

На правах рукописи

ГЕРАСИМОВ АЛЕКСАНДР АНДРЕЕВИЧ

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И КОРРЕКЦИЯ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ АРТЕРИАЛЬНЫХ
РЕКОНСТРУКЦИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ЗАПЛАТ**

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Рязань - 2016

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Калинин Роман Евгеньевич**

Официальные оппоненты:

Казаков Юрий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия» Минздрава России, заведующий кафедрой сердечно-сосудистой хирургии;

Староверов Илья Николаевич, доктор медицинских наук, доцент, ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава России, заведующий кафедрой хирургии ИПДО.

Ведущая организация:

ФГБУ «Институт хирургии имени А.В. Вишневского» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «30» марта 2016 года в «14.00» часов на заседании диссертационного совета Д 999.052.02 при ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (по адресу: 105203, Москва, Нижняя Первомайская, 70).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института усовершенствования врачей ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (по адресу: 105203, Москва, Нижняя Первомайская, 70) и на сайте www.pirogov-center.ru.

Автореферат разослан _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Матвеев С.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В общей структуре сердечно-сосудистых заболеваний окклюзионно-стенотические поражения артериального русла нижних конечностей занимают одно из ведущих мест [М.Р. Кузнецов, 2009]. По данным А.В. Покровского, за 2014 год число артериальных реконструкций в РФ составило 119119 операций. Данное количество реконструктивно-восстановительных операций на магистральных артериях лишь частично удовлетворяет потребности населения в оказании специализированной медицинской помощи. В РФ в 2013 году на 100 тыс. населения выполнено только около 40 артериальных реконструкций (всех видов артериальных реконструкций, включая эндоваскулярные) [А.В. Покровский, 2013].

Наиболее действенным методом помощи больным с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей является оперативное вмешательство, которое, не устраняя развитие облитерирующего заболевания, в большинстве случаев все же позволяет добиться реваскуляризирующего эффекта [Д.Д. Арзамасцев, 2012; В.Г. Самодай, 2009].

Непосредственный успех хирургического лечения с купированием симптомов ишемии конечностей возвращает к трудоспособности значительную часть больных в ближайшие сроки после реконструктивных операций [А.С. Табардин, 2011; А.Р. Шагинян, 2007].

В то же время, возникновение поздних осложнений в отдаленные сроки сводит на нет успех реконструктивной операции, обуславливает инвалидизацию успешно прооперированных больных или требует выполнения у них повторных оперативных вмешательств [Ю.В. Белов, 2009; Р.Е. Калинин, 2012].

Одним из наиболее распространенных послеоперационных осложнений является появление стеноза реконструированных артерий, развивающееся приблизительно у 50% оперированных больных [А.Н. Вачёв, 2005; Т. Зублевич и др., 1999].

Как известно, основной причиной развития стеноза сосудистых анастомозов в послеоперационном периоде является гиперплазия интимы (ГИ) и субинтимальных компонентов артериальной стенки в зоне сосудистого имплантата [П.С. Курьянов, 2008].

Исследования, посвящённые оценке ГИ в зоне реконструкции, позволяют понять основные закономерности этого процесса, однако остаётся немало вопросов. Выполнение реконструктивно-восстановительных операций на магистральных артериях подразумевает под собой использование в качестве пластического материала аутовены или различного рода синтетических материалов [А.М. Imparato, 1972; R.S. Keynton et al., 2001]. Часто приходится констатировать факт, что использовать аутовену не представляется возможным по тем или иным причинам (рассыпной тип строения большой подкожной вены, использование ранее V.S.M. для АКШ и т.д.). Материалом выбора становятся синтетические волокна (политетрафторэтилен, дакрон и др.), проблема выбора которых достаточно актуальна. То немногочисленное число работ, посвященное синтетическим материалам и их влиянию на сосудистую стенку, не может в достаточно полном объеме отразить те морфологические изменения, которые происходят в зоне контакта синтетической заплаты с артериальной стенкой [Ю.В. Александров и др., 2003]. На сегодняшний день остается открытым вопрос о влиянии вида синтетического волокна на развитие гиперплазии интимы после реконструктивно-восстановительных операций на сосудах.

В настоящее время не вызывает сомнений роль эндотелиальной дисфункции (ЭД) в качестве основной причины развития гиперплазии интимы [И.Н. Староверов и др., 2014; И.А. Сучков, 2013]. Эндотелиальная дисфункция – это сложный многогранный процесс, основным проявлением которого являются: нарушение биодоступности NO (II), подавление эндотелиальной NO-синтазы (NOS) и снижение синтеза NO [Е.Н. Воробьева и др., 2010; С.Н. Иванов и др., 2007; G. Brevetti, 2008].

