

Модель формування контрольованої ішемії нижньої кінцівки у кроля



Н. Ю. Літвінова, В. А. Черняк, Д. Є. Дубенко

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

Мета роботи — розробити анатомічно обґрунтовану модель хронічної контрольованої ішемії нижньої кінцівки (ІНК) у кроля, яка не призводить до гострого артеріального недокрів'я в лабораторній тварини, не збільшує ранню післяопераційну летальність і дає змогу експериментально відтворити на лабораторних тваринах хронічну ІНК ранніх стадій.

Матеріали і методи. Прооперовано 4 кролів породи шиншила. Через 4 тижні оцінювали стан нижньої кінцівки та загальний стан тварини за такими критеріями: відстань, подолана під час одномоментного пробігу, тривалість сну, щадіння прооперованої кінцівки під час ходіння й бігу, результати дослідження мікроциркуляції методом лазерної флоуметрії, дані гістологічного дослідження.

Результати та обговорення. Відстань одномоментного пробігу серед прооперованих кролів становила $(6,1 \pm 0,4)$ м (звуження 1/3 просвіту) і $(1,9 \pm 0,2)$ м (звуження 1/2 просвіту), відзначено зниження температури прооперованої кінцівки до $(34,6 \pm 1,1)$ °С (звуження 1/3 просвіту) і $(33,7 \pm 1,4)$ °С (звуження 1/2 просвіту). У прооперованих кролів зменшилася тривалість добового сну — до $(7,5 \pm 0,2)$ год (звуження 1/3 просвіту) і до $(6,9 \pm 0,5)$ год (звуження 1/2 просвіту). За даними лазерної флоуметрії, у всіх прооперованих кролів відзначали зниження показників мікроциркуляції в прооперованій кінцівці на 20–40% ($p < 0,05$). Більшість моделей формування ІНК у кроля ґрунтуються на розвитку колатеральних судин між басейнами зовнішньої і внутрішньої клубової артерії. Проте такий підхід неоптимальний.

Висновки. Розроблена нами модель формування ІНК спричиняє ішемічні зміни змін у задній кінцівці кроля, що відповідають ІНК III–IV стадії за класифікацією Фонтейна. Запропонована модель формування контрольованої ІНК у кроля анатомічно обґрунтована, не викликає гострої ішемії прооперованої кінцівки, не призводить до розвитку гнійно-септичних ускладнень з боку рани через одномоментність втручання та первинне закриття операційної рани.

Ключові слова: контрольована ішемія нижньої кінцівки у кроля, хронічна критична ішемія нижньої кінцівки, атеросклероз, захворювання периферичних артерій.

Сьогодні захворювання периферичних артерій (ЗПА) належить до важливих медико-соціальних проблем, адже ця нозологія призводить до інвалідизації та підвищення рівня смертності населення, зокрема працездатного. Збільшення рівня захворюваності в Україні і світі та недостатня ефективність сучасних видів лікування (хірургічні втручання, що відновлюють прохідність артеріальних судин, або створення обхідних шунтів) зумовлюють потребу в подальших дослідженнях і розробці нових видів терапії ЗПА [4, 7].

Обґрунтування дослідження

Невід'ємна частина будь-якого експериментального дослідження — робота з лабораторними тваринами. У випадку ЗПА надзвичайно важливий аспект — це хірургічне формування моделі ішемії нижньої кінцівки (ІНК). Сьогодні існує багато відповідних методик, проте більшість із них описують формування ішемії в лабораторних мишей, тимчасом як останні не належать до ідеальних тварин для моделювання ЗПА, тому що інструментальна й гістологічна оцінка ступеня недостатності кровообігу в них викликає деякі складнощі. Зручніше та більш науково обґрунтовано для подібних досліджень використовувати кролів (певних порід) або собак. Звичайно, експеримент на більших за розмірами лабораторних тваринах економічно витратніший, проте збір та обробка отриманої інформації більшою мірою задовольняють мету дослідження.

Стаття надійшла до редакції 16 жовтня 2016 р.

