

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТИМУЛЯТОРА АНГИОГЕНЕЗА

Р.Т. Нигматуллин, Ш.С. Минигазимов

*Всероссийский Центр глазной и пластической хирургии
г. Уфа*

Реферат. В работе приводятся результаты экспериментальных исследований двух видов биоматериалов, приготовленных в соответствии с требованиями ТУ-42-2-537-2002 – стимулятора регенерации и стимулятора ангиогенеза. Показано, что оба вида биоматериалов обладают ангиоиндуктивными свойствами. При этом в ранние сроки происходит мобилизация органного сосудистого русла тканевого ложа; в более поздние сроки (до 30 суток) происходит активная васкуляризация биоматериала. Статистический анализ показывает более выраженные ангиоиндуктивные процессы при введении стимулятора ангиогенеза. Полученные результаты позволили рекомендовать данный биоматериал для лечения облитерирующих заболеваний, например, артрит нижних конечностей с преимущественным поражением дистального русла.

Ключевые слова: реваскуляризация, ангиогенез, трансплантат, биоматериалы Аллоплант.

Во всем мире хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) возникает в среднем у 2-3% населения, причем с возрастом частота их увеличивается, достигая на седьмом десятилетии жизни 5-7%. (Покровский А.В. 1994, Савельев В.С. и др., 1997, Абалмасов К.Г. и др., 2003).

Заболевание неуклонно прогрессирует, ухудшая результаты консервативного и хирургического лечения, приводя к ранней инвалидизации. Лечение ХОЗАНК на сегодняшний день является одной из наиболее сложных проблем ангиологии, особенно при поражении артерии голени и стопы. По данным отечественных и зарубежных авторов 40% больных, страдающих заболеванием сосудов, имеет периферическую форму поражения магистральных артерий. (Бытка П.Ф. и др., 1977; Затевахин И.И. и др., 1993; Покровский А.В. и др., 2002).

При облитерирующем тромбангите, феномене Рейно и диабетической ангиопатии характерно поражение периферических отделов сосудистой системы - артерии малого калибра и капилляров. Реконструктивные операции (прямые реваскуляризации) на артериях этой категории больных практически невыполнимы.

Частота выполненных ампутаций при ХОЗАНК, обусловленных ишемией, колеблется в пределах 16-46 на 100000 населения в год (Абалмасов К.Г., 2003). В мире ежегодно выполняются свыше 2,7-4,5 миллиона высоких ампутаций по поводу диабетических поражений нижних конечностей (М.Е. Levin, 2001).

Неэффективность первичных реконструктивных операций, при поражении артерий дистального русла, заставляет сосудистых хирургов искать новые нестандартные методы не прямой реваскуляризации. Эти операции направлены на стимуляцию коллатерального кровотока; артериализация вен голени и стопы (Покровский А.В. и др., 2001), ауто трансплантация сальника (Абалмасов К.Г., 2001; Пулин А.Г. и др., 2001; Щедрина М.А. 2001), реваскуляризирующая остеотрепанация по Ф.Н. Зусмановичу (Зусманович Ф.Н., 1996), компактотомия по Г.А.Илизарову (Фокин А.А., 1996), поясничная симпатэктомия. (Гавриленко А.В. и др., 2001). Большинство этих операции требует специальные условия и обо-

рудование. Положительные результаты других проявляются через 1,5 - 2 месяца от момента операции, что ограничивает их клиническое применение.

Для улучшения кровообращения активно разрабатываются методы стимуляции неоангиогенеза путем введения в организм ангиогенных факторов роста (Asahara, T., et al., 1999): сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР), фактора роста фибробластов (ФРФ), тромбоцитозависимого фактора роста (ТФР), фактора роста гепатоцитов (ФРГ).

Также используется генная инженерия для введения трансформированных генов для стимуляции развития сосудов в области ишемии ((Baumgartner I. et al., 1998; Бокерия А.А., 2000; Давыденко В.В. и др., 2000; Константинов Б.А. и др., 2003).