В последние годы доказана значительная роль воспалительного процесса в формировании ЭД [Т.В. Замечник, 2012; H.D. Endermann, 2004]. Повреждения

эндотелия под действием механических и гуморальных факторов инициируют активацию клеточного звена иммунитета, калликреин-кининовой системы и комплемента, с последующим увеличением продукции воспалительных медиаторов, свободных радикалов и белков острой фазы. Образующиеся субстанции вновь оказывают повреждающее воздействие на эндотелий и усугубляют проявления его дисфункции [R. Ross, 1999]. С учетом наличия у пациентов после реконструктивно-восстановительных операций на магистральных артериях нижних конечностей как локального воспалительного процесса в зоне повреждения артериальной стенки, так и системного воспалительного ответа, перспективным является изучение роли нестероидных противовоспалительных препаратов, в том числе селективных, с позиции коррекции нарушенного функционального состояния эндотелия и как следствия уменьшения толщины гиперплазированной интимы.

Во многих исследованиях была показана обратимость эндотелиальной дисфункции за счёт снижения действия факторов риска атеросклероза или за счёт медикаментозной терапии. Точками приложения препаратов, корригирующих функциональное состояние эндотелия, являются механизмы, поддерживающие баланс противоположно действующих начал – релаксирующих и констрикторных факторов, антикоагулянтных и прокоагулянтных факторов, факторов роста и их ингибиторов [И.А. Сучков, 2012; J.-V. Momboli, 1999].

Несмотря на огромное количество лекарственных препаратов, используемых для коррекции функционального состояния эндотелия «золотой стандарт» так и не найден. В большинстве работ, посвященных коррекции ЭД, приходится сталкиваться с использованием препаратов различных фармакологических групп в качестве монотерапии патологического состояния. В отечественной и зарубежной литературе встречаются единичные работы по оценке эффективности использования комбинации фармакологических препаратов в коррекции эндотелиальной дисфункции [Y.P. Yang et al., 2011; I. Yi et al., 2010].

На сегодняшний момент приоритетным направлением остается вопрос выбора оптимального пластического материала в сосудистой хирургии и комбинированное использование препаратов различных фармакологических групп, обладающих эндотелиотропными эффектами. Коррекция эндотелиальной дисфункции путём нормализации различных звеньев её этиопатогенеза является перспективным моментом с точки зрения профилактики прогрессирования атеросклероза, развития осложнений, улучшения результатов реконструктивных операций на магистральных артериях.

Цель исследования

Оценка эндотелиотропного эффекта препаратов различных фармакологических групп и их влияние на морфологические изменения в зоне артериальной реконструкции при использовании различных видов синтетических заплат.

Задачи исследования

1. Провести оценку эффективности коррекции эндотелиальной дисфункции комбинацией препаратов с плеiotропным эндотелиопротективным эффектом (розувастатин + L-аргинин) и монотерапии розувастатином, с позиции профилактики рестеноза после реконструктивной операции на магистральных артериях.

2. Анализ эффективности коррекции эндотелиальной дисфункции селективным нестероидным противовоспалительным препаратом мелоксикам и его влияние на морфологические изменения в зоне артериальной реконструкции.

3. Оценить особенности морфологических изменений в зоне артериальной реконструкции при использовании в качестве аллопротеза различных синтетических материалов.

4. Соотнести уровень биохимических маркеров, характеризующих функциональное состояние эндотелия, с изменениями морфологической картины в зоне реконструктивной операции.

Научная новизна

На экспериментальной модели эндотелиальной дисфункции впервые проведена оценка морфологических изменений в зоне артериальной реконструкции при использовании различных типов синтетических материалов. Проведен анализ эффективности использования комбинации препаратов с эндотелиотропным эффектом (розувастатин + L-аргинин), селективного НПВС (мелоксикам) в терапии эндотелиальной дисфункции, с целью профилактики рестеноза при реконструктивно-восстановительных операциях на магистральных артериях.

Теоретическая значимость

1. Использование ряда биохимических маркеров позволяет на ранних этапах диагностировать и своевременно корректировать нарушенное функциональное состояние эндотелия.
2. Показано преимущество использования комбинированной терапии эндотелиальной дисфункции розувастатином с L-аргином, перед монотерапией розувастатином.
3. На гистологическом материале проведен анализ морфологических изменений зоны артериальной реконструкции при использовании в качестве аллопластики различных синтетических материалов.