Літвінова Наталя Юріївна, к. мед. н., декан медичного факультету № 2, доцент кафедри хірургії № 4
01601, м. Київ, вул. Шовковична, 39/1. Тел. (44) 255-15-60

© Н. Ю. Літвінова, В. А. Черняк, Д. Є. Дубенко, 2016

Серед відомих сьогодні методик формування ІНК у лабораторних кролів переважають моделі гострої ішемії або хронічної критичної ішемії нижньої кінцівки (КІНК) (III–IV стадії за класифікацією Фонтейна), яких досягають лігуванням зовнішньої клубової артерії (ЗКА) або її гілок, стегнової артерії (СА) або глибокої стегнової артерії (ГСА). Проте ці способи мають низку недоліків: по-перше, моделювання критичної ІНК у кролів асоціюється з їх високою ранньою післяопераційною летальністю. По-друге, КІНК у кроля значно ускладнює післяопераційний догляд за твариною й потребує додаткових витрат на медикаменти. По-третє, ІНК, якої штучно досягають повним хірургічним перекриттям просвіту магістральної артеріальної судини (ЗКА, СА, ГСА), унеможливує створення моделі хронічної ІНК I–II стадії за класифікацією Фонтейна [5].

Серед наявних моделей, що не призводять до повного перекриття просвіту артеріальних судин, такі: уведення розчинів у м'язово-фасціальні футляри, що створює тиск на анатомічно пов'язані з ними нервово-судинні пучки; метод дозованого звуження артерії шляхом поступового стягування турнікета. Останній метод дає змогу контролювати рівень звуження судини за допомогою шкали лінійки, але має істотний недолік: наявність незакритої операційної рани збільшує кількість гнійно-септичних ускладнень у лабораторних тварин і вимагає підвищення доз антибіотиків, які вводять тваринам у післяопераційний період. У більшості випадків кролі негативно переносять антибіотикотерапію (розвивається антибіотик-асоційована діарея). Анатомічна близькість анального отвору до післяопераційної рани та діарейний синдром призводять до постійного її забруднення каловими масами і, як наслідок, ранових післяопераційних ускладнень [8, 10].

Анатомічне обґрунтування

Більшість моделей формування ІНК у кроля ґрунтуються на розвитку колатеральних артерій між басейнами ЗКА та внутрішньої клубової артерії. Проте цей підхід не оптимальний, тому що тазова кінцівка кроля — надзвичайно розвинена анатомічна ділянка з високим рівнем васкуляризації м'язової тканини (це пояснюється провідною роллю задніх лап під час бігу та спокійного пересування тварини). Після оперативного втручання з лігуванням магістральних судин і створенням КІНК кроль, у якого ішемія виявляється перш за все сильними й нестандартними больовими відчуттями, починає щадити уражену кінцівку й намагається не використовувати її для пересування, тимчасом як розвиток колатерального кровообігу стимулюється намаганням компенсувати втрачену функцію кінцівки, тобто м'язовою роботою. Якщо ж кроль уникає ставати на кінцівку

з ІНК, ішемія не посилюється роботою м'язової тканини і колатеральний кровообіг розвивається значно повільніше [6, 9].

Для моделювання ІНК у кроля недоцільно застосовувати моделі формування ІНК, описані на лабораторних мишах, адже артеріальне кровопостачання тазової кінцівки кроля має деякі особливості, що відрізняють їх від інших лабораторних тварин. Загалом анатомічна картина кровопостачання тазової кінцівки кроля відповідає кровопостачанню у ссавців (зокрема в людини), окрім деяких деталей. Колатералі між гілками СА (басейн ЗКА) і гілками внутрішньої клубової артерії не розвинені, як, наприклад, у мишей. У кролів важлива артерія тазової кінцівки — велика підшкірна артерія (ВПА), яка є гілкою СА до переходу її в підколінну артерію. Вона відповідає за васкуляризацію задньої групи м'язів стегна і, спускаючись нижче від колінного суглоба, розгалужується на пальцеві артерії. ВПА компенсує слабкий розвиток задньої великогомілкової артерії і майже не має колатеральних зв'язків з глибокою стегною артерією та іншими гілками СА. Тому повне перекриття просвіту артерії вище від місця відгалуження ВПА призводить до КІНК та робить неможливим моделювання хронічної ІНК початкових стадій [1–3].

Мета роботи — розробити анатомічно обґрунтовану модель хронічної контрольованої ішемії нижньої кінцівки у кроля, яка не призводить до гострого артеріального недокрив'я в лабораторній тварині, не збільшує ранню післяопераційну летальність і дає змогу експериментально відтворити на лабораторних тваринах хронічну ішемію нижньої кінцівки ранніх стадій.

Матеріали і методи

Прооперовано чотирьох кролів породи шиншила (основна група), четверо кролів, у яких не виконували оперативні втручання, увійшли в групу контролю. Маса тіла піддослідних тварин становила в середньому ($3,0 \pm 0,7$) кг, вік — (17 ± 4) місяці. Тварини перебували на звичайному лабораторному раціоні за кімнатної температури.