Но все эти факторы роста в организме быстро разрушаются. Появляется необходимость повторных введений, что вызывает нежелательные эффекты: выраженную вазодилатацию с развитием гипотензии, возникновение сосудистых новообразований (гемангиома и др.), усиление тромбогенного эффекта ФРФ. Так же получение этих факторов требует большие материальные вложения. В связи с этим продолжается поиск новых факторов неоангиогенеза, ангиогенные свойства которых максимальны, а побочные эффекты сведены к минимуму. (Бузиашвили Ю. И. и др., 2000).

Во Всероссийском центре глазной и пластической хирургии (ВЦГПХ) разработана тканевая биоматериал с ангиоиндуктивными свойствами и применяется для улучшения кровоснабжения оболочек глазного яблока. Мы поставили перед собой задачу изучить не решенные проблемы лечения больных с ХОЗАНК с поражением дистального сосудистого русла и исследовать возможность применения биоматериалов при данной патологии. Данных о применении биоматериалов для лечения ХОЗАНК в литературе не обнаружено. Мы остановились на стимуляторе ангиогенеза и стимуляторе регенерации.

Цель - экспериментально обосновать возможность применения стимулятора ангиогенеза при лечении ишемических поражений нижних конечностей.

Для изучения ангиоиндуктивного эффекта инъекционной формы био-

материала Аллоплант нами проведены экспериментальные исследования.

Материал и методы. Исследования ангиоиндуктивного действия диспергированного биоматериала серии Аллоплант, проводились в лаборатории морфологии (заведующий проф. Муслимов С.А.) Всероссийского центра глазной и пластической хирургии ВЦГПХ г. Уфа. Диспергированные формы биоматериалов успешно применяются для реваскуляризирующих операций в офтальмохирургии (Кийко Ю.И., 2002).

В эксперименте изучались процессы перестройки сосудов тканевого ложа и неоангиогенез в самом трансплантате. Исследования проводились на лабораторных крысах породы Вистар примерно одного возраста и веса. Аллотрансплантат «Стимулятор ангиогенеза», приготовленный в соответствии с требованиями технических условий количестве 50 мг разводился в 1.0 мл физиологического раствора и вводился в мягкие ткани задней конечности крыс (подкожно и внутримышечно) на уровне средней части бедра по 0,5 мл. В качестве контроля использовали биоматериал Аллоплант «стимулятор регенерации», отличающийся относительно меньшим содержанием гепарансульфата и большим содержанием коллагена. В контрольной серии опытов, биоматериал вводился по аналогичной схеме. Для опытной и контрольной группы биоматериалы готовились в тканевом банке ВЦГПХ в соответствии с требованиями ТУ42-2-537-2002.

Динамику структурных изменений изучали на 1, 3, 7, 14, 30, 60, 90 и 120 сутки эксперимента. Животных выводили из опыта путем передозировки эфира. Для гистологических исследований производился забор трансплантата с окружающими тканями с последующей фиксацией в 10% растворе нейтрального формалина. Серийные гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином, а также по методу Ван-Гизона.

На гистологических препаратах проводили подсчет суммарной площади просвета капилляров на единицу площади (27,8 тысяч кв. мкм) как в ложе биоматериала, так и в самом трансплантате.

В ранние сроки (1-3 сутки) в окружающем трансплантат тканевом ложе определяется умеренная воспалительная реакция, заключающаяся в редукции

поврежденных сосудов, расширению дренажно-депонирующего звена, сохранившегося микроциркуляторного русла. Суммарный просвет капилляров возрастает к концу первых суток до $168,7+11,5$ мкм². Для сравнения приводим суммарный просвет капилляров подкожной жировой клетчатки бедра интактного животного $124,8+7,3$ мкм². Приведенная цифра указывает на умеренно выраженный реактивный процесс со стороны терминального сосудистого русла на введенный биоматериал (Рис.1).

