

УДК 57.041: 57.017

И. П. ЖАВОРОНОК¹, С. В. МАНЬКОВСКАЯ¹, Н. И. СЧАСТНАЯ¹, О. А. АНТИПОВА¹,
Т. А. ФИЛИПОВИЧ¹, Е. В. ФЁДОРОВА¹, Н. А. РОГОВОЙ², С. А. АЛЕКСЕЕВ²

КРИТИЧЕСКАЯ ИШЕМИЯ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ КРЫСЫ: ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛИ

¹ Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Предложена модификация способа индукции ишемии задней конечности крысы путем иссечения участка бедренной артерии длиной не менее 20 мм. Модификация хирургической модели критической ишемии у крыс приводила к развитию артериальной недостаточности задней конечности, которая сопровождалась выраженной гипералгезией, снижением значений площади и интенсивности отпечатка травмированной лапы и сокращением числа функционирующих кровеносных капилляров.

Ключевые слова: критическая ишемия задней конечности, порог ноцицептивной реакции, параметры походки, гистологический анализ.

Введение. Развитие критической ишемии нижних конечностей (КИНК) у пациентов характеризуется многоуровневым сосудистым поражением с преимущественным вовлечением периферического русла [1]. В лечении заболевания приоритетными на данный момент являются хирургические методы, что подтверждается большим количеством клинических и эпидемиологических исследований с высоким уровнем доказательности. Однако, у части пациентов возможности хирургических и эндоваскулярных методов коррекции магистрального кровотока ограничены из-за невозможности адекватной реконструкции дистального сосудистого русла [2]. Это обуславливает актуальность поиска путей паллиативной реваскуляризации.

Для оценки безопасности и эффективности разрабатываемых терапевтических средств используются различные экспериментальные модели ишемии конечности у крысы. Так, зарубежными авторами предложен способ моделирования рассматриваемой патологии путем перевязки бифуркации бедренной артерии. Кровоток прекращался по поверхностной и глубокой артерии бедра [3]. Описана также хирургическая модель ангиопатии, основанная на лигировании подвздошной артерии и нанесении 2–3 кожных ран на стопе животного [4]. В обоих случаях из-за особенностей ветвления артерий нижних конечностей у грызунов, последние достаточно быстро восстанавливались [4]. Более агрессивной является модель, суть которой заключается в иссечении бедренной, подколенной и начальных отделов передней и задней большеберцовых артерий. Отходящие от артерий коллатерали первого порядка также пересекали и лигировали [5]. Э.Э. Файзиев и соавт. разработали резекционную модель, включающую удаление бедренной, подколенной, передней и задней большеберцовой артерий, бедренной вены и пересечение седалищного нерва [6]. Данные экспериментальные модели позволили воспроизвести хроническую ишемию конечности, но характеризовались высоким риском послеоперационных осложнений и требовали хорошей хирургической подготовки.

В проведенных исследованиях нами была предложена модификация способа моделирования критической ишемии задней конечности, описанного М.А. Юдиным и соавт. [7]. Согласно данной модели, разрез кожи у лабораторных животных выполняют в проекции бедренной артерии, затем осуществляют её лигирование двумя лигатурами на расстоянии 0,5 см друг от друга с последующим иссечением участка сосуда между лигатурами.

Целью данного исследования явилась верификация экспериментальной модели критической недостаточности артериального кровоснабжения задней конечности у крыс и её патофизиологическая характеристика.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на белых половозрелых крысах-самках Wistar (n=19) массой 250–280 г, содержащихся в условиях

конвенционального вивария Института физиологии НАН Беларуси в режиме 12/12-часового цикла ночь/день при температуре $22,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ и влажности 60–65 %. Все животные имели свободный доступ к корму и питьевой воде. Дизайн исследования одобрен Комитетом по биоэтике института (протокол № 5 от 17.05.2023 г.). До начала эксперимента животные находились в виварии под карантинным наблюдением в течение двух недель. Для эксперимента отобраны активные крысы с гладким, блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающие корм. Животных разделили на две группы: контрольную группу – интактные (здоровые) животные ($n=6$) и опытную группу – животные с моделью экспериментальной критической ишемией задних конечностей ($n=13$).

