

УДК 616.13/14-008-092.4/9

© Р.Е.Калинин, И.А.Сучков, М.В.Мнихович, А.С.Пшенников, А.А.Герасимов.,

Способы моделирования эндотелиальной дисфункции в эксперименте на животных

Р.Е.КАЛИНИН, И.А.СУЧКОВ, М.В.МНИХОВИЧ, А.С.ПШЕННИКОВ, А.А.ГЕРАСИМОВ

Methods for modeling of endothelial dysfunction in experimental animals

R.E.KALININ, I.A.SUCHKOV, M.V.MNIKHOVICH, A.S.PSHENNIKOV, A.A.GERASIMOV

Рязанский государственный медицинский университет
НИИ морфологии человека РАМН, г. Москва

В настоящее время большое внимание уделяется изучению причин неудовлетворительных результатов реконструктивных операций на артериях нижних конечностей у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей [2, 4]. Большинство авторов сходятся во мнении, что гиперплазия интимы – основная причина развития тромбозов в срок 3 до 6 месяцев [3, 9]. По нашим данным, до 64% пациентов с бедренно-подколенными шунтами в срок через 6 месяцев после операции имели гиперплазию интимы зоны анастомоза, у половины из них развился тромбоз шунта, что было подтверждено морфологическими исследованиями [4].

Гиперплазия интимы развивается вследствие эндотелиальной дисфункции. Основным активным метаболитом, определяющим функциональное состояние эндотелия (ФСЭ), большинством авторов признаётся оксид азота (II) (NO), являющийся локальным тканевым гормоном с множественными эффектами – противовоспалительным сосудистым эффектом и стимулирующим ангиогенез [1, 5, 9, 10, 11, 12]. Также в комплексной оценке ФСЭ целесообразно учитывать биохимическую основ: компоненты перекисного окисления липидов пол и антиоксидантной защиты [5, 6].

Актуальным представляется возможность изучения колебаний биохимических показателей, отражающих влияние изменений ФСЭ на артериальную стенку, в которой, по сути, и развиваются основные процессы, и морфологической картины в зоне реконструкции. К сожалению, на клиническом материале выполнить подобное исследование не представляется возможным по объективным причинам, поэтому чрезвычайно важной является возможность экспериментального моделирования и изучения указанных явлений на экспериментальных моделях.

В литературе представлен ряд работ по моделированию эндотелиальной дисфункции на животных, но эксперименты выполнялись лишь на крысах и без реконструктивного вмешательства на магистральных артериях, что не в полной мере соответствовало задачам нашего исследования [3, 7, 8].

Основываясь на литературных данных, нами выбраны и использованы 2 модели эндотелиальной дисфункции: L-NAME-индуцированная эндотелиальная дисфункция и модель гиперхолестеринемии, которые были дополнены выполнением операции – аллопластика брюшного отдела аорты [7, 8].

Цель исследования: разработка и оценка эффективности различных способов моделирования эндотелиальной дисфункции при реконструктивных операциях на магистральных артериях в эксперименте на животных с последующей комплексной биохимической оценкой процесса.

Материалы и методы

2536.2011.7. Исследуемую группу составили 57 экспериментальных животных (беспородные кошки, массой от 3,0 до 4,5 кг). Все животные содержались в условиях вивария: стандартная экспериментальная биологически чистая комната, освещение 12 ч/12 ч светлый/темный цикл, t 22-24°C. Все исследования проводили в одно и то же время суток во второй половине дня с соблюдением принципов, изложенных в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977г.

Животные были разделены на 3 группы

Первой группе животных (n=20) оперативное вмешательство выполнялось без предварительного моделирования эндотелиальной дисфункции. Вторую группу составили животные (n=19), которых оперировали на фоне L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции. Третью группу составили животные (n=18), которым оперативное вмешательство проводилось на фоне гиперхолестеринемии.

Первая группа животных В первый день эксперимента осуществляли забор крови из головной (подкожной) вены правой передней конечности животного в количестве 4-5 мл в стерильные пробирки для определения следующих показателей: малоновый диальдегид (МДА) (19,886±2,775 (ye) на мг Hb), супероксид-

дисмутаза (СОД) (0,152±0,026 (уе) на мг Hb), оксид азота (13,885±5,677 уе).

Через 3 дня от начала эксперимента под наркозом (табл. 1) выполнялась операция – аллопластика брюшного отдела аорты (рис. 1, 2, 3). Во время оперативного вмешательства (при пережатии аорты) животным однократно вводился гепарин в дозе 220 МЕ/кг п/к.