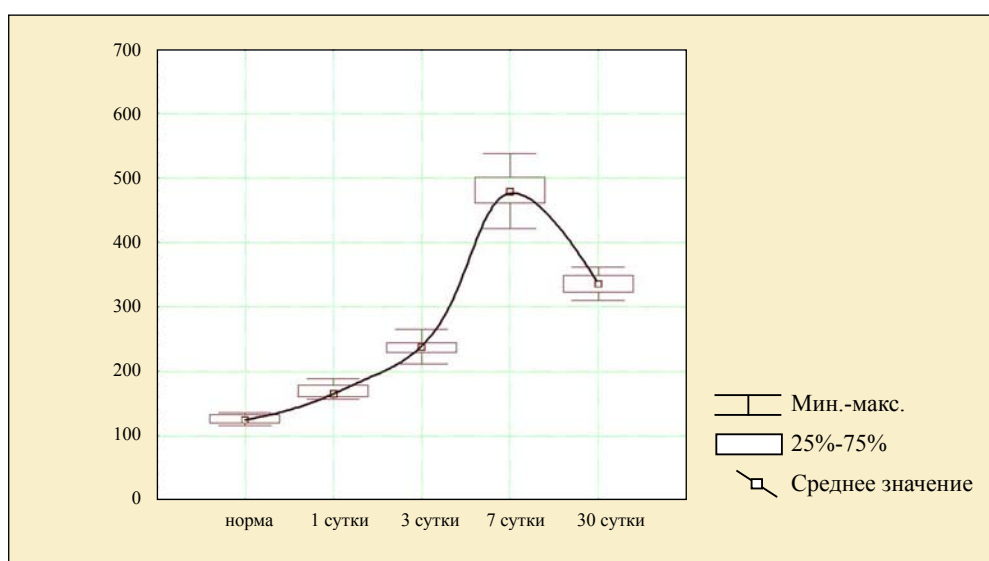


Рис. 1. Динамика изменения суммарной площади просвета капилляров в ложе трансплантата в опытной серии. По оси ординат – площадь капилляров, мкм²; по оси абсцисс – сроки эксперимента.

На третьи сутки в опытной серии суммарный просвет капилляров ложа повышается до $236,7+14,8$ мкм², что свидетельствует о дальнейшей мобилизации сосудов местного кровотока в тканях реципиента.

Одновременно происходит трансэндотелиальная миграция лейкоцитов. В контактной зоне отмечается умеренно выраженная полиморфно-клеточная инфильтрация. Между фрагментами диспергированного трансплантата определяется клеточная инфильтрация. В составе инфильтрата недифференцированные соединительнотканые клетки, макрофаги. В зоне контакта с мышечным ложем определяются мигрирующие миосателлитоциты. На третьи сутки в опытной группе по краевым зонам трансплантата появляются первые эндотели-

альные тяжи, формирующие просвет новообразованных капилляров.

В контрольной группе (Рис. 2) наблюдаются идентичные процессы клеточной инфильтрации.

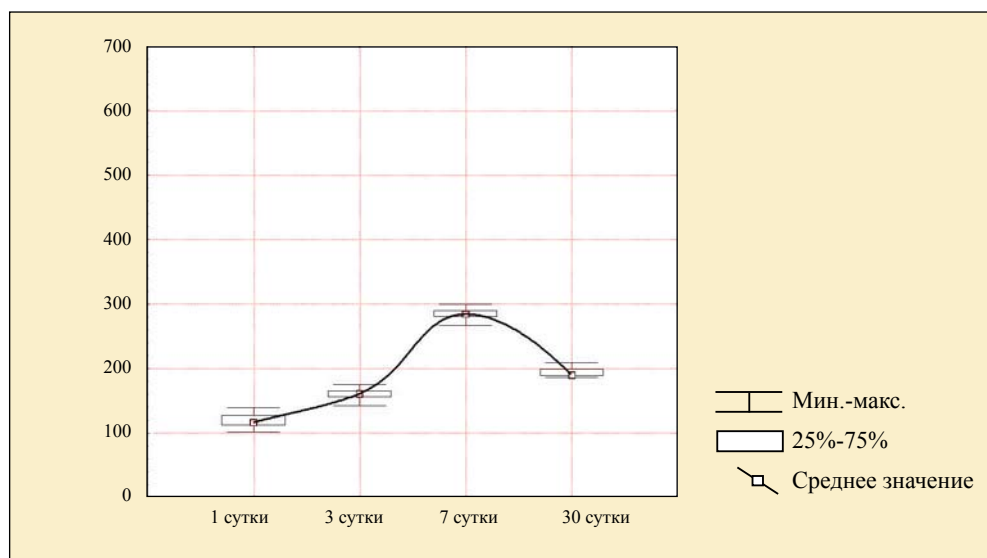


Рис. 2. Динамика изменения суммарной площади просвета капилляров в ложе трансплантата в контрольной серии. По оси ординат – площадь капилляров, мкм²; по оси абсцисс – сроки эксперимента.