Моделирование КИНК проводили под общим наркозом (тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно). Крыс фиксировали на спине, после подготовки операционного поля (сбривание шерсти и обработка 70 % раствором спирта) выполняли разрез кожи по внутренней поверхности правого бедра ниже паховой связки. Сначала выделяли элементы сосудисто-нервного пучка бедра, затем бедренную артерию отделяли от вены и нерва, мобилизовали (пересекали отходящие от нее ветви первого порядка). У места начала артерии (ниже уровня паховой связки) накладывали первую лигатуру с использованием полимерного не рассасывающегося шовного материала, другую лигатуру – на расстоянии не менее 20-и мм от предыдущей у подколенной бифуркации артерии. Участок бедренной артерии между двумя лигатурами иссекали. Рану на бедре ушивали шовным материалом «Сургикрол» 3/0 («Футберг», Беларусь), швы обрабатывали 1 % раствором бриллиантового зеленого. Для предупреждения инфицирования раны крысам сразу после операции подкожно вводили антибиотик цефтриаксон в дозе 200 мг/кг. Животные находились в индивидуальных боксах под постоянным визуальным контролем до полного пробуждения от наркоза.

Динамическое наблюдение за развитием симптомов КИНК осуществляли путем регистрации значений порога ноцицептивной реакции, параметров походки, проводили гистологические исследования мышц бедра и голени. Порог ноцицептивной реакции (ПНР) на механический стимул определяли до операции по моделированию критической ишемии конечности, а также на 14-е, 28-е и 60-е сутки после нее с помощью альгезиметра в тесте «Рэндалла-Селитто» (Panlab, Испания) [8]. Измерения ПНР проводили трехкратно с интервалом 5–7 мин.

Анализ параметров походки проводили в вышеуказанные сроки с использованием аппаратно-программного комплекса CatWalk XT версии 10.6 (Noldus, Голландия), представляющего собой коридор со стеклянным полом (дорожкой), подсвечиваемым одновременно зелеными светодиодами и красным светом. На расстоянии 56-и см ниже стеклянной дорожки располагали высокоскоростную камеру с широкоугольным объективом (Gevicam GP-3360, GEViCAM Inc., США), что позволяет автоматически регистрировать отпечатки лап, когда животное пересекает участок дорожки с откалиброванной длиной. Запись пробежек осуществляли в темном вентилируемом помещении при низком уровне шума. Каждое животное тестировали до получения трех адекватных пробежек (вариация <75 %, время пробежки <5 с). Оценивали площадь отпечатка (cm^2) и интенсивность отпечатка в абсолютных единицах (аб.ед.) [9, 10].

Для изучения структуры мышц бедра и голени проводили стандартное гистологическое исследование. Забор образцов мышечной ткани бедра и голени задних конечностей крыс осуществляли на 14-е, 28-е сутки эксперимента. Материал фиксировали в 10 %-ом нейтральном забуференном формалине в течение не менее 24 ч. Далее проводили гистологическую проводку в вакуумном тканевом процессоре KD-TS6B (Китай) и заливку в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм, полученные при помощи ротационного микротомы CUT5062 (SLEE medical, Германия), наносили на предметные стекла с адгезивным покрытием. После депарафинизации в ксилоле и обезвоживания в растворах этилового спирта возрастающей концентрации гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Полученные микропрепараты просматривали с помощью светового микроскопа Optec BK 5000, оснащенного цифровой камерой (Optec, Китай). Дополнительно в программе Image J (США) регистрировали соотношение количества кровеносных сосудов к количеству мышечных волокон в 10-и полях зрения при увеличении $\times 400$ [11].

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы Statistica 10. Результаты исследования представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm Sd$). Нормальность распределения выборок проверяли с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Оценку статистической значимости количественных признаков определяли с помощью t-критерия Стьюдента

и критериев Вилкоксона для зависимых и Манна-Уитни для независимых выборок в парных сравнениях. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Общее состояние и поведение животных на протяжении всего периода наблюдения носили нормальный характер. Шерстный покров был яркий, блестящий, гладкий, очагов облысения не наблюдалось. Кожа бледно-розовая, эластичная, подвижная, без повреждений. Видимые слизистые оболочки (глаз, носовой, ротовой полостей) бледно-розовые, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений. Патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали. В первые двое суток после моделирования КИНК животные старались не наступать на прооперированную конечность (далее ипсилатеральная), в последующие сутки развивалась перемежающаяся хромота, но в целом состояние крыс было удовлетворительное: они реагировали на раздражители; охотно поедали корм и потребляли воду. Динамика массы тела у животных была положительной (рисунок 1).