Оперативні втручання виконували із загальною анестезією згідно із Настановами з догляду та використання лабораторних тварин. Для наркозу використовували ксилазин (10 мг/кг внутрішньом'язово) та кетамін (70 мг/кг внутрішньом'язово). Премедикацію здійснювали введенням дифенгідраміну та метамізолу натрієвої солі (10 мг/кг внутрішньом'язово). В умовах асептики та антисептики, попередньо звільнивши від шерсті ділянку оперативного втручання депіляційним кремом, на медіальній поверхні стегна, на 1 см нижче пахової зв'язки, виконували розріз довжиною 4 см. Довжина розрізу була зумовлена необхідністю виконання тупої дисекції присередньої групи

Т а б л и ц я

Критерії оцінки ступеня ІНК у піддослідних тварин

Показник	Контрольна група (n = 4)	Основна група (n = 4)	
		Звуження 1/3 просвіту (n = 2)	Звуження 1/2 просвіту (n = 2)
Відстань, подолана під час одномоментного пробігу, м	12,9 ± 2,6	6,1 ± 0,4 ***	1,9 ± 0,2***
Температура шкіри ураженої кінцівки, °С	35,8 ± 0,5	34,6 ± 1,1*	33,7 ± 1,4**
Тривалість сну, год	9,3 ± 2,1	7,5 ± 0,2**	6,9 ± 0,5***
Середній діаметр м'язових волокон, ум. од.	217,4 ± 1,5	Дослідження не проводили	129,4 ± 3,1*
Середній діаметр капілярів, ум. од.	53,8 ± 0,7	Дослідження не проводили	37,4 ± 2,5*

Різниця щодо контрольної групи статистично значуща: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

м'язів стегна на всій їх довжині. Після тупої дисекції присередньої групи м'язів стегна отримували доступ до СА. Вище від місця відгалуження ВПА виконували звуження діаметра СА лігатурним способом (пролен 5/0) на 1/3 (два кролі) та на 1/2 (два кролі). Контроль ступеня стенозу виконували за допомогою шкали-лінійки (патент України UA 9190. 7 G 09B23/28). Після завершення судинного етапу операції видаляли ділянку (1,0 × 0,5 см) медіального м'яза стегна для гістологічного дослідження. Рану зашивали наглухо (шовк 4/0) безперервним швом. На рану накладали щільну асептичну пов'язку, додатково закріплену для запобігання механічному пошкодженню кроля в післяопераційний період. Через 2 години після операції вводили анальгін (10 мг/кг внутрішньом'язово). У двох кролів ми застосували антибіотикопротекцію шляхом уведення цефтріаксону (50 мг/кг внутрішньом'язово один раз на добу протягом 3 діб), у решти двох кролів антибіотикопротекція не знадобилася.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програм SPSS Statistics та Excel.

Результати

Ступінь ІНК у кроля ми оцінювали через 4 тиж після проведеного оперативного втручання за такими критеріями: відстань, подолана під час одномоментного пробігу, тривалість сну, щадіння прооперованої кінцівки під час ходіння і бігу, результати дослідження мікроциркуляції методом лазерної флоуметрії (апарат «ЛАКК-02»), дані гістологічного дослідження (наявність і вираженість склеротичних змін, поява сполучної тканини в препараті, середній діаметр м'язових волокон, середній діаметр капілярів).

Відстань одномоментного пробігу визначалася пробігом кролика до появи болю в задній кінцівці (стимуляція — сильний слуховий подразник на відкритій місцевості), показником чого слугувало щадіння кінцівки під час бігу, скиглення і покусу-

вання ішемізованої кінцівки. Відстань, подолана за одномоментний пробіг, у тварин групи контролю становила (12,9 ± 2,6) м, у прооперованих кролів — (6,1 ± 0,4) м (звуження 1/3 просвіту) і (1,9 ± 0,2) м (звуження 1/2 просвіту). У прооперованих тварин температура прооперованої кінцівки була знижена, а тривалість добового сну зменшилася. Вимірювання температури проводили безконтактним термометром Dr.Frei MI-100 кожного дня, двічі, в трьох встановлених точках на стегні. Встановлення критеріїв тривалості добового сну здійснювали на підставі тривалого передопераційного спостереження за кролями, вивчення поведінкових реакцій, встановлення систематизованого добового раціону харчування, та вивчення чергування періодів спокою — активності тварин в лабораторних умовах. Під час гістологічного дослідження біопсійного матеріалу, взятого через 4 тижні після оперативного втручання, встановлено різке збіднення капілярного малюнка в м'язовій тканині, зменшення середнього діаметра м'язових волокон та середнього діаметра капілярів у кролів зі звуженням 1/2 просвіту артерії. За даними лазерної флоуметрії (встановлення шкірних датчиків на звільнену від шерстяного покриву ділянку стегна у трьох точках, що відповідають групам м'язів, розділених за анатомо-функціональним принципом), у всіх прооперованих тварин показники мікроциркуляції прооперованої кінцівки знизилися на 20—40% (таблиця).

