поверхности гепатоцитов плодов человека // Ангиология и сосудистая хирургия. – 1999. – № 5. – С. 27–39.
5. Голдобина А.В., Колесникова Л.И., Никифоров С.Б. Сравнительная оценка антиоксидантного препарата и комплекса фетальных тканей при лечении больных коронарным атеросклерозом // БЭБМ. – 1998. – № 1. – С. 165.

6. Долгих О.А., Горбунова В.О. Экспериментальное обоснование реконструкции магистральных артерий нижних конечностей при атерогенезе с помощью природных биополимеров // Сибирское медицинское обозрение. – 2009. – № 3. – С. 88–90.

7. Патент РФ № 2006129084/14, 10.08.2006.

8. Bucolo G., David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes // Clin. Chem. – 1973. – № 19. – P. 476–482.

9. Dusting G.J. Nitric oxide in cardiovascular disorders // J. Vasc. Res. – 1995. – № 3. – С. 143–161.

10. Ensign W.Y., McNamara D.J., Fernandez M.L. Exercise improves plasma lipid profiles and modifies lipoprotein composition in guinea pigs // J. Nutr. Biochem. – 2002. – № 12. – С. 747–753.

References

1. Andozhskaya U.S., Girina M.B., Vasina E.U. *Sovremennye metody otsenki mikritsirkulyatsii v efferentnoy terapii pri lechenii nolnykh s aterosklerozom – Regionarnoe krovoobraschenie i mikrotsirkulyatsiya*, 2002, no.1, pp. 47–60.

2. Bolshakov I.N., Dolgikh O.A., Kirichenko A.K., Kotikov A.R., Gorbunova V.O. *Lipidnyy spectr i mikrocyrcelyatsiya pri ispolzovanii biopolimerov v modeli aterogeneza – Fundamentalnye issledovaniya*, 2009, no. 7, pp. 41–42.

3. Bolshakov I.N., Dolgikh O.A., Kirichenko A.K., Kotikov A.R., Gorbunova V.O. *Rekonstruktsiya sosudicstoy stenki pri aterogeneze s pomoschyu khitosanivyykh biopolimerov – Fundamentalnye issledovaniya*, 2009, no.7, pp. 42–43.

4. Bocharov A.V., Vishnyakova T.G., Tusueva A.N. *Kharakteristika LPVP-svyazyvayuschikh belkov na poverkhnosti*

gepatotsitov plodov cheloveka – Angiologiya i sosudistaya khirurgiya, 1999, no. 5, pp. 27–39.

5. Goldobina A.V., Kolesnikova L.I., Nikiforov S.B. *Sravnitel'naya otsenka antioksidantnogo preparata i kompleksa fetalnykh tkaney pri lechenii bolnikh koronarnym aterosklerozom – BEBM*, 1998, no. 1, pp. 165.

6. Dolgikh O.A., Gorbunova V.O. *Ekspериментальное обоснование реконструкции магистральных артерий нижних конечностей при атерогенезе с помощью природных биополимеров – Сибирское медицинское обозрение*, 2009, no. 3, pp. 88–90.

7. Патент РФ № 2006129084/14, 10.08.2006.

8. Bucolo G., David H. *Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes – Clin. Chem.*, 1973, no.19, pp. 476–482.

9. Dusting G.J. *Nitric oxide in cardiovascular disorders – J. Vasc. Res.*, 1995, no.3, pp. 143–161.

10. Ensign W.Y., Mc Namara D.J., Fernandez M.L. *Exercise improves plasma lipid profiles and modifies lipoprotein composition in guinea pigs – J. Nutr. Biochem.*, 2002, no.12, pp. 747–753.

Рецензенты:

Сухоруков А.М., д.м.н., профессор, НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск;

Зыкова Л.Д., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии, ГБОУ ВПО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого», г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 30.05.2013.