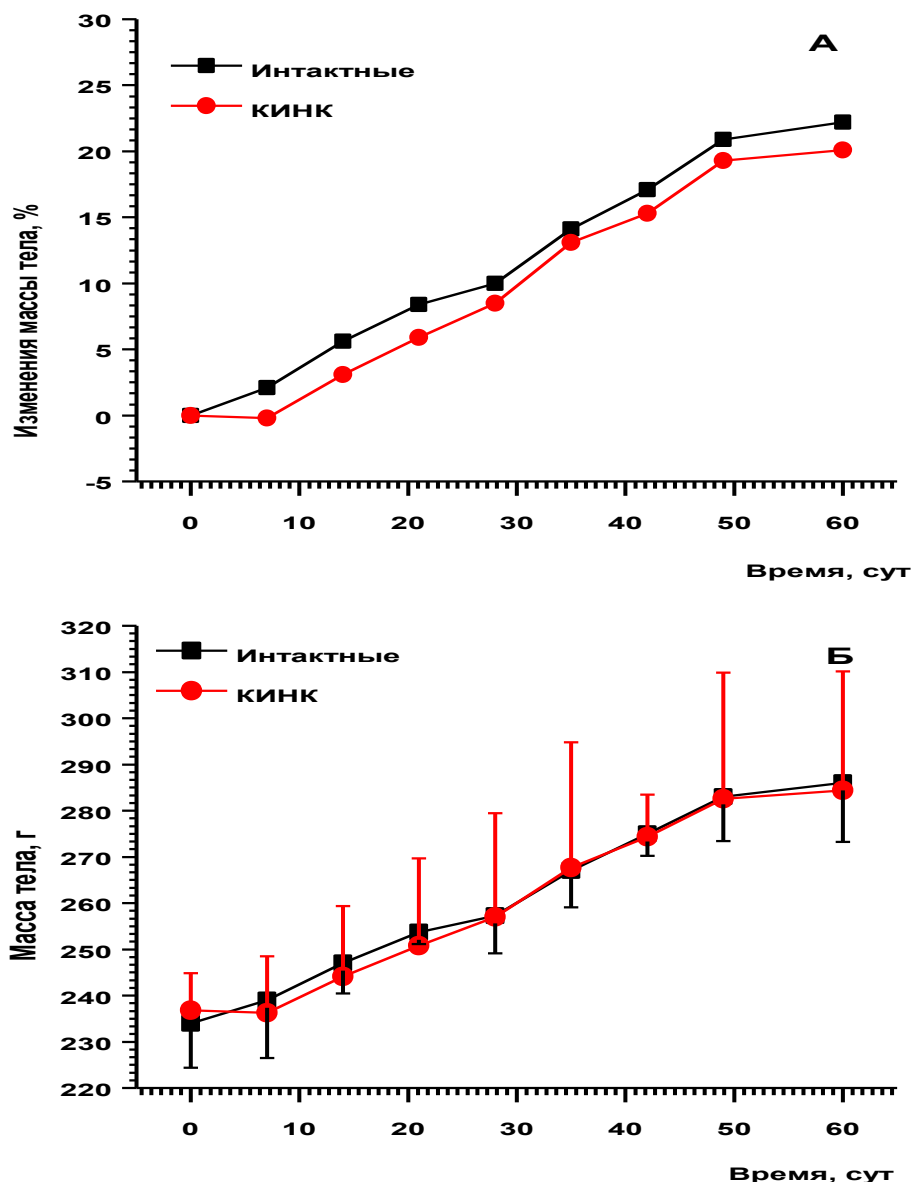


Рис. 1. Динамика изменения массы тела экспериментальных животных: А – в процентах, Б – в граммах

Экспериментальная модель КИНК сопровождалась развитием механической гипералгезии на 14-е и усугублялась на 28-е сутки эксперимента, что выражалось в снижении значений ПНР ипсилатеральной конечности на 18,9 % (с $139,8 \pm 5,0$ г до $113,3 \pm 3,5$ г, $p < 0,005$) и на 36,9 % (с $139,8 \pm 5,0$ г до $88,2 \pm 6,0$ г, $p < 0,005$) соответственно (рисунок 2). При этом, значения ПНР у животных с индуцированной ишемией на 14-е сутки были ниже соответствующих показателей у интактных животных на 13,9 %, а на 28-е сутки – на 32,4 % (рисунок 2). Значения ПНР левой

здоровой (контралатеральной) задней конечности у животных группы с КИНК, как и данный показатель для правой конечности интактных животных, не изменялись в данных временных точках ($p>0,05$) (рисунок 2).