У кролів, у яких не вдавалися до антибіотикопротекції в післяопераційний період, гнійно-септичних ускладнень у ділянці оперативного втручання не було. Загальний стан цих тварин не відрізнявся від тих, у яких застосовували антибіотикопротекцію. Водночас кролі, які отримували антибіотики, протягом 4 діб мали діарейний синдром.

Висновки

Для моделювання ішемії нижньої кінцівки у кроля раніше описані способи, випробувані на лабораторних мишах, неефективні через низку

анатомічних особливостей васкуляризації тазової кінцівки.

Відомі моделі створення експериментальної ішемії нижньої кінцівки у кроля, засновані на повному перекритті просвіту магістральних артеріальних судин, стають причиною різкого підвищення ранньої післяопераційної летальності тварин і не дають змоги створити ефективну контрольовану модель ішемії тазової кінцівки ранніх стадій.

Запропонована нами модель формування контрольованої ішемії нижньої кінцівки у кроля анатомічно обґрунтована, не викликає гострої ішемії прооперованої кінцівки, не призводить до збільшення кількості гнійно-септичних ускладнень

з боку рани через одномоментність втручання та первинне закриття операційної рани.

Ступінь зменшення просвіту артерії дає змогу досягти у кроля ішемії нижньої кінцівки, що відповідає хронічній критичній ішемії нижньої кінцівки II–IV ступеня.

Під час виконання оперативних втручань на кінцівках кролів у разі дотримання правил асептики й антисептики та інтраопераційного використання достатньої кількості дезінфікаційних розчинів рання післяопераційна антибіотикопрофілактика (цефалоспорины III покоління) не виправдана, тому що вона зумовлює виникнення у кролів діарейного синдрому й не впливає на кількість гнійно-септичних ускладнень.

Конфлікт інтересів немає.

Участь авторів: концепція й дизайн дослідження — Н. Л., В. Ч.; збір та обробка матеріалу — Д. Д., В. Ч.; написання тексту — Д. Д., Н. Л.; редактування — Н. Л.

Література

- Гиндзе Б. К. Атлас анатомии животных // Селхозгиз. — 1937. — С. 386–389.
- Дзержинский Ф. Я. Сравнительная анатомия позвоночных // АспектПресс. — 2005. — С. 27–35.
- Жеденов В. Н. Анатомия кролика // Советская наука. — 1987. — С. 188–196.
- Зербіно Д. Д., Соломенчук Т. М., Скибчик В. А. Атеросклероз як одна з форм артеріосклерозу: дискусійні питання // Серце і судини. — 2001. — № 1. — Р. 101–106
- Hershey J. C., Baskin E. P., Glass J. D. et al. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis // Cardiovasc. Res. — 2001. — 49. — Р. 618–625.
- Lee S. Y., Lee S., Lee J. et al. Non-invasive stem cell tracking in hind-limb ischemia animal model using bio-orthogonal copper-free click chemistry // Biochem. Biophys. Res. Com. — 2016. — 28. — Р. 5–7.
- Niiyama H., Huang N. F., Rollins M. D., Cooke J. P. Murine model of hindlimb ischemia // Vis. Exp. — 2009. — 23. — Р. 1035.
- Pu L. Q., Jackson S., Lachapelle K. J. et al. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit // J. Invest. Surg. — 1994. — 7 (1). — Р. 49–60.
- Vincent K. A., Shyu K.-G., Luo Y. et al. Angiogenesis Is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 α /VP16 Hybrid Transcription Factor // Circulation. — 2000. — 102. — Р. 2255–2261.
- Xiang Q., Hong D., Liao Y. et al. Overexpression of Gremlin1 in Mesenchymal Stem Cells Improves Hindlimb Ischemia in Mice by Enhancing Cell Survival // J. Cell. Physiol. — 2016. — Aug; 31. — P. 12–15.

