

УДК 616.13-004.6:619

Т. Э. ВЛАДИМИРСКАЯ¹, И. А. ШВЕД¹, С. Н. НОВАКОВСКАЯ², С. Г. КРИВОРОТ¹

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ

¹*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь, e-mail: tan_2304@inbox.ru*

²*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: novakovskaya@tut.by*

Модель экспериментального атеросклероза с использованием холестерина вызывает атерогенные повреждения коронарных артерий крыс, выявляемые морфологическими методами через 15 сут после использования диеты. Эти изменения аналогичны изменениям на долипидной стадии, что подтверждается исследованиями на ультраструктурном уровне. Через 60 сут у крыс в коронарных артериях превалируют процессы, характерные для липоидоза. По истечении 180 сут эксперимента выявляется прогрессирование липосклеротических процессов.

Ключевые слова: экспериментальный атеросклероз, коронарные артерии, долипидная стадия, липоидоз, липосклероз, гиперплазия интимы.

T. E. VLADIMIRSKAYA¹, I. A. SHVED¹, S. A. NOVAKOVSKAYA², S. G. KRYVOROT¹

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE CORONARY ARTERIES OF RATS IN THE MODELING OF ATHEROSCLEROTIC LESIONS

¹*Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus, e-mail: tan_2304@inbox.ru*

²*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: novakovskaya@tut.by*

Atherosclerosis experimental model with atherogenic cholesterol causes damage to the coronary arteries of rats revealed morphological methods after 15 days of using the diet. These changes are similar to changes on the stage to the presence of lipids that is supported by studies at the ultrastructural level. After 60 days the rats in the coronary arteries prevail processes characteristic of the lipoidosis. After 180 days of the experiment revealed the progression liposclerotic processes.

Keywords: experimental atherosclerosis, coronary arteries, the stage to the presence of lipids, liposclerosis, intimal hyperplasia.

Введение. Для изучения механизмов атеросклероза широко используется экспериментальное воспроизведение изменений сосудов, сходных с атеросклерозом человека. Это достигается путем кормления животных пищей, богатой холестерином (ХС) или чистым раствором холестерина на растительном масле. Наиболее распространенной моделью гиперлипидемии и атеросклероза является модель создания гиперлипидемии у кроликов [1]. Оказалось, что под влиянием больших доз витамина D₂ (эргокальциферола), который обладает кумулятивными свойствами и способен усиливать отложения кальция в организме, у животных происходят выраженные изменения крупных сосудов [1]. Принципиальная схема воспроизведения атеросклеротических поражений у кроликов сводится к добавлению в их пищу холестерина. В литературе отмечается, что внутрижелудочное введение холестерина или его раствора на растительном масле уже через 3–4 недели вызывает гиперлипидемию и начальные атеросклеротические изменения в сосудах животных [2, 3]. Выраженные атеросклеротические поражения с образованием фиброзных бляшек развиваются через 3–4 мес. Для воспроизведения и изучения экспериментальных атеросклеротических изменений обычно используют мелких лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков, морских свинок, модельные линии этих же животных), которые являются наиболее удобными объектами для моделирования любого заболевания, поскольку можно одновременно ставить опыты на большой популяции [4]. Формирование атеросклеротических поражений у чело-

века представляет собой стадийный процесс: в соответствии с морфогенезом атеросклероза выделяются следующие стадии – липоидоз, липосклероз, атероматоз [5, 6]. Морфология стадий экспериментального атеросклероза на животных в динамике изучена недостаточно, что создает препятствия для разработки новых подходов к профилактике и лечению атеросклероза и экстраполяции полученных в эксперименте результатов на клинические исследования.

Цель исследования – изучение микроскопических изменений в коронарных артериях крыс в различные сроки экспериментального атеросклероза.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на 40 нелинейных белых крысах с учетом требований и рекомендаций нормативных, научно-методических и справочных материалов [7].

Для формирования атеросклеротических повреждений у крыс отбирали активных особей с гладким, блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающих корм. Из общей партии отобранных крыс формировали 4 равноценные группы: контрольная группа включала интактных животных, получавших стандартный рацион; животные трех опытных групп дополнительно к стандартному рациону в течение 15, 60 и 180 сут получали атерогенную гиперхолестериновую диету [8]: 95 %-ный высокоочищенный холестерин, 0,0625 %-ный масляный раствор эргокальциферола (витамин D₂) и перетопленный при 60 °С свиной жир из расчета 1 мг на 100 г массы животного.