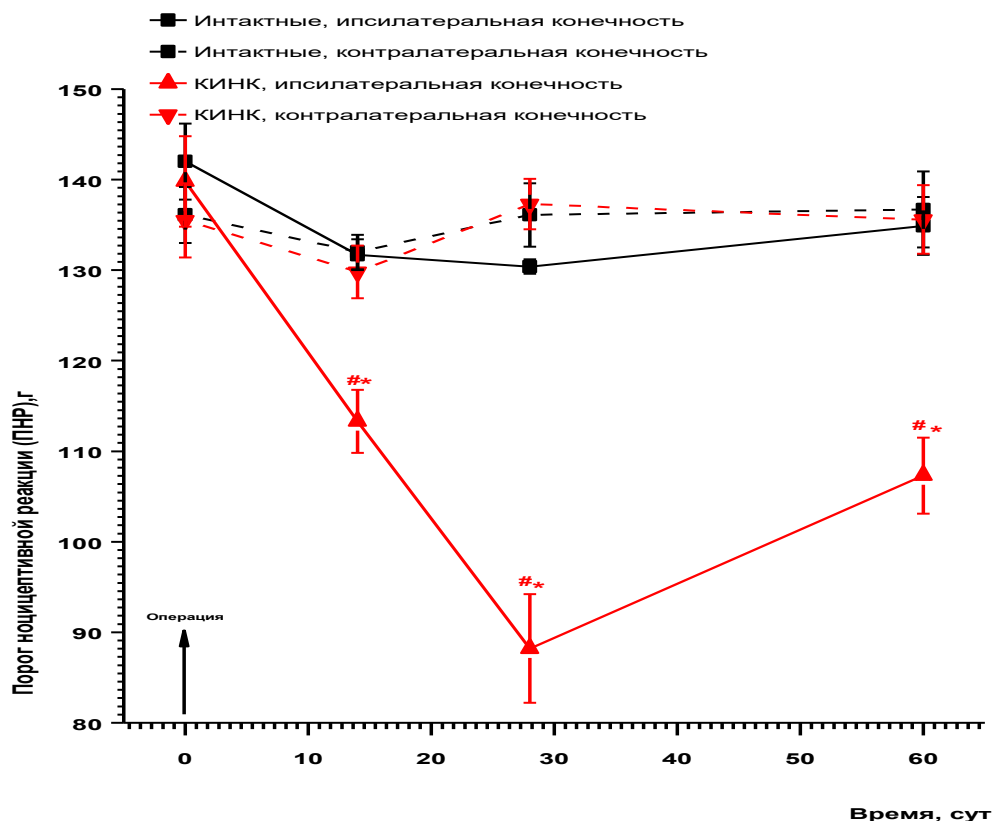


Рис. 2. Изменение порога ноцицептивной реакции крыс с экспериментальной ишемией задних конечностей; * – $p\leq 0,05$ по сравнению со значением ПНР интактных животных, # – $p\leq 0,05$ по сравнению с фоновыми значениями ПНР до операции

При оценке паттернов походки (*площади и интенсивности отпечатка* прооперированной конечности) у экспериментальных животных в те же сроки исследования были установлены изменения, соответствующие модуляциям ноцицептивных реакций. При этом достоверное снижение указанных параметров на 30–35 % было зафиксировано на 14-е сутки и сохранялось на протяжении всего периода мониторинга (таблица 1).