Моделирование L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции осуществляли по следующей методике: после забора крови в первый день эксперимента для определения исходного уровня исследуемых показателей вводили N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) ежедневно один раз в сутки внутривенно в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней. Для подтверждения получения модели повторно проводили забор крови и определения биохимических показателей.

Модель гиперхолестеринемии достигалась путем гиперхолестериновой диеты животных. Диета состояла из 3% холестерина (10 г), 0,12% 6-метилтиоурацила (6-МТУ) (400 мг), 30% прогретой смеси жиров (подсолнечное масло/свиной жир). Через 21 день проводился забор крови по описанной выше методике.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

На 10 день, через 1, 3 и 6 мес. после оперативного вмешательства производился забор крови по описанной выше методике. Были получены следующие результаты:

10 день - МДА (34,505±5,114 (уе) на мг Hb), супероксиддисмутаза (0,226±0,012 (уе) на мг Hb), оксид азота (24,916±9,299 уе).

1 мес. - МДА (21,119±1,501 (уе) на мг Hb), супероксиддисмутаза (0,968±0,017), оксид азота (9,423±4,641).

3 мес. - ПДА (16,325±4,365), сод (1,008±0,036), оксид азота (9,123±3,54).

6 мес. - ПДА (14,849±6,121), сод (1,009±0,039), оксид азота (8,709±6,783).

По истечению 6 месяцев после операции животные выводились из эксперимента передозировкой диэтилового эфира с последующим выполнением макроморфометрии зоны реконструкции брюшного отдела аорты путём стереометрического анализа. Колебание исследуемых показателей в различные сроки после операции в данной группе представлены в табл. 2.

Как видно из таблицы 2, колебания основных биохимических показателей (ФСЭ), которые были определены в исследовании, позволяет с уверенностью говорить, что оперативное вмешательство влияет на ФСЭ, но через месяц после операции значения возвращаются к исходным. И только уровень СОД сохраняется достоверно высоким. СОД является важным компонентом антиоксидантной системы. катализирует реакцию превращения супероксида в H2O2. Оксид азота (II) и СОД конкурируют за супероксид-анион. Высокая концентрация СОД в сыворотки крови животных говорит об активности антиоксидантной системы.

(МДА) является конечным продуктом (ПОЛ). Повышение активности ПОЛ, проявляющееся повышением уровня МДА, является неспецифической ответной реакцией организма на операционное воздействие.

Вторая группа животных с L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункцией: в первый день эксперимента осуществляли забор крови из головной (подкожной) вены правой передней конечности животного в количестве 4-5 мл в стерильные

Таблица 1

Хронология течения общей анестезии

Этапы анестезии	Препараты и дозы
Г этап - подготовительный	
А) премедикация	Р-р атропина 0,1% – 0,05 мг/кг п/к; через 5 мин р-р димедрола 1% – 0,4 мг/кг в/м
	Через 15-20 мин
Б) седация	Р-р ксилазина («Ксило») 1 мг/кг в/м
	Через 5 мин
II этап – введение в анестезию	Золетил 50 - 15 мг/кг в/м
III этап – поддержание анестезии	Повторное введение Золетила 50 в дозе, не превышающей 1/3-1/2 исходной
IV этап – пробуждение и ближайший послеоперационный период	Преднизолон 0,4 мг/кг в/м однократно Сульфокамфокаин 0,1 мл/кг п/к однократно Анальгин 50% – 30 мг/кг 3 р/д в/м в течение 5 дней Папаверин 2% – 1,5 мг/кг 3 р/д в/м 5 дней Амоксициллин 0,2 мл/кг в/м в течение 4 дней Р-р глюкозы 5% – 20 мл/кг в/в однократно Р-р NaCl 0.9% – 20 мл/кг в/в однократно Гепарин 66 МЕ/кг 4 р/д п/к в течение 5 дней Гамавит 0,1 мл/кг в/м 3х-кратно в течение 7 дней

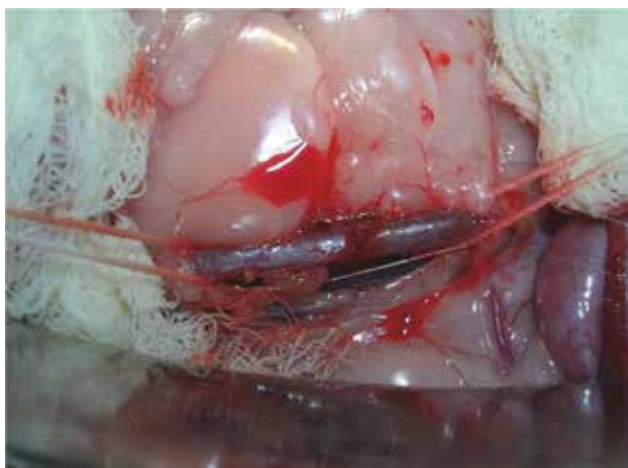


Рис. 1. Выделение брюшной аорты.