Практическая значимость работы

1. Экспериментальное моделирование эндотелиальной дисфункции на основании биохимических и морфологических маркеров позволит усовершенствовать имеющиеся и разработать новые методы диагностики и терапии заболевания сердечно-сосудистого профиля, ключевую роль в которых играет дисфункция эндотелия.
2. Улучшение результатов оперативного лечения пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей.
3. Данные морфологической картины позволят одинаково эффективно использовать любой синтетический материал (дакрон или PTFE) для

проведения реконструктивно-восстановительной операции на магистральных артериях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Эффективность применения комбинации эндотелиотропных препаратов розувастатин + L-аргинин выше, чем использование монотерапии ЭД розувастатином.
2. Характер морфологических изменений артериальной стенки не зависит от вида использованного синтетического материала (дакрон или политетрафторэтилен).
3. Селективное НПВС мелоксикам обладает низким эндотелиотропным эффектом, при этом для морфологической картины зоны реконструкции характерно развитие эффекта «папилломатоза интимы».

Внедрение результатов в практику и учебный процесс

Результаты исследования внедрены в лечебную работу отделения сосудистой хирургии ГБУ РО «Областной клинический кардиологический диспансер» и отделения сосудистой хирургии МУЗ «Коломенская ЦРБ», в учебную работу кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены и обсуждены на Всероссийской научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина (Рязань, 2013), Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования», посвященной памяти профессора А.А. Солодкова (Витебск, 2014), IX Научно-практической конференции ЦФО «Проблемы и перспективы лечения мультифокального атеросклероза» (Тверь, 2014), XXIX и XXX Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов «Новые направления и отдалённые результаты открытых и эндоваскулярных вмешательств в лечении сосудистых больных» (Сочи, 2015), XXI Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2015), XII

Съезде хирургов России «Актуальные вопросы хирургии» (Ростов-на-Дону, 2015), Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2015).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 4 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 194 страницах печатного текста и состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 43 рисунками и диаграммами, 5 таблицами. Список литературы содержит 132 отечественных и 113 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационная работа выполнена в рамках научного плана ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. По дизайну исследование организовано как открытое, в параллельных группах лабораторных животных.

Исследование проведено на 72 беспородных котах массой 3-4 кг. Животные содержались в условиях вивария ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. Все исследования проводились с соблюдением принципов, изложенных в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и приказе министерства высшего и среднего специального образования СССР №742 от 13 ноября 1984 г.

Животные были разделены на 4 группы: 1 контрольная и 3 опытных. В первый день исследования проводили забор крови из подкожных вен передней конечности животного в количестве 5 мл в стерильные пробирки для

определения ряда биохимических показателей, характеризующих функциональное состояние эндотелия: уровень стабильных метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов), индуцибельной NO-синтазы (iNOS), супероксиддисмутазы (СОД), малонового диальдегида (МДА), С-реактивного белка (СРБ).

Для моделирования ЭД у всех животных использовали N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME), который вводили ежедневно один раз в сутки внутривентриально в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней. На 10 день от начала эксперимента под наркозом выполнялось оперативное вмешательство – аллопластика брюшного отдела аорты. В пределах группы (n=16) животным в качестве материала для аллопластики использовались заплатки из дакрона (n=8) и политетрафторэтилена (ПТФЭ) (n=8). Животным контрольной группы эндотелиотропная терапия не проводилась. В первой опытной группе в качестве эндотелиотропной терапии применялся розувастатин (крестор, «Astra Zeneca», Великобритания) в дозе 0,4 мг/кг 1 р/д энтерально начиная с 1 суток послеоперационного периода. Во второй опытной группе применялась комбинация L-аргинина (вазотон, «Алтайвитамины», Россия) в дозе 25 мг/кг с розувастатином (крестор, «Astra Zeneca», Великобритания) в дозе 0,4 1 р/д энтерально начиная с 1 суток послеоперационного периода. В качестве эндотелиотропной терапии в третьей опытной группе применялся мелоксикам (мовалис, «Boehringer Ingelheim», Германия) в дозе 0,125 мг/кг 1 р/д энтерально в течение первых 10 дней послеоперационного периода. В работе использовались минимальные из терапевтических доз основных препаратов, пересчитанные с учётом соотношения поверхности тела биологического объекта к его массе по общепринятой формуле межвидового переноса доз с использованием коэффициентов пересчёта в зависимости от массы тела по Freireich et al. и Улановой И. П. [Р.У. Хабриева, 2005]. Для определения биохимических показателей, забор крови по описанной выше методике проводили через 10 дней, 1, 3, 6 месяцев после выполнения оперативного вмешательства.

Через 6 месяцев проводилась эвтаназия животного (под наркозом внутривенно вводился 20% раствор магния сульфата в объеме 5 мл), с последующим забором участка аорты в зоне оперативного вмешательства.