Модель формирования контролируемой ишемии нижней конечности у кролика

Н. Ю. Литвинова, В. А. Черняк, Д. Е. Дубенко

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев

Цель работы — разработать анатомически обоснованную модель хронической контролируемой ишемии нижней конечности (ИНК) у кролика, которая не приводит к острому артериальному малокровию у лабораторного животного, не увеличивает раннюю послеоперационную летальность и дает возможность экспериментально воссоздать на лабораторных животных хроническую ИНК ранних стадий.

Материалы и методы. Прооперированы 4 кролика породы шиншилла. Через 4 недели оценивали состояние нижней конечности и общее состояние животного по следующим критериям: расстояние одномоментного пробега, продолжительность сна, шажение прооперированной конечности при ходьбе и беге, результаты исследования микроциркуляции методом лазерной флоуметрии, данные гистологического исследования.

Результаты и обсуждение. Расстояние одномоментного пробега среди прооперированных кроликов составило ($6,1 \pm 0,4$) м (сужение 1/3 просвета) и ($1,9 \pm 0,2$) м (сужение 1/2 просвета), отмечено снижение температуры прооперированной конечности до ($34,6 \pm 1,1$) °С (сужение 1/3 просвета) и до ($33,7 \pm 1,4$) °С (сужение 1–2 просвета). У прооперированных кроликов уменьшилась продолжительность суточного сна до ($7,5 \pm 0,2$) ч (сужение 1/3 просвета) и до ($6,9 \pm 0,5$) ч (сужение 1/2 просвета). По данным лазерной флоуметрии, у всех прооперированных кроликов отмечали снижение показателей микроциркуляции в прооперированной конечности на 20–40% ($p < 0,05$). Большинство моделей формирования ИНК у кролика основываются на развитии коллатеральных сосудов между бассейнами внешней и внутренней подвздошной артерии. Однако данный подход не является оптимальным.

Выводы. Разработанная нами модель формирования ИНК приводит к ишемическим изменениям в задней конечности кролика, соответствующим ИНК III–IV стадии по классификации Фонтейна. Предложенная модель формирования контролируемой ИНК у кролика является анатомически обоснованной, не вызывает острой ишемии прооперированной конечности, не приводит к развитию гнойно-септических осложнений со стороны раны в силу одномоментности вмешательства и первичного закрытия операционной раны.

Ключевые слова: контролируемая ишемия нижней конечности у кролика, хроническая ишемия нижней конечности, атеросклероз, заболевание периферических артерий.

Model of formation of controlled hind limb ischemia in a rabbit

N. Yu. Litvinova, V. A. Chernyak, D. Ye. Dubenko

O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

The aim – to develop an anatomically based model of controlled chronic hind limb ischemia (HLI) in a rabbit, which does not lead to acute arterial anemia in the laboratory animal, does not increase early postoperative mortality and makes it possible to recreate chronic HLI of early stages in laboratory animals.

Materials and methods. We operated on four rabbits of Chinchilla breed. In 4 weeks we studied the state of the hind limb and general condition of the animal according to the following criteria: one-time traveled distance, duration of sleep, sparing of the operated limb during walking and running, the results of microcirculation study by laser flowmetry, data of histology research.

Results and discussion. One-time traveled distance of operated rabbits was 6.1 ± 0.4 m (narrowing of 1/3 of the lumen) and 1.9 ± 0.2 (narrowing of 1/2 of the lumen), temperature of the operated limb decreased to 34.6 ± 1.1 °C (narrowing of 1/3 of the lumen) and 33.7 ± 1.4 °C (narrowing of 1/2 of the lumen). Daily sleep duration of operated rabbits decreased to 7.5 ± 0.2 h (narrowing of 1/3 of the lumen) and to 6.9 ± 0.5 h (narrowing of 1/2 of the lumen). According to laser flowmetry, all operated rabbits had decrease of microcirculation indexes in the operated limb by 20–40% ($p < 0.05$). Most models of controlled hind limb ischemia in the rabbit were based on the development of collateral vessels between the internal and external iliac arteries. However, this approach is not optimal.

Conclusions. We have developed a model of controlled hind limb ischemia which leads to ischemic changes in the hind limb of the rabbit, corresponding to stages III–IV of Fontaine classification. The proposed model of controlled hind limb ischemia in the rabbit is anatomically reasonable, does not cause acute ischemia of the operated limb, does not lead to the development of septic complications on the part of the wound in view of a single-step intervention and primary closure of the wound.

Key words: controlled hind limb ischemia in a rabbit, chronic hind limb ischemia, atherosclerosis, peripheral artery disease.