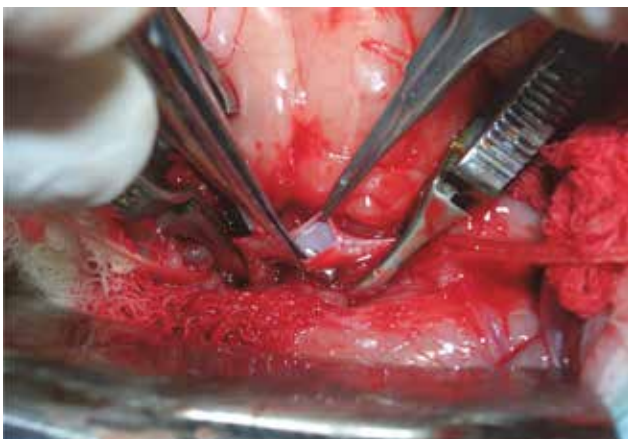


Рис. 2. Этап операции: аортотомия.

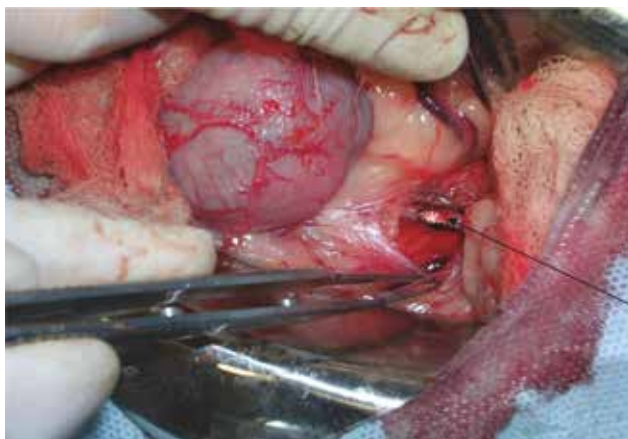


Рис. 3. Этап операции: аллопластика брюшного отдела аорты.

пробирки для определения следующих показателей: (МДА) $(18,142 \pm 2,775)$ (ye) на мг Hb), (СОД) $(0,162 \pm 0,038)$ (ye) на мг Hb), оксид азота $(14,988 \pm 2,46)$ ye).

После получения модели L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункцией проводился забор крови по выше описанной методике. Получены следующие результаты: малоновый диальдегид $(25,677 \pm 4,439)$, супероксиддисмутаза $(0,260 \pm 0,044)$, оксид азота $(6,811 \pm 2,975)$.

На 8 день от начала эксперимента под наркозом (табл. 1) выполнялась операция – аллопластика брюшного отдела аорты (рис. 2-4).

Через 10 дней, 1, 3 и 6 мес. после оперативного вмешательства производился забор крови:

10 день - МДА $(19,065 \pm 2,317)$, сод $(0,829 \pm 0,365)$, оксид азота $(3,71 \pm 2,050)$.

1 мес. - МДА $(16,119 \pm 1,501)$, сод $(0,968 \pm 0,017)$, оксид азота $(9,423 \pm 4,64)$.

3 мес. - МДА $(22,302 \pm 4,774)$, сод $(1,413 \pm 0,255)$, оксид азота $(5,545 \pm 1,584)$.

6 мес. - МДА $(18,990 \pm 2,922)$, супероксиддисмутаза $(1,387 \pm 0,458)$, оксид азота $(8,213 \pm 0,443)$.

По истечению 6 мес. после операции животные выводились из исследования с последующим выполнением морфометрии зоны реконструкции брюшного отдела аорты путём стереометрического анализа.