Для проведения гистологического исследования, выделенный участок сосуда фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (фосфатный буфер, pH=7,2–7,4) на протяжении 24 часов, обезвоживали в серии этанолов возрастающей концентрации, с применением изопропанола, заливали в гомогенизированный парафин (Histomix, BioVitrum, Россия; Paraplast X-tra, McCormick Sci, Netherland). Изготавливали серийные срезы толщиной 5–7 мкм с дальнейшим монтированием на обезжиренные и поли-L-лизиновые стекла. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (“Biovitrum”, Россия). Гистологические срезы также окрашивали пикрофуксином по ван Гизону и по методу Маллори по общепринятой методике. Морфологическое исследование проводили с помощью микроскопа Leica DMI 4000B с видеозахватом камерой Leica.

Определение метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови осуществлялось по оригинальной методике фотокolorиметрическим методом, предложенной сотрудниками ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России (рационализаторское предложение (удостоверение № 1317)) [Р.Е. Калинин, 2010].

Содержание индуцибельной синтазы оксида азота (II) (iNOS) в плазме крови производили методом иммуноферментного анализа на ИФА-анализаторе Stat Fax 3200 («Awareness Technology, Inc.») с использованием иммуноферментного набора для количественного *in vitro* определения синтазы оксида азота 2 (NOS2) в образцах сыворотки, плазмы крови и других биологических жидкостях (ELISA Kit for Nitric Oxide Synthase 2, Inducible (NOS2), «Cloud-Clone Corp.»).

Определение активности СОД выполнялось спектрофотометрическим (кверцетиновым) методом, на основании методики, описанной В.А. Костюк и др. (1990).

Определение МДА в сыворотке крови выполнялось по методике, описанной Коробейниковой Э.Н. в 1989 г., которая основана на реакции малонового

дальдегида с тиобарбитуровой кислотой с образованием триметилового комплекса, имеющего максимум поглощения при $\lambda=532-535$ нм.

Определение С-реактивного белка в плазме крови проводили методом иммуноферментным анализа. В методе используются уникальные моноклональные антитела к определенной антигенной детерминанте молекулы С-реактивного белка.

Обработка и хранение материалов диссертации проводились на персональном компьютере Intel Atominside, использован текстовый редактор Microsoft Word из пакета офисных программ Microsoft Office 2007, для статистической обработки использован пакет офисных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2007.

Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей (если сравнивали более чем 2 группы), имеющих нормальное распределение, использовали тест ANOVA, критерий Ньюмена-Кейсла. Для оценки статистической значимости различий при распределении данных, которое отличается от нормального, использовали тест Крускала-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейсла. Для исследования статистической значимости различий показателей между двумя группами, имеющими нормальное распределение, использовали критерий Стьюдента. За уровень достоверности была принята вероятность различия 95% ($p<0,05$) [С. Гланц, 1999].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка биохимических маркеров функционального состояния эндотелия в исследуемых группах в различные сроки исследования.

На фоне введения препарата L-NAME (неселективного ингибитора NO-синтаз) во всех группах (контрольной и экспериментальной) отмечается достоверное снижение уровня стабильных метаболитов оксида азота (II), iNOS, при этом имеет место рост уровня МДА, СОД, СРБ. Выше представленные данные доказывают нарушение функционального состояния эндотелия, и как следствие, достоверно свидетельствуют о постановке модели.

В послеоперационном периоде следует отметить стойкое снижение уровня оксида (II) в течение всего периода наблюдения, что говорит о выраженном угнетении функционального состояния эндотелия. Отмечается рост концентрации МДА, как одного из маркеров активности системы перекисного окисления липидов, в ответ на операционную травму и снижение концентрации NO. Уровень СОД, являющийся показателем активности антиоксидантной системы организма, по-видимому, компенсаторно повышается, в ответ на активацию системы ПОЛ. Имеет место повышение концентрации СРБ, в ответ на операционную травму, значение которого превышает дооперационный уровень в 2 раза. Кроме этого стоит отметить возрастание активности iNOS, с максимумом к 1 мес. На фоне роста содержания iNOS – наиболее активного представителя NO-синтаз, отмечено стойкое снижение уровня оксида азота (II). Данное явление можно объяснить тем, что на фоне оксидативного стресса наиболее выражено протекает реакция между NO и активными формами кислородных радикалов с образованием пероксинитрита (ONOO^-). Значение маркеров ЭД позволяет сделать вывод о том, что их уровень достоверно не отличается в группах животных, которым выполнена аллопластика брюшного отдела аорты различными синтетическими заплатами.