Морфометрические показатели капиллярного русла тканевого ложа 162,0+7,4 мкм² в рассматриваемые сроки (1-3 суток) также практически совпадают. Представленные данные позволяют утверждать, что в первые сутки биологические процессы, развивающиеся в окружении аллотрансплантатов, реализуются на основе единых, локальных и системных механизмов.

В последующем (на 7 суток) в тканевом ложе опытной серии экспериментов сохраняются признаки воспалительной реакции в ответ на инъекцию аллогенного биоматериала «стимулятора ангиогенеза». Терминальное сосудистое русло в ложе трансплантата достигает максимальной плотности: 480,1+33,8 мкм². Наибольшего значения достигает суммарный просвет капилляров и в контрольной группе – 283,3+7,1 мкм². Однако, численное значение данного показателя при инъекции стимулятора регенерации остается достоверно ниже в сравнении с опытной группой (Рис. 1 и 2).

На 14 сутки в аллотрансплантате опытной и контрольной групп активи-

зируются процессы ангиогенеза. В этот же период начинается дифференцировка звеньев микроциркуляторного русла. Суммарный просвет сформированных капилляров в опытной группе ($202,2+10,6 \text{ мкм}^2$) превышает аналогичный показатель контрольной группы ($153,2+5,2 \text{ мкм}^2$). В описываемый срок заметно уменьшаются реактивные явления со стороны сосудистой сети тканевого ложа трансплантата, как в опытной, так и в контрольной сериях.

Существенно меняется морфологическая картина к 30 суткам эксперимента. Воспалительная реакция со стороны терминальных сосудов ложа, сменяется на активный ангиогенез в самом трансплантате. Суммарный просвет новообразованных капилляров в трансплантате в опытной серии достигает $437,6+8,2 \text{ мкм}^2$. В этот же срок в контрольной серии данный показатель достоверно ниже и составляет $243,01+4,7 \text{ мкм}^2$. Данный факт подтверждает морфометрические показатели, представленные в *Рис. 3 и 4*.

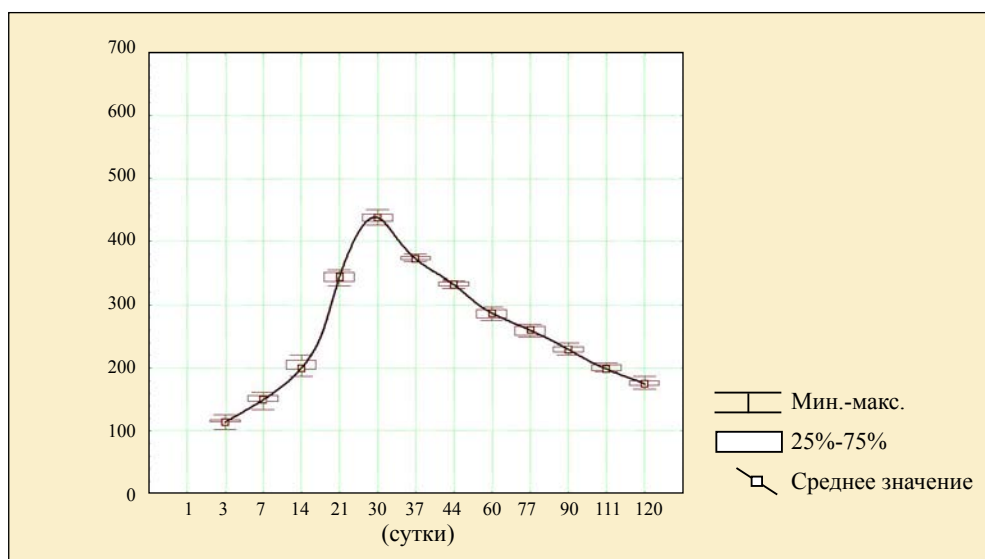


Рис. 3. Динамика изменения суммарной площади просвета капилляров в аллотрансплантате в опытной серии. По оси ординат – площадь капилляров, мкм²; по оси абсцисс – сроки эксперимента.