Табл. 1. Изменения параметров походки у экспериментальных животных

Группа животных	Продолжительность эксперимента, сутки			
	0 (день операции)	14	28	60
<i>Площадь отпечатка правой лапы, (M±Sd), см²</i>				
Интактная	1,26±0,47	1,27±0,31	1,19±0,51	1,16±0,12
КИНК	1,02±0,41	0,70±0,24*	0,79±0,29*	0,74±0,25*
<i>Интенсивность отпечатка правой лапы, (M±Sd), аб.ед.</i>				
Интактная	72,26±4,68	77,98±2,03	94,65±1,42	83,69±13,35
КИНК	80,26±9,27	62,49±13,31*	63,13±14,33*	64,92±17,43*

Примечание: * – $p\leq 0,05$ по отношению к фоновым значениям

Гистоструктура скелетных мышц бедра и голени интактных крыс представлена полигональными профилями мышечных волокон относительно единообразных диаметров с собственными ядрами на периферии под сарколеммой, минимальными прослойками соединительнотканых оболочек – эндо- и перимизия. На продольных срезах в скелетной мышечной ткани в саркоплазме визуализировали поперечную исчерченность (рисунок 3, А, Б). Хорошо определялись мелкие и крупные кровеносные сосуды, просветы которых были широкими, эндотелиальные клетки – без патологических изменений.

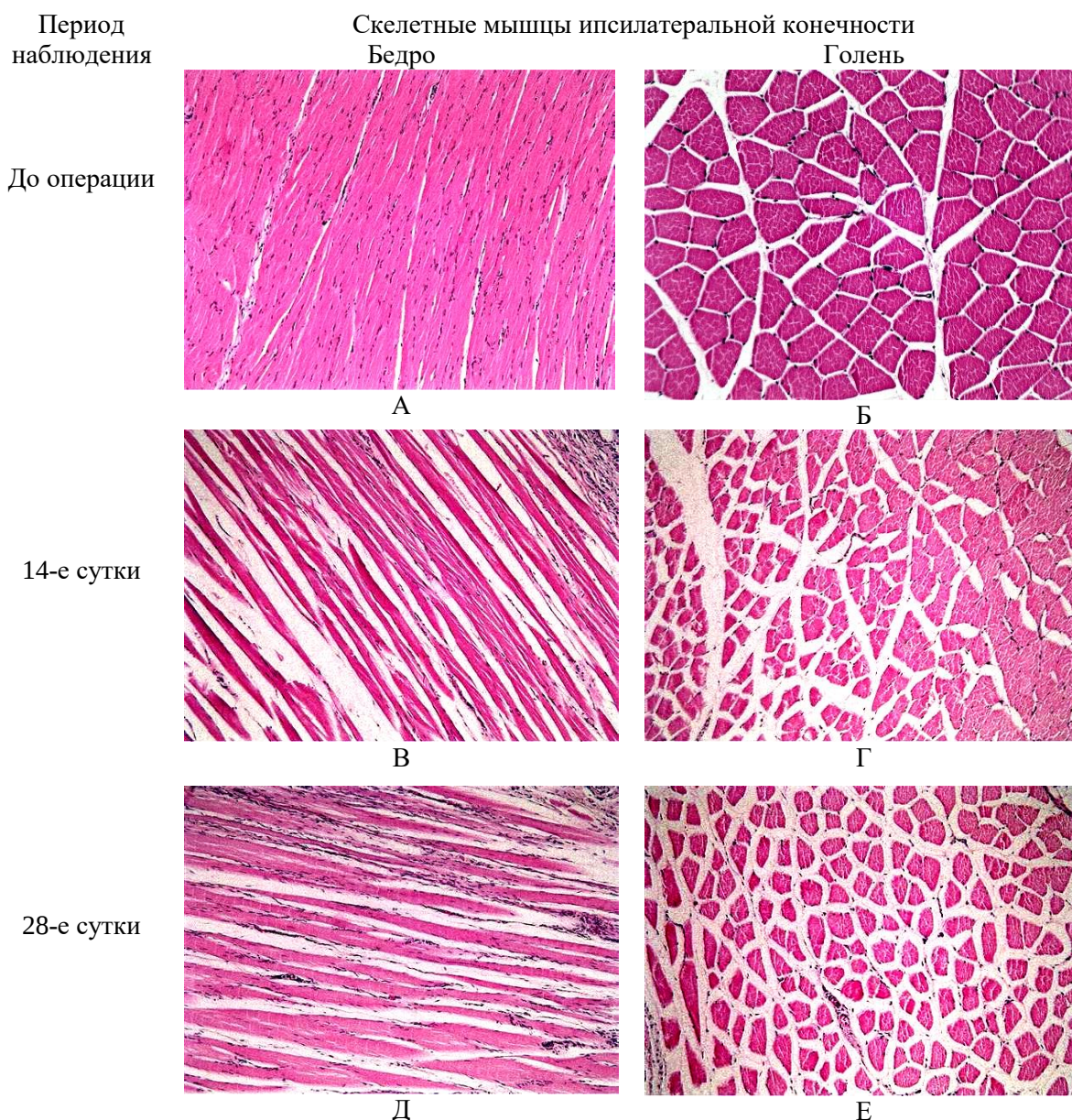


Рис. 3. Морфологическая характеристика скелетных мышц бедра и голени крыс экспериментальных групп (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$). А, Б – гистологическая картина без особенностей; В, Г – мышечные волокна с признаками ишемии; Д, Е – мышечные волокна с признаками ишемии и атрофии, пролиферация сосудов и клеток эндо- и перимизия, очаги регенерирующих миобластов