По истечении срока эксперимента животных (опытных и контрольных) выводили из опыта с помощью наркоза, используя смесь 1 мл 0,005 %-ного раствора фентанила и 2 мл 0,25 %-ного раствора дроперидола (в соответствии со стандартами GLP).

Фрагменты участков сосудов фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине в течение 24 ч, обезживали и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3,5–4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Массону, суданом черным на липиды. В каждом исследуемом случае использовали обзорную микроскопию, с помощью которой оценивали общий характер строения стенки сосудов, состояние эндотелиальной выстилки, наличие патологических изменений в сосудах.

Для проведения электронно-микроскопического метода исследования фрагменты коронарных артерий фиксировали в растворе, состоявшем из 3 %-ного глутарового альдегида и 1 %-ного параформа, после чего материал измельчали и обрабатывали 2 %-ным раствором OsO₄ (четырёхокси осмия). После промывания 0,1 М фосфатным буфером материал обезживали в спиртах возрастающей крепости и заключали в аралдит по общепринятой методике. Материал выдерживали в термостате при 56 °С до полной полимеризации аралдита, а затем анализировали под электронным микроскопом.

Результаты и их обсуждение. *Гистологическое исследование микропрепаратов коронарных артерий крыс.* В мелких ветвях коронарных артерий интактных крыс внутренняя эластическая мембрана не визуализируется, в более крупных сосудах – выражена. Эндотелиальные клетки расположены на эластической мембране, относительно крупные, овальной формы (рис. 1, а). Гладкомышечные клетки (ГМК) медики крупные, спирально расположенные, с диффузно распределенным хроматином ядра. Эластические волокна медики немногочисленные, между ними – единичные фибробласты. Наружная граница средней оболочки представлена наружной эластической мембраной. Адвентиция коронарной артерии содержит большое количество эластических волокон, несколько меньшее – коллагеновых, vasa vasorum. При исследовании микропрепаратов коронарных артерий крыс, получавших холестерин на протяжении 15 сут, отмечались морфологические изменения как в интиме, так и в средней оболочке сосуда. Изменения выражались в усиленной десквамации эндотелиальных клеток (ЭК), набухании ЭК, вакуолизации цитоплазмы отдельных ЭК, проникновении эритроцитов через эндотелиальный барьер, очаговой гиперплазии интимы, усилении миграции ГМК в интиму и субинтимальное пространство (рис. 1, б). Отмечалась липидная инфильтрация клеток интимы. В микропрепаратах ветвей коронарных артерий всех калибров через 60 сут использования диеты у крыс отмечались изменения эндотелиальной выстилки сосудов: десквамация ЭК в просвет сосуда, их уплощение, гиперхромия или набухание. Визуализировались скопления клеток с пенистой цитоплазмой и эксцентричным ядром во внут-

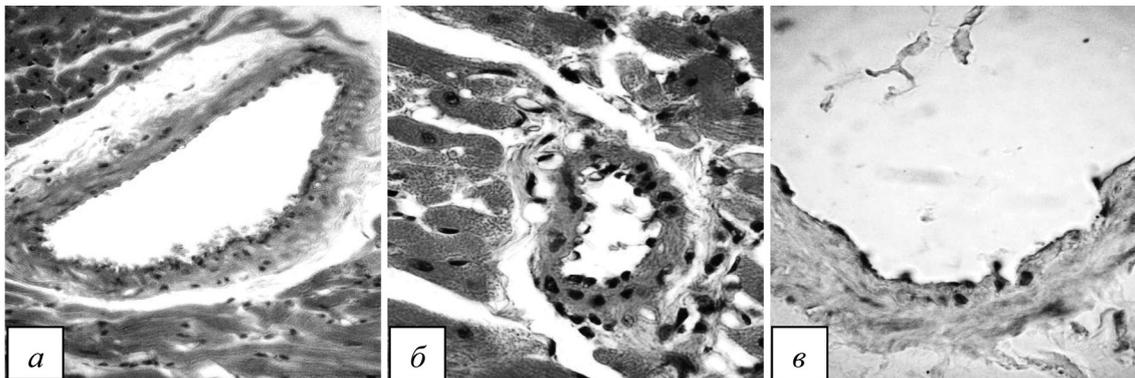


Рис. 1. Микроскопические изменения в коронарной артерии крыс при моделировании атеросклеротических повреждений: *а* – коронарная артерия интактной крысы; *б* – набухание, вакуолизация и десквамация ЭК интимы; *в* – очаговая гиперплазия интимы