Процессы васкуляризации аллотрансплантатов сопровождаются с их активным замещением рыхлой волокнистой соединительной тканью. Между пучками волокон биоматериала выявляются многочисленные клетки, относящиеся к фибробластическому дифферону. В клеточном окружении дифференцируется

вновь синтезированные коллагеновые волокна и аморфный матрикс. Описанные процессы пролиферации соединительнотканых структур еще более выражены на 60 сутки.

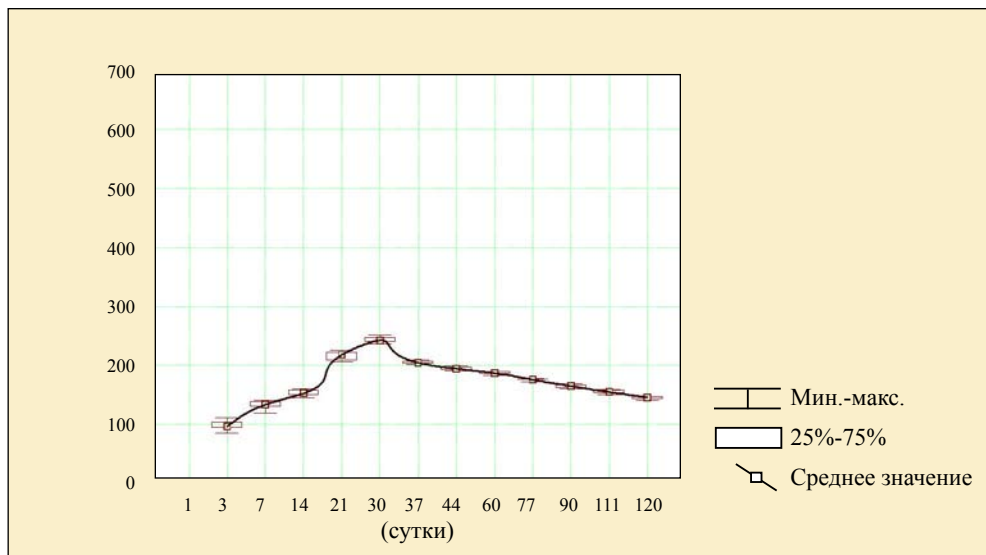


Рис. 4. Динамика изменения суммарной площади просвета капилляров в аллотрансплантате в контрольной серии. По оси ординат – площадь капилляров, мкм²; по оси абсцисс – сроки эксперимента.

Начавшаяся с 30 суток постепенная редукция сформированного сосудистого русла в аллотрансплантате продолжается во все последующие сроки эксперимента.

Так, на 90 сутки эксперимента суммарный просвет капилляров в аллотрансплантате снижается в опыте до $229,9+6,4$ мкм², а в контроле - до $164,3+2,9$ мкм² (Рис. 3 и 4). В данный срок все фрагменты биоматериала окружены капиллярной сетью.

Процессы постепенной редукции терминальных сосудов продолжают и в последующем на 120 сутки (Рис. 3 и 4).

В области аллотрансплантата «стимулятор регенерации» сформированный соединительнотканый регенерат представлен фибробластами и внеклеточным матриксом. Капиллярное русло регенерата имеет суммарный просвет $144,9+2,2$ мкм², а в основной группе – $175,8+6,8$ мкм².

Заключение. Таким образом, результаты экспериментальных исследований позволяют заключить, что сосудистые реакции в области аллотрансплантатов основной и контрольной групп протекают однотипно и имеют характерную этапность.

Введение стимулятора ангиогенеза приводит в ранние сроки к активации реактивных изменений. В первую фазу (3-7 сутки) мобилизуется сосудистое русло тканевого ложа, включаются в кровоток нефункционирующие капилляры, активизируются трансэндотелиальная миграция форменных элементов крови.

Во вторую фазу (до 30 суток) усиливается индукция ангиогенеза с активацией васкуляризации трансплантата, наиболее выраженной в биоматериале стимулятор ангиогенеза (опытная серия), содержащим в своем составе значительную фракцию гепаран-сульфата.

В последующие сроки (с 30 по 120 сутки) происходит постепенная редукция сформированного органного сосудистого русла.