На препаратах тканей бедра на 14-е сутки после моделирования КИНК отмечали признаки ишемии мышечных волокон с просветлением цитоплазмы и потерей поперечной исчерченности, миолиза, кариолизиса наряду с выраженным межмышечным отеком (рисунок 3, В). В артериолах наблюдали гипертрофию клеток эндотелия и отдельных ядер гладкомышечного слоя с умеренно выраженным периваскулярным фиброзом и круглоклеточным инфильтратом с примесью нейтрофилов. При микроскопическом изучении гистологических препаратов мышц голени на 14-е сутки после моделирования КИНК наблюдали умеренно выраженные дистрофические изменения мышечных волокон в виде нарушения поперечной исчерченности, миолиза и очаговой фрагментации. Отмечали фокусы с неравномерной атрофией миоцитов в сочетании с гомогенизацией и умеренным межмышечным отеком (рисунок 3, Г). В толще мышечных волокон выявлен незначительный воспалительный инфильтрат. В артериолах наблюдали адгезию эритроцитов, выпячивание ядер эндотелиоцитов в просвет, пролиферацию клеток гладкомышечного слоя. В периваскулярном пространстве визуализировался слабовыраженный фиброз со скудной воспалительной инфильтрацией, представленной лимфоцитами и нейтрофилами.

В тканях бедра на 28-е сутки после моделирования КИНК на фоне нарастания ишемии и атрофии мышечных волокон со скудной воспалительной инфильтрацией выявлены участки регенерирующих миобластов с умеренно выраженным межмышечным фиброзом (рисунок 3, Д). Визуализировали липоматоз и периваскулярный фиброз, скопление эритроцитарных масс в сосудах микроциркуляторного русла, новообразованные сосуды. В отдельных артериолах ядра эндотелия выбухали частоколом в просвет сосуда. При микроскопическом изучении гистологических препаратов скелетных мышц голени на 28-е сутки после моделирования КИНК прогрессировали атрофические и ишемические изменения мышечных клеток в сочетании с интерстициальным отеком (рисунок 3, Е). Определяли пролиферацию сосудов микроциркуляторного русла среди мышечных волокон, гипертрофию эндотелиальных клеток и выпячивание их в просвет сосудов, очаговый отек субэндотелиального пространства артериол. В периваскулярном пространстве отмечена слабовыраженная круглоклеточная воспалительная реакция с примесью сегментоядерных нейтрофилов и периваскулярный фиброз в сочетании с умеренным липоматозом поверхностной фасции. При морфометрическом исследовании гистологических препаратов оценивали динамику количества сосудов, приходящихся на одно мышечное волокно, в поле зрения на поперечных срезах скелетных мышц нижних конечностей в экспериментальных группах (таблица 2).

Табл. 2. Динамика количества сосудов скелетных мышц нижних конечностей крыс в экспериментальных группах на 14-е и 28-е сутки, (M±Sd)

№ п/п	Группа животных		14-е сутки	28-е сутки
1	Интактная	бедро	2,95±1,01	2,95±1,01
		голень	2,50±0,91	2,50±0,91
2	КИНК	бедро	2,41±1,05*	2,87±1,32^
		голень	2,03±0,94*	2,38±1,09^

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к группе интактных животных; ^ – $p \leq 0,05$ по отношению к 14-м суткам в группе животных с КИНК

Установлено, что на 14-е сутки эксперимента в группе животных с КИНК выявлено статистически значимое снижение количества сосудов, приходящихся на одно мышечное волокно, в бедре и в голени по отношению к интактным животным. Так, количество сосудов в бедре у оперированных крыс на 14-е сутки составило $2,41 \pm 1,05$ ($p=0,00$), в голени – $2,03 \pm 0,94$ ($p=0,00$). На 28-е сутки зафиксирована тенденция к восстановлению исследуемого показателя до значений у интактных крыс, что указывает на начало процесса восстановления кровотока в ишемизированной мышце за счёт особенности кровоснабжения конечностей у грызунов.