ренной части меди и наружной части интимы. Часто отмечались дегенеративные изменения в ГМК субинтимального слоя и меди. Такие ГМК имели вакуолизированную оксифильную цитоплазму, набухшие ядра, часто гиперхромные. ГМК чаще встречались вблизи внутренней эластической мембраны коронарных артерий. В адвентиции наблюдались тромбы в сосудах, отек и разволокнение соединительной ткани. В некоторых случаях имело место выраженная пролиферация ГМК и фибробластов. В эпикардиальных сосудах выявлялись признаки формирования претромбов (перекрещивающиеся волокна фибрина, сепарация плазмы), наблюдались выраженная метахромазия и разволокнение эластических волокон.

При исследовании микропрепаратов коронарных артерий крыс, получавших атерогенную диету на протяжении 180 сут, отмечались морфологические изменения в интима и меди артерии. Наблюдалось набухание или сморщивание ЭК, гиперхромия их ядер. Визуализировались скопления клеток или одиночные клетки с оптически пустой цитоплазмой в субинтима и меди. В мелких и средних ветвях коронарных артерий – гиперплазия интимы (рис. 1, *в*). Отмечалось усиление миграции ГМК в интиму и субинтимальное пространство. У самок в мелких и средних артериях наблюдалось формирование мелких клеточно-волоконистых бляшек, у самцов чаще встречались гиперплазия интимы и изменения в ГМК – выраженная конденсация и маргинация хроматина. При окраске на липиды суданом черным наблюдались скопления суданофильных гранул и капель под внутренней эластической мембраной. При окраске трихромом отмечались метахромазия, разволокнение, набухание и лизис коллагеновых и эластических волокон.

Таким образом, через 15 сут использования атерогенной диеты у крыс появлялись микроскопические изменения коронарных артерий. Наблюдалась очаговая гиперплазия интимы и дегенеративные изменения в ЭК, заключающиеся в набухании ЭК, гиперхромии их ядер, маргинации и конденсации хроматина в них. Отмечались кариопикноз и кариорексис – признаки, характерные для апоптотической дегенерации ядер. Повышенная миграция ГМК меди в интиму и концентрация макрофагов с липидными включениями в цитоплазме в субинтимальном пространстве способствовали гиперплазии интимы. У самок и самцов изменения были однотипными, однако наиболее выраженными эти изменения были у самок.

Через 60 и 180 сут использования диеты повреждение интимы усиливалось. Сохранялись и усиливались дегенеративные изменения ЭК (кариопикноз, кариорексис, плазморексис, вакуолизация и неоднородность цитоплазмы, маргинация и конденсация хроматина). У самок отмечалось формирование клеточно-волоконистых бляшек на интимальной поверхности. У большинства самцов превалировали изменения в виде гиперплазии интимы (или формирование неоинтимы). При окраске гематоксилином и эозином в цитоплазме ЭК и ГМК интимы и субэндотелиального пространства визуализировались оксифильные включения и оптически пустые вакуоли. Окраска на липиды показала наличие жира в цитоплазме ЭК и ГМК.