В первой опытной группе, где в качестве эндотелиопротектора использовался розувастатин, в послеоперационном периоде отмечается тенденция к росту уровня NO, значение которого максимально через 6 мес. относительно постановки модели, при этом значение NO выше в группе, где материалом пластики был дакрон ($16,71 \pm 3,24$ мкмоль/мл и $13,69 \pm 1,08$ мкмоль/мл соответственно), однако значения показателя недостоверны. На фоне приема препарата отмечается прогрессирующий достоверный рост уровня СОД, который достигает максимального уровня к 3 месяцу (дакрон – $0,84 \pm 0,02$ у.е. мг Нб; PTFE – $0,87 \pm 0,03$ у.е. мг Нб) и лишь незначительно снижается к 6 месяцам (рис. 14).

Концентрация МДА в раннем послеоперационном периоде (8-10 сутки) повышается до $26,35 \pm 0,54$ нмоль/г Нб, однако уже к первому месяцу отмечено

падение концентрации МДА, что свидетельствует о снижении активности перекисного окисления липидов. В сроки до 6 месяцев уровень показателя достигает значения на момент постановки модели. Уровень iNOS после постановки модели резко возрастает к 8-10 суткам наблюдения (дакрон – $24,56 \pm 1,19$ пг/мл и PTFE – $25,14$ пг/мл), при этом за весь период наблюдения отсутствует достоверное снижение данного маркера ЭД относительно значения на момент постановки модели. СРБ резко возрастает в ответ на введение L-NAME и операционную травму и сохраняет стабильно высокое значение на протяжении всего периода наблюдения, что говорит об отсутствии противовоспалительного эффекта со стороны розувастатина. Во второй опытной группе, коррекция эндотелиальной дисфункции проводилась комбинацией розувастатина с L-аргинином (экзогенным субстратом NO-синтазы в синтезе оксида азота (II)). Общие тенденции изменения биохимических показателей сходны с предыдущей опытной группой, однако следует отметить некоторые особенности. Стоит отметить что уже к 1 месяцу уровень NO превышает значение показателя у интактных животных ($17,01 \pm 2,48$ мкмоль/мл и $15,96 \pm 2,11$ мкмоль/мл). Значение NO в послеоперационном периоде увеличивается в течение всего периода наблюдения и достигает максимума к 6 месяцам ($19,26 \pm 2,37$ мкмоль/мл), что превышает аналогично значение в группе, где проводилась монотерапия ЭД розувастатином, однако отличие показателей недостоверно. По-видимому, данное явление связано с комбинированным эндотелиопротективным действием комбинации препаратов, выражающееся в стимуляции выработки NO. Отмечен достоверный рост уровня СОД уже к 8-10 суткам ($0,54 \pm 0,01$ у.е. мг Нб), максимальное значение показатель достигает к третьему месяцу наблюдения, сохраняя свое значение до окончания эксперимента. Вышеизложенное говорит о стимуляции антиоксидантной системы организма на фоне комбинированной терапии. Одновременно с ростом СОД снижается уровень МДА в течение всего периода наблюдения, свидетельствующий об ингибировании системы ПОЛ. Значение iNOS в раннем послеоперационном увеличивается, достигая к 1 мес. - $28,7 \pm 0,98$ пг/мл, в

дальнейшем уровень маркера постепенно достоверно снижается к 6 мес. – $23,74 \pm 0,63$ пг/мл. На фоне снижения уровня iNOS после 1 мес. параллельно происходит рост метаболитов оксида азота (II), что свидетельствует о превалировании синтеза NO за счет eNOS. Значение СРБ увеличивается в послеоперационном периоде и сохраняет свое значение на протяжении всего эксперимента. Достоверных различий между биохимическими показателями у животных с различным материалом пластики не выявлено.

В третьей опытной группе, для коррекции нарушенного функционального состояния эндотелия использовался селективный НПВС – мелоксикам. Стоит отметить, что после постановки модели уровень NO остается стабильно низким и не достигает уровня значений интактного животного. Значения NO на различных сроках наблюдения сопоставимы с уровнем NO контрольной группы и достоверно не отличаются, что свидетельствует об отсутствии эндотелиопротективного эффекта со стороны мелоксикама. Увеличение СОД в после постановки модели (8-10 дней – $0,46 \pm 0,01$ у.е. / мг Hb; 3 мес. – $0,76 \pm 0,02$ у.е. / мг Hb), по-видимому, связано с компенсаторной реакцией на действие L-NAME и операционную травму. Значение МДА возрастает в раннем послеоперационном периоде, имея максимум к 1 мес. – $27,38 \pm 0,38$ нмоль/г Hb, в дальнейшем уровень его снижается, однако уровня постановки модели не достигает (6 мес. – $24,09 \pm 0,62$ нмоль/г Hb). iNOS резко возрастает уже к 8-10 суткам ($30,81 \pm 0,97$ пг/мл) и сохраняет свое значение в течение всего эксперимента. По-видимому, тот незначительный рост NO в данной группе можно связать именно с активацией iNOS. Уровень СРБ, как интегральный индикатор воспаления, незначительно возрастает относительно постановки модели ($30,55 \pm 2,88$ мг/л и $28,67 \pm 3,48$ мг/л) и сохраняет относительно низкое значение на протяжении всего эксперимента (1 мес. – $32,63 \pm 3,11$ мг/л; 6 мес. – $33,06 \pm 3,61$ мг/л). При этом уровень СРБ достоверно отличается от аналогичных значений в контрольной и опытных группах, что свидетельствует о выраженном противовоспалительном действии мелоксикама. Динамика биохимических маркеров ЭД в процессе исследования отражена в таблице 1.