Колебания исследуемых показателей в различные сроки после операции в данной группе представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, введение L-name ведёт к снижению продукции оксида азота и увеличению уровня СОД и МДА, что является убедительным признаком развития нарушения функционального состояния эндотелия и разработанная модель эндотелиальной дисфункции адекватная. Дальнейшее колебание изучаемых биохимических показателей, отражает тот факт, что на протяжении 6 месяцев секреция оксида азота, как основного маркера эндотелиальной дисфункции остаётся подавленной и интерпретация морфологических изменений позволит изучать процессы, происходящие в зоне сосудистого анастомоза, а полученные результаты, возможно, экстраполировать на человека. Колебания СОД и МДА отражают реакцию организма на операционную травму, как и в первой группе.

Таблица 2

Значение исследуемых показателей в различные сроки после операции в группе 1

	До операции	Через 10 дней	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
МДА (ye) на мг Hb	$19,886 \pm 2,77$	$34,505 \pm 5,114$ *	$21,11 \pm 1,501$ **	$16,325 \pm 4,365$ **	$14,849 \pm 6,121$ **
СОД (ye) на мг Hb	$0,152 \pm 0,026$	$0,208 \pm 0,022$ *	$0,968 \pm 0,017$ *	$1,008 \pm 0,036$ *	$1,009 \pm 0,039$ *
NO (ye)	$13,885 \pm 5,677$	$24,916 \pm 9,299$ *	$9,423 \pm 4,641$ **	$8,709 \pm 6,783$ **	$8,7 \pm 6,783$ **

Примечание: * – значимое отличие от уровня до операции ($p < 0,05$); ** – различия не достоверны в сравнении с уровнем до операции ($p > 0,05$).

Таблица 3

Значение исследуемых показателей в различные сроки после операции в группе 2

	До приёма L-name	После приёма L-name	Через 10 дней после операции	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
МДА (уе) на мг Hb	18,142±2,775	25,677±4,439 *	19,065±2,317**	16,119±1,501**	22,302±4,774**	18,990±2,922
СОД (уе) на мг Hb	0,162±0,038	0,260±0,0442 *	0,829±0,365	0,968±0,017**	1,4136±0,255**	1,387±0,458**
NO (уе)	14,988±2,46	6,811±2,975 *	3,71±2,051*	9,423±4,641*	5,545±1,584*	8,2136±0,443*

Примечание: * – значимое отличие от уровня до операции (p < 0,05); ** – различия не достоверны в сравнении с уровнем до операции (p > 0,05).

Таблица 4

Значение исследуемых показателей в различные сроки после операции в группе 3

	До гиперхолестериновой диеты	После гиперхолестериновой диеты	Через 10 дней после операции	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
МДА (уе) на мг Hb	16,432±1,973	25,274±2,767*	32,015±5,264*	44,990±3,353*	24,871±3,468*	40,227±5,291*
СОД (уе) на мг Hb	0,172±0,052	1,335±0,499*	2,493±0,829*	7,655±0,504*	7,795±1,152*	3,822±0,261*
NO (уе)	13,398±4,680	1,640±0,735*	8,637±3,940*	6,448±5,950*	12,21±5,597**	8,688±0,858
Холестерин (мг/дл)	74,135±6,459	98,321±6,838*	90,428±7,348*	84,161±8,151*	90,532±8,966*	99,408±4,927*

Третья группа животных с моделью гиперхолестеринемии

В первый день эксперимента осуществляли забор по стандартной методике. В результате исследований получены следующие данные: МДА (16,432±1,973 (уе) на мг Hb), сод (0,172±0,052 (уе) на мг Hb), оксид азота (13,398±4,680 (уе), (74,135±6,459 мг/дл).

В течение 21 дня животные находились на гиперхолестериновой диете, состав которой указан выше, с последующим забором крови. Получены следующие результаты: малоновый диальдегид (25,274±2,767 (уе) на мг Hb), супероксиддисмутаза (1,335±0,499 (уе) на мг Hb), оксид азота (1,640±0,735 (уе)), холестерин (98,321±6,838 мг/дл).

На 24 дней от начала эксперимента под наркозом (табл. 1) выполнялась операция – аллопластика брюшного отдела аорты.

Через 10 дней, 1, 3 и 6 мес. после оперативного вмешательства производился забор крови:

10 день - МДА (32,015±5,264 (уе) на мг Hb), сод (2,493±0,829 (уе) на мг Hb), оксид азота (8,637±3,940 (уе)), холестерин (90,428±7,348 мг/дл).