Ультраструктурный анализ стенки коронарной артерии крыс. Электронно-микроскопические исследования показали, что через 15 сут эксперимента в стенке коронарных артерий проис-

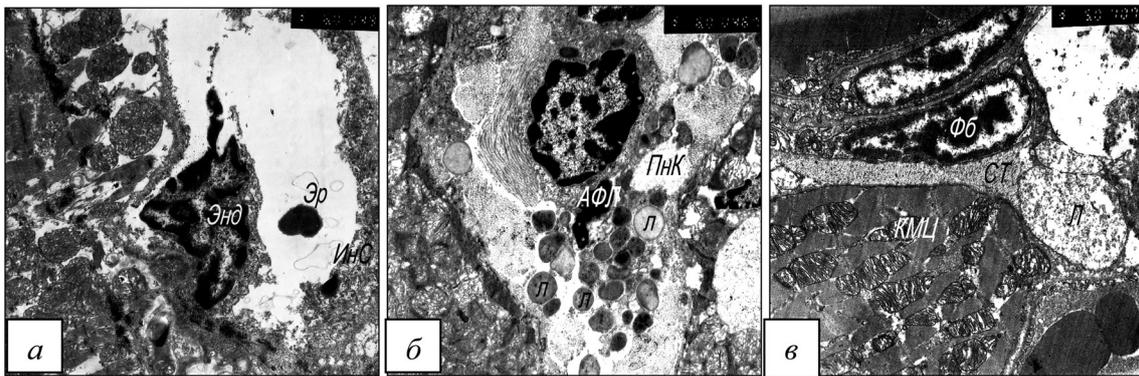


Рис. 2. Ультраструктурные изменения в интима коронарных артерий крыс при моделировании атеросклеротических повреждений: *а* – нарушение целостности эндотелиальной выстилки и базальной мембраны сосудов, долипидная стадия ($\times 6000$); *б* – пенистая клетка с электронноплотными включениями – аутофаголизосомой и лизосомами, стадия липоидоза ($\times 6000$); *в* – разрушение эластических мембран интимы, разрастание соединительной ткани, пролиферация фибробластов в интерстициальном пространстве, стадия липосклероза ($\times 5000$). Энд – эндотелиоцит, Эр – эритроцит, АФЛ – аутофаголизосома, ПнК – пенистая клетка, Л – лизосома, Эр – эритроцит, Энд – эндотелиоцит, КМЦ – кардиомиоцит, Фб – фибробласт, Л – липидные капли или липидные скопления

ходят изменения, характерные для атеросклероза в долипидной стадии и в стадии липоидоза. Отмечалась гиперплазия внутреннего слоя стенки коронарных артерий за счет его набухания и отека, вызванных пропотеванием в его толщу крупномолекулярных белков плазмы, модифицированных липопротеинов. Нарушалась целостность эндотелиальной выстилки и базальной мембраны сосудов, что проявлялось соответственно образованием выраженных очагов деструкции и пропотеванием эритроцитов в интиму (рис. 2, *а*). Отмечалась десквамация клеток эндотелия в просвет сосуда с формированием оголенных участков базальной мембраны. Структурные преобразования претерпевали ЭК – отмечались складчатость кариолеммы, перераспределение гетерохроматина в ядре (конденсация его в виде объемных скоплений у внутренней ядерной оболочки и в центре), что свидетельствует об угнетении синтетической функции ядра и начавшемся апоптотическом процессе. Наблюдалось расширение зоны перикапиллярного отека и распространение его на сердечные миоциты. Наряду со структурными перестройками, характерными для долипидной стадии, в стенке коронарных артерий имели место изменения ультраструктуры интимы, свойственные для стадии липоидоза. Активировались клетки макрофаги (пенистые клетки) в интерстициальном пространстве кардиомиоцитов, которые мигрировали к сосудистой стенке и поглощали разрушенные фрагменты клеток эндотелия, образуя в цитоплазме электронноплотные включения – аутофаголизосомы, а также накапливали липиды, концентрирующиеся в лизосомах (рис. 2, *б*).

Через 60 сут приема атерогенной диеты в коронарных артериях крыс происходили изменения, характерные для стадий липоидоза и липосклероза. Процесс накопления липидных капель в интима сосудов продолжался. Отмечались набухание и разрушение внутренней эластической мембраны интимы, инфильтрация подэндотелиального слоя липидами плазмы крови и отложение крупных липидных капель в периваскулярном пространстве, а также в интерстиции между кардиомиоцитами. Продолжался процесс тромбообразования – тромбы полностью закупоривали просвет сосудов микроциркуляторного русла коронарной артерии, сдавливая эндотелиоциты. Вокруг сосудистой стенки выявлялись объемные липидные включения. Разрастание соединительной ткани среди объемных липидных отложений в интерстиции, наличие зон распада, состоящих из разрушенных малодифференцированных миоинтимальных клеток и эластических мембран интимы, пролиферация фибробластов свидетельствовали о начавшейся в коронарных артериях стадии липосклероза (рис. 2, *в*).