Заключение. Предложенная модификация хирургической модели критической ишемии, основанная на иссечении участка бедренной артерии длиной не менее 20 мм, у крыс приводит к развитию артериальной недостаточности задней конечности. Описанная экспериментальная модель характеризуется снижением кровотока в мышечной ткани задней конечности экспериментальных животных, которое при морфологическом анализе образцов тканей подтверждается достоверным сокращением числа функционирующих кровеносных капилляров. Установлены выраженные изменения ноцицептивной чувствительности и паттернов походки у животных с индуцированной ангиопатией. Развитие экспериментальной ишемии сопровождается выраженной гипералгезией и опосредованной ею перемежающейся хромотой, о чем свидетельствует достоверное снижение значений порога ноцицептивной реакции, а также площади и интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности у животных с патологией.

Литература:

- [1] Uccioli L., Meloni M., Izzo V. et al. Critical limb ischemia: current challenges and future prospects // Vascular Health and Risk Management. 2018. Vol. 14. P. 63–74.
- [2] Biscetti F., Nardella E., Rando M.M. et al. Outcomes of lower extremity endovascular revascularization: potential predictors and prevention Strategies // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. P. 2002.
- [3] Lawall H., Bramlage P., Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal // Thromb Haemost. 2010. Vol. 103, №4. P 696–709.
- [4] Waterman R. S., Betancourt A. M. Treating chronic pain with mesenchymal stem cells: A therapeutic approach worthy of continued investigation. // J. Stem. Cell Res. Ther. 2011. Vol.2. P. 2–9. doi:10.4172/2157-7633.S2-001.
- [5] Орлова А. Ю., Суковатых Б. С., Артюшкова Е. Б., Гордов М. Ю. Патент № 2556606 Российская Федерация. Способ лечения хронической ишемии конечности в эксперименте №2014113802/14. Курский государственный университет, заявл. 04.08.2014.

- [6] Фейзи́ев Э. Э., Белоус А. С., Суковатых Б. С., Трубникова Е. В. Патент № 2734158 Российская Федерация. Способ моделирования критической ишемии нижних конечностей у экспериментальных животных – крыс № 2020111315. Курский государственный университет, заявл. 18.03.2020.
- [7] Юдин М. А., Плакса И. Л., Мжаванадзе Н. Д. и др. Оценка системного распределения и ангиогенного эффекта pl-VEGF165 в модели ишемии конечностей // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015. Т. 19, № 4–2. С. 33–42.
- [8] Deuis J. R., Dvorakova L. S., Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2017. Vol.10. P. 1–17.
- [9] Gait analysis sistem for rodents CatWalk XT [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.noldus.com/catwalk-xt>. – Дата доступа: 05.04.2024.
- [10] Solutions for rodent gait analysis [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://info.noldus.com/hubfs/resources/noldus-white-paper-catwalk-getting-perfect-runs.pdf>– Дата доступа: 05.04.2024.
- [11] Деев Р.В., Мжаванадзе Н.Д., Мавликеев М.О. и др. Патогистологические изменения скелетных мышц при хронической артериальной недостаточности нижних конечностей // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2015, Т. 10, № 2, С. 18–21.

I. P. ZHAVORONOK¹, S. V. MANKOVSKAYA¹, N. I. SHCHASTNAYA¹, O. A. ANTIPOVA¹,
T. A. FILIPOVICH¹, E. V. FIODOROVA¹, N. A. ROGOVOY², S. A. ALEKSEEV²

CRITICAL ISCHEMIA OF THE RAT HIND LIMB: PATHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE MODEL

¹ State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Republic of Belarus

² Educational Institution “Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

A modification of the method for simulating ischemia of the rat hind limb by excision of a section of the femoral artery with a length of at least 20 mm was proposed. Modification of the surgical model of critical ischemia in rats led to the development of arterial insufficiency of the hind limb, which was accompanied by severe hyperalgesia, a decrease in the area and intensity of the injured paw print, and a reduction in the number of functioning blood capillaries.

Keywords: critical ischemia of the hind limb, nociceptive threshold, gait parameters, histological analysis.