

Винахід відноситься до галузі медицини, а саме до моделювання патологічних процесів та може бути використаний в експериментальній кардіології для вивчення патогенезу ішемічної хвороби серця та у фармакології для вивчення ефективності лікарських препаратів для лікування даного захворювання.

До теперішнього часу існує ряд суперечних та недостатньо вивчених аспектів у проблемі виникнення атеросклеротичних пошкоджень та, як наслідок, ішемічної хвороби серця.

Поліморфізм, функціональна гетерогенність клітин ендотелію та інтими є необхідними умовами виникнення атеросклерозу. При цьому первинний фактор, що веде до атеросклерозу, може полягати саме у самій артеріальній стінці, у її структурі та в її ензимній системі.

Вивчення патоморфологічних порушень серцевого м'язу, судинної стінки та взаємозв'язку з іншими органами та системами з врахуванням фізіологічних ефектів є важливим та актуальним у світлі розуміння патогенезу атеросклеротичних ушкоджень та правильного підходу до лікування ішемічної хвороби серця. У даний час немає адекватного методу моделювання атеросклеротичних пошкоджень і/або ішемічної хвороби серця.

Відомі перші методики, що дозволяють моделювати атеросклеротичні пошкодження, та як наслідок ішемічну хворобу серця, засновані на формуванні порушення тканинного метаболізму.

Відомий спосіб інфекційного моделювання атеросклерозу шляхом внутрішньочеревного або ретробульбарного введення інфекційного атеросклероз-асоційованого агента (АА-агент) [Див. а.с. №1684801, СРСР, G09B23/28, "Способ моделирования атеросклероза", автори: Т.В. Амвросьева, В.И. Вотяков, И.Р. Ерохина, С.Д. Беззубик, опубл. 15.10.91., Бюл. №38]. АА-агент, який має проліферативно-ліпідомодулючі властивості, виділяють з атеросклеротично уражених біоптатів стенозних артерій людини, після чого вирощують культуру гладком'язових клітин, які продукують АА-агент, та отримують конденсоване середовище, що містить АА-агент. Новонародженим морським свинкам на 2-4 добу життя внутрішньочеревне або ретробульбарно вводять 0,2-0,5мл інфекційного матеріалу двічі з інтервалом 48 годин. Через півроку при патогістологічному дослідженні у судинах знаходять збільшення кількості відкладень ліпідів в інтимі за рахунок збільшення появ ксантомних клітин, збільшення кількості сполучно-тканинних елементів та потовщення судинної стінки.

Недоліком є те, що модель одержують через 6-7 місяців, причому за етіопатогенезом вона не зовсім адекватна патології, що спостерігається в клініці.

Застосування атерогенної дієти є одним з найбільш розповсюджених методів формування атеросклеротичних ушкоджень [Е.Д. Клименко, Л.Н. Лебедева // Морфофункциональное состояние внутриорганных сосудов при экспериментальном атеросклерозе. Вестник АМН СССР. 1980. №1. с. 85-90]. Відомі численні модифікації цього метода.

Досить вдалим є спосіб моделювання атеросклеротичних змін, заснований на застосуванні атерогенної дієти та формуванні стресового впливу [Див. патент РФ №2033646, МПК: G09B23/28, "Способ моделирования атеросклероза", автори: В.И. Гарец, Н.П. Федченко, Л.И. Конча, опубл. 20.04.95, Бюл. №11]. Спосіб полягає у насиченні паравазальних ліпотканел жирами шляхом годування експериментальних тварин свинячим салом кожен день на протязі 7 діб та формування імобілізаційного стресу на 8 добу у вертикальному положенні для збільшення набряку інтими судин, після чого внутрішньочеревне вводять токсичну дозу обзидана, що послабляє транспорт жиру з паравазальних ліпотканел та стимулює його відкладання в усіх прошарках судин. Даний винахід дозволяє створити модель атеросклерозу за короткий термін (8 діб).

Даний спосіб моделювання є найбільш близьким по технічній сутності та результату до способу, що заявляється, тому він обраний нами як прототип.

Загальним недоліком усіх відомих способів моделювання є неврахування при створенні моделі ішемічної хвороби серця (ІХС) патоморфологічних порушень серця та стану його вегетативної нервової системи.

В основу винаходу покладено задачу створити такий спосіб моделювання ІХС, у якому вибір дослідного матеріалу та комплексна оцінка морфологічних змін і пошкоджень серця, стану його вегетативної нервової системи та судинної стінки дозволить здійснити більш адекватну модель патології і визначити нові підходи для розробки способів діагностики та медикаментозного лікування ІХС.

Ця задача вирішується у способі моделювання ІХС, який полягає в тому, що експериментальних тварин утримують на атерогенній дієті на тлі формування стресового впливу, виділяють та досліджують гістологічні зрізи аорти.

Ознаками, що відрізняють винахід від прототипу, є такі:

у якості атерогенної дієти застосовують кристалічний холестерин у кількості 200 мг на 1 кг ваги;

стресовий вплив формують постійно діючий шляхом утримання експериментальних тварин при цілодобовому освітленні. Вдень - звичайне сонячне світло, вночі - електричне освітлення;

додатково виділяють та досліджують гістологічні зрізи серця та пінеальної залози.

Годування експериментальних тварин кристалічним холестерином у кількості 200 мг на 1 кг ваги сприяє досягненню стабільної гіперхолестеринемії, перші ознаки якої мають місце вже на першому місяці експерименту. В подальшому стійке підвищення холестерину в крові піддослідних кролів