Таблица 1.

Маркеры ЭД в процессе эксперимента в группах лабораторных животных

Биомаркер	Период наблюдения	Группа лабораторных животных			
		Контроль	Розувастатин	Розувастатин+ L-аргинин	Мелоксикам
NO, мкмоль/л	постановка модели	10,91±2,36	10,76±1,54	11,2±1,85	10,91±1,24
	8-10 дней	9,05±1,89*	12,07±2,11*	13,97±2,23*	12,19±1,73*
	1 месяц	9,94±2,25**	13,49±1,72*	17,01±2,48*	13,71±1,52*
	3 месяца	10,54±2,82**	14,03±2,55*	19,02±3,19*	14,53±1,55*
	6 месяцев	11,04±2,18**	15,20±2,8*	19,26±2,37*	14,78±1,54*
СОД, у.е. мг Нб	постановка модели	0,35±0,02	0,35±0,01	0,33±0,01	0,33±0,01
	8-10 дней	0,51±0,02*	0,47±0,02*	0,54±0,01*	0,46±0,01*
	1 месяц	0,59±0,02*	0,75±0,02*	0,81±0,02*	0,67±0,01*
	3 месяца	0,69±0,02*	0,85±0,02*	0,98±0,02*	0,76±0,02*
	6 месяцев	0,72±0,04*	0,82±0,01*	0,98±0,02*	0,76±0,01*
МДА, нмоль/г Нб	постановка модели	22,05±0,72	22,8±0,62	22,12±0,56	23,33±0,61
	8-10 дней	26,61±0,69*	26,35±0,54*	25,55±0,42*	26,02±0,66*
	1 месяц	28,17±0,37*	24,01±0,5*	22,68±0,56**	27,38±0,38*
	3 месяца	27,84±0,45*	23,59±0,44**	20,93±0,41*	25,62±0,43*
	6 месяцев	25,47±0,65*	22,14±0,66**	20,38±0,58*	24,09±0,62**
iNOS, пг/мл	постановка модели	9,95±0,47	9,92±0,41	8,82±0,3	9,22±0,42
	8-10 дней	29,3±0,78*	24,85±0,81*	26,16±0,89*	30,81±0,97*
	1 месяц	30,77±0,95*	23,91±0,58*	28,7±0,98*	32,49±1,06*
	3 месяца	30,23±0,97*	23,77±0,35*	27,59±0,87*	32,34±0,81*
	6 месяцев	26,68±1,52*	23,79±0,56*	23,74±0,63*	31,35±0,75*
СРБ, мг/л	постановка модели	28,14±3,78	28,16±2,64	27,72±2,89	28,67±3,48
	8-10 дней	48,07±3,71*	46,91±5,56*	49,75±4,86*	30,55±2,88*
	1 месяц	58,46±4,31*	54,2±4,85*	55,83±4,25*	31,80±2,87*
	3 месяца	55,67±4,55*	52,54±3,29*	56,23±2,81*	32,63±3,11*
	6 месяцев	50,48±4,82*	50,32±3,5*	55,15±3,68*	33,06±3,61*

Примечание: * - значимое отличие от уровня постановки модели (p<0,05);

** - различия недостоверны в сравнении с уровнем постановки модели (p>0,05)

Морфологическая картина в зоне артериальной реконструкции в исследуемых группах на момент окончания эксперимента.