Указанные процессы мобилизации органного сосудистого русла в опытной группе при применении стимулятора ангиогенеза достоверно более выраженные по сравнению с контрольной группой при применении стимулятора регенерации.

Полученные данные позволили рекомендовать данный диспергированный биоматериал для клинического применения в лечении ишемических поражений нижних конечностей.

Результаты проведенных клинических испытаний полностью подтвердили описанные выше экспериментальные данные.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.Абалмасов К.Г., Бузиашвили Ю.И., Морозов К.М. с соавт. Результаты реконструктивных операции у больных с атеросклеротическим поражением артерий дистальнее паховой складки // Анналы хирургии .- 2003.- №2.- С. 47-51.
- 2.Абалмасов К.Г., Морозов К.М., Федорович А.А. Микрохирургическая коррекция хронической критической ишемии нижних конечностей // Тез. докл. симпозиума "Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний", 17-18 октября, 2001, Москва.- С. 5.
- 3.Бокерия А.А., Еремеева М.В. Современные состояния и перспективы использования ангиогенеза в лечении ишемической болезни сердца // Грудная и сосудистая хирургия .- 2000.- №2.- С. 57 – 61.
- 4.Бузиашвили Ю. И. с соавт. // Кардиология .- 2000.- №12.- С.82-85.
- 5.Бытка П.Ф., Мельник И.З. Острая непроходимость артерий конечностей. Кишинев.: Штиинца, 1977.-116 с.
- 6.Гавриленко А.В., Скрылев С.И., Кузубова Е.А. Целесообразность выполнения не прямых реваскуляризации после неэффективных реконструктивных сосудистых операций. // Тез. докл. симпозиума "Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний", 17-18 октября 2001 г.- Москва. – С.35.
- 7.Давыденко В.В., Мачс В.М. Стимулированный ангиогенез- новое направление в лечении при ишемических состояниях // Вестник хирургии им. И.И. Грекова.- 2000 .- №1.- С.117-120.
- 8.Затевахин И.И., Говорунов Г.В., Сухарев В.И. Реконструктивная хирургия поздней реокклюзии аорты и периферических артерий. М.: Медицина, 1993.-157с.
- 9.Зусманович Ф.Н. 5-летний опыт применения реваскуляризирующей остеотрпанации при окклюзирующих заболеваниях артерий нижних конечностей. // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия.- 1994.- №5.- С.50-53.
- 10.Константинов Б.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. и соавт. Возможности и перспективы лечения критической ишемии с использованием генно-инженерных технологий. // Ангиология и сосудистая хирургия.- 2003.- №3.- С.14-17.
- 11.Покровский А.В. Основные принципы диагностики и лечения критической ишемии конечностей при тромбооблитерирующих поражениях артерий. // Хроническая критическая ишемия конечности.- Москва-Тула.1994.- С.195-196

- 12.Покровский А.В., Дан В.Н., Чупин А.В., Харазов А.Ф. Можно ли предсказать исход реконструктивной операции у больных с ишемией нижних конечностей на основании дооперационных исследований. // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2002.- N3. - С. 103-109.
- 13.Покровский А.В., Дан В.Н., Чупин А.В., Харазов А.Ф., Семенов Д.С. Артериализация венозного кровотока стопы в спасении нижней конечности при критической ишемии у больных с атеросклерозом и сахарным диабетом. // Тез. докл. симпозиума "Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний", 17-18 октября 2001 г.- Москва. - С.110.
- 14.Пулин А.Г., Малышев А.Н., Нацкеин В.О. Опыт хирургического лечения больных с поражением дистального артериального русла нижних конечностей на фоне сахарного диабета. // Тез. докл. симпозиума "Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний", 17-18 октября 2001 г.- Москва. - С.112.
- 15.Савельев В.С., Кошкин В.М. Критическая ишемия нижних конечностей.- М.Медицина.- 1997,- С.78-100.
- 16.Щедрина М.А. Результаты микрохирургической аутотрансплантации большого сальника при лечении больных с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей 3-4 степени. // Тез. докл. симпозиума "Хирургическое лечение и диагностика сосудистых заболеваний", 17-18 октября 2001 г.- Москва. - С.155.
- 17.Levin and O'Neal's. The diabetic foot. – 6th edition / edited by J. H. Bowker, M.A. Pfeifer. 2001.