По истечении 180 сут эксперимента отмечалось дальнейшее прогрессирование липосклеротических процессов в интима стенки коронарных артерий. В бассейне микроциркуляторного русла коронарных артерий имело место накопление липидных отложений. В капиллярах отмечались стаз эритроцитов, вакуолизация эндотелия сосуда, а также частичная или полная десква-

мация эндотелия с разрушением сосудистой стенки. Часть эндотелиоцитов подвержена апоптотическим изменениям. Наблюдались деформация и уплотнение их ядер, вакуолизация цитоплазмы и перикапиллярного пространства. Вокруг апоптотически измененных эндотелиоцитов выявлялись крупные липидные отложения.

Электронно-микроскопические исследования коронарных артерий экспериментальных животных, получавших в течение 15, 60 и 180 сут холестериную диету, показали развитие в интимальном слое стенки коронарных артерий структурных изменений, характерных для стадий атеросклероза – долипидной, липоидоза, липосклероза. Выявлена миграция и активация макрофагов в интиму коронарной артерии, поглощение ими липидов и разрушение пенистых клеток с выходом липидов во внеклеточное пространство. Через 15 сут эксперимента определялись ультраструктурные изменения ЭК, выразившиеся в маргинации и конденсации хроматина по типу апоптотического. По мере увеличения сроков эксперимента апоптотические изменения ЭК распространялись и усиливались.

Заключение. Модель экспериментального атеросклероза с использованием холестерина вызывает атерогенные повреждения коронарных артерий крыс, выявляемые морфологическими методами через 15 сут использования диеты. Эти изменения аналогичны изменениям на долипидной стадии, что подтверждается исследованиями на ультраструктурном уровне. При световой микроскопии микропрепаратов коронарных артерий визуализируются редкие участки гиперплазированной интимы, единичные пенистые клетки. Через 60 сут у крыс в коронарных артериях преобладают процессы, характерные для липоидоза: жировая инфильтрация интимы, гиперплазия интимы, пролиферация ГМК, накопление внутриклеточного и внеклеточного жира. По истечении 180 сут эксперимента выявляется прогрессирование липосклеротических процессов: формирование клеточно-волоконистых бляшек, пролиферация фибробластов.

Список использованной литературы

1. Методические указания по изучению гипополипидемического и антисклеротического действия фармакологических веществ: руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – С. 452–461.
2. Аничков, Н. П. Экспериментальные исследования по атеросклерозу / Н. П. Аничков // Частная патологическая анатомия / Л. И. Абрикосов. – 1947. – Т. 2. – С. 378.
3. Реконструкция сосудистой стенки при атерогенезе с помощью хитозановых биополимеров / И. Н. Большаков [и др.] // Фунд. исслед. – 2009. – № 7. – С. 42–43.
4. Клинико-экспериментальное исследование противоишемической и гипополипидемической активности мексикора / Л. Н. Сернов [и др.] // Клини. исслед. лекарств. средств в России. – 2004. – № 1. – С. 24–28.
5. Струков, А. И. Атеросклероз / А. И. Струков, В. В. Серов // Патологическая анатомия: учебник / А. И. Струков, В. В. Серов. – 4-е изд. – М., Медицина, 1995. – С. 268–289.
6. Пальцев, М. А. Атеросклероз и артериосклероз / М. А. Пальцев, Н. М. Аничков // Патолог. анатомия / М. А. Пальцев, Н. М. Аничков. – М.: Медицина. – 2001. – Т. 2 (Ч. 1). – С. 16–91.
7. Денисов, С. Д. Требования к научному эксперименту использованием животных / С. Д. Денисов, Т. С. Морозкина // Здоровоохранение. – 2001. – № 4. – С. 40–42.
8. Drew, A. F. Animal models of diet-induced atherosclerosis / A. F. Drew // Meth. Mol. Med. – 2001. – Vol. 52. – P. 1–6.

Поступила в редакцию 03.08.2015