При проведении морфологического исследования были получены следующие результаты. В контрольной группе стенка сосуда утолщена в результате интерстициального отека всех слоев, определяется истончение эндотелия, сморщивание эндотелиоцитов. Интима рельефная, неравномерно утолщена, с явлениями гиперплазии, с выраженными дистрофическими изменениями и наличием разволокнения волоконного каркаса, что создает наличие оптически пустых ячеек, признаки плазморрагии. Эндотелий неравномерно расположенный, с набуханием отдельных клеток (средняя толщина интимы $87,8 \pm 3,1$ мкм) (табл.2). Внутренняя эластическая мембрана сформирована, прерывиста, очагово утолщена и базофильна. Клеточная реакция на протез со стороны адвентиции выраженная, проявляющаяся в основном в выраженной диффузной полиморфноклеточной инфильтрацией с минимальным количеством клеток рассасывания и макрофагов. В опытных группах, где проводилась эндотелиотропная терапия (розувастатин и розувастатин+L-аргинин), все слои артериальной стенки четко дифференцируются. Интима, как в области прилежащей к протезу, так и на всем протяжении сосуда ровная, гладкая, плотная, явления отека не обнаруживаются. Признаки гиперплазии не выражены. Интима покрыта на всем протяжении эндотелием, эндотелиоциты уплощенные, ядро базофильное, цитоплазма тонкая, с нежной эозинофилией. Средняя толщина интимы в этих группах достоверно снижается по сравнению с группой контроля (розувастатин – $79,3 \pm 3,5$ мкм и розувастатин+L-аргинин $72,1 \pm 3,7$ мкм) (табл.2). В адвентиции и средней оболочке воспалительной инфильтрации не обнаруживается, отмечаются единично полнокровные сосуды адвентиции. В зоне протезирования, определяется очаговая макрофагально-плазмоцитарная инфильтрация. Редко встречаются клетки инородных тел. В группе, где препаратом коррекции эндотелиальной дисфункции выступал мелоксикам, в месте прилегания ткани протеза к меди и интима, четко определяется умеренно выраженная гиперплазированная интима (средняя толщина интимы – $80,8 \pm 6,2$

мкм) (табл.2). В данной группе определяется следующий феномен: на фоне умеренно гиперплазированной интимы, определяются колбовидные утолщения интимы, покрытые уряженным слоем эндотелия, которые вдаются в просвет сосуда. Создается впечатление «папилломатоза интимы». В очагово гиперплазированной интимае волокна располагаются таким образом, что создается впечатление окончатости. Клеточная реакция на ткань протеза умеренно выраженная, в основном проявляющаяся распределением полиморфноклеточного экссудата по прилежащему краю протеза и вокруг собственных сосудов адвентиции. Следует отметить, что характер морфологических изменений артериальной стенки не зависит от характера использованного синтетического материала (дакрон или политетрафторэтилен). Также не было выявлено достоверных различий в тканевых реакциях и специфичности изменений при использовании данных материалов.

Таблица 2.

Морфометрические показатели толщины оболочек сосуда
в экспериментальных группах (мкм)

Оболочка сосуда	Контрольная группа	Розувастатин	Розувастатин + L аргинин	Мелоксикам
Средняя толщина интимы	87,8 \pm 3,1	79,3 \pm 3,5*	72,1 \pm 3,7*	80,8 \pm 6,2**
Средняя толщина меди	242,3 \pm 11,8	209,2 \pm 28,1**	206,3 \pm 16,9*	218,6 \pm 11,3*
Средняя толщина адвентиции	128,5 \pm 16,6	125,7 \pm 23,5**	122,6 \pm 18,7**	126,3 \pm 11,3**

Примечание: * - значимое отличие от уровня контрольной группы (p<0,05);

** - различия недостоверны в сравнении с уровнем контрольной группы (p>0,05)

ВЫВОДЫ

1. Использование комбинации лекарственных препаратов (розувастатин + L-аргинин) с целью коррекции эндотелиальной дисфункции более эффективно, чем монотерапия розувастатином и приводит к достоверному увеличению уровня стабильных метаболитов оксида азота (II), уменьшению толщины гиперплазированной интимы в зоне реконструктивной операции и как следствие к снижению частоты рестеноза.

2. Применение селективного НПВС (мелоксикама) ассоциируется с низким уровнем стабильных метаболитов оксида азота (II), С-реактивного белка, повышением значения СОД, МДА и iNOS, что свидетельствует об отсутствии эндотелиопротективных свойств у препарата.

3. Характер морфологических изменений артериальной стенки не зависит от характера использованного синтетического материала (дакрон или политетрафторэтилен).

4. Развитие гиперплазии интимы в зоне артериальной реконструкции ассоциируется с повышенным уровнем СОД, МДА, iNOS, СРБ и низким уровнем стабильных метаболитов оксида азота (II) в биохимическом статусе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью профилактики развития гиперплазии интимы в зоне артериальной реконструкции в послеоперационном периоде в сроки до 6 месяцев предпочтительно использование комбинации эндотелиотропных препаратов розувастатин + L-аргинин.

2. Показано применение селективного НПВС мелоксикама в раннем послеоперационном периоде после выполнения реконструктивно-восстановительных операций на магистральных артериях с целью купирования системного воспалительного ответа.

3. Учитывая отсутствие достоверных различий в биохимическом статусе маркеров ЭД и морфологической картины зоны артериальной реконструкции при использовании разных синтетических заплат (дакрон и

политетрафторэтилен), равнозначное использование данных материалов в реконструктивно-восстановительной хирургии магистральных артерий.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

А. В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С., Мнихович М.В. Способы моделирования эндотелиальной дисфункции в эксперименте на животных // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. - 2012. - Т.V, №3. - С. 557-561.
2. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С., Мнихович М.В. Биохимическая и морфологическая оценка функционального состояния эндотелия при реконструктивных операциях на брюшной аорте в эксперименте на животных // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2013. - Т.19, №3 - С. 30-34.
3. Герасимов А.А. Последние достижения в коррекции функционального состояния эндотелия // Современные проблемы науки и образования. - 2015. - №3. -URL: www.science-education.ru/123-19398
4. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С., Мнихович М.В. Состояние функции эндотелия при артериальных реконструкциях в эксперименте в зависимости от вида синтетических заплат // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. - 2015. - №4. – с.32-35.

Б. в других изданиях:

5. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С., Звягина В.Н. L-NAME-индуцированная эндотелиальная дисфункция при реконструктивных операциях в эксперименте // Материалы ежегодной научной конференции РязГМУ. – Рязань. – 2012. – с.40-44.
6. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С. Оценка эффективности фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции при реконструктивных операциях на магистральных артериях в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология: научные чтения. Сборник

тезисов Всероссийской научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина. – Рязань. – 2013. – с.68-72.

7. Герасимов А.А. Экспериментальное моделирование и оценка эффективности фармакологической коррекции L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции // Студенческая медицинская наука XXI века. Материалы XIII международной научно-практической конференции. – Витебск. – 2013. – с.83-84.

8. Герасимов А.А., Жеребятьева С.Р. Проблема выбора пластического материала для реконструктивно-восстановительных операций на магистральных артериях: современное состояние проблемы // Наука молодых. – Рязань. – 2014. - №2. – с.107-116.

9. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А, Пшенников А.С. Современные подходы к коррекции эндотелиальной дисфункции при лечении облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Материалы VIII международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора А.П. Солодкова. – Витебск. – 2014. – с.77-80.

10. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А, Пшенников А.С. Варианты коррекции эндотелиальной дисфункции в комплексном лечении облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. Материалы XXIX международной конференции российского общества ангиологов и сосудистых хирургов, том 20. – Рязань. – 2014. – с.159-160.

11. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А, Пшенников А.С., Камаев А.А. Новые методы профилактики рестеноза зоны реконструкции // Проблемы и перспективы лечения мультифокального атеросклероза. Материалы IX научно-практической конференции ЦФО с участием ведущих специалистов России. – Тверь. – 2014. – с.35-40.

12. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А, Пшенников А.С., Мнихович М.В. Морфологические изменения сосудистой стенки при артериальных реконструкциях с использованием различных типов синтетических материалов

// Ангиология и сосудистая хирургия. Материалы XXX международной конференции российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. – Сочи. – 2015. – с.254-255.

13. Герасимов А.А., Слепнев А.А. Применение селективных НПВС на фоне эндотелиальной дисфункции: морфологическая картина зоны артериальной реконструкции // Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста. Материалы Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов. – Рязань. – 2015. – с.20-21.

14. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А, Пшенников А.С., Мнихович М.В. Оценка биохимических и морфологических изменений в зоне артериальной реконструкции при использовании различных типов пластических материалов (экспериментальное исследование) // Тезисы XII Съезда хирургов России. – Ростов-на-Дону. – 2015. – с.1069-1070.

15. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А, Пшенников А.С., Мнихович М.В. Взаимосвязь биохимического статуса и морфологических изменений сосудистой стенки при артериальных реконструкциях на фоне моделирования эндотелиальной дисфункции // Избранные страницы сосудистой хирургии. Материалы XXXI международной конференции российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. – Москва. – 2015. – с.55-56.

16. Герасимов А.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А, Пшенников А.С., Мнихович М.В., Митина А.И. Эффективность комбинированной терапии эндотелиальной дисфункции и ее влияние на морфологическую картину зоны артериальной реконструкции // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Материалы 21 Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. – Москва. – 2015. – с.100.

Научное издание

Герасимов Александр Андреевич

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И КОРРЕКЦИЯ
ЭНДОТЕЛИЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ АРТЕРИАЛЬНЫХ
РЕКОНСТРУКЦИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ЗАПЛАТ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.

Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в РИО УМУ ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России

390026, г.Рязань, ул. Шевченко, д.34/2