1 мес. - МДА (44,990±3,353(уе) на мг Hb), супероксиддисмутаза (7,655±0,504 (уе) на мг Hb), оксид азота (6,448±5,950 (уе)), холестерин (84,161±8,151 мг/дл).

3 мес. - сод (24,871±3,468 (уе) на мг Hb), супероксиддисмутаза (7,795±1,152 (уе) на мг Hb), оксид азота (12,212±5,597 (уе)), холестерин (90,532±8,966 мг/дл).

6 мес. - МДА (40,227±5,291 (уе) на мг Hb), сод (3,822±0,261 (уе) на мг Hb), оксид азота (8,688±0,858 (уе)), холестерин (99,408±4,927мг/дл).

По истечению 6 мес. после операции все животные также как и в других группах выводились из исследования с последующим выполнением макроморфометрии зоны реконструкции брюшного отдела аорты с применением стереометрического анализа.

Колебание исследуемых показателей в различные сроки после операции в данной группе представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы 4, через 21 день гиперхолестериновой диеты уровень холестерина достоверно повышается, а секреция NO резко падает. Колебание МДА и СОД более выраженное, чем в первой группе. Вышеописанная тенденция характерна для эндотелиальной дисфункции. В дальнейшем уровень холестерина в сыворотке крови остается высоким, а колебания маркеров ФЭС отражает различную выраженность эндотелиальной дисфункции.

Таким образом, предложенные в исследовании способы моделирования эндотелиальной дисфункции при реконструктивных операциях на магистральных

артериях в эксперименте на животных, показали свою состоятельность.

Дальнейшее исследование морфологической картины в зоне сосудистых анастомозов с позиции клеточно-стромальных взаимодействий, позволит изучить проблему рестеноза более подробно, выявить особенности патогенеза и морфогенеза и найти пути её решения.

Список литературы

1. Калинин Р.Е. Комплексная оценка функционального состояния эндотелия у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей при различных методах оперативного лечения: дис... д-ра мед. наук Рязань, 2008; 250.
2. Калинин Р.Е., Сучков И.А. Причины неудовлетворительных результатов реконструктивных операций при облитерирующем атеросклерозе артерий нижних конечностей. Образование. Наука. Научные кадры. 2011; 4: 323-327.
3. Киричук В.Ф., Глыбочко П.В., Пономарева А.И. Дисфункция эндотелия.- Саратов: Изд-во Саратовского мед.ун-та, 2008; 129.
4. Покровский А.В. Клиническая ангиология: Руководство в двух томах. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2004; 1400.
5. Коробойникова Э.Н. Модификация определения продуктов ПОЛ в реакции с тиобарбитуровой кислотой. Лаб. дело – 1989; 7: 8-9.
6. Ланкин В.З. Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболевании сердечно-сосудистой системы. Кардиология.- 2000; 7: 48-61.
7. Окуневич И.В. Сапронов Н.С., Инденбом М.Л., Кузнецов А.С., Рыженков В.Е. Гиполипидемическая и антиоксидантная активность бисанионов, содержащих серу. Хим.- фарм. ж., 1999; 11: 14-16.
8. Покровский М.В., Кочкаров В.И., Покровская Т.Г. и др. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте. Кубанский научно-медицинский вестник. 2006; 10: 72–77.
9. N. West et al. Enhanced superoxide production in experimental venous bypass graft intimal hyperplasia: role of NAD (P) H oxidase. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2001; 21: 2: 189-194.
10. Kalinin R.E., Suchkov I.A. Complex analysis of functional state of endothelium in patients with lower extremity atherosclerosis. International Angiology. The Journal of Vascular Biology, Medicine, Surgery and Phlebology. 31: Suppl. 1: 3: 170.
11. Napoli C, Ignarro L.J. Nitric oxide and atherosclerosis. Nitric Oxide-2001; 5: 88-97.
12. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987; 327: 534-536.

Поступила 27.06.2012 г.

Информация об авторах

1. Калинин Роман Евгеньевич – д.м.н., доцент, проф. кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии Рязанского государственного медицинского университета
2. Сучков Игорь Александрович – к.м.н., асс. кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии Рязанского государственного медицинского университета
3. Мнихович Максим Валерьевич – к.м.н., ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека РАМН, г. Москва
4. Пшенин Александр Сергеевич - к.м.н., асс. кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии Рязанского государственного медицинского университета
5. Герасимов Александр Андреевич – клинический ординатор кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии Рязанского государственного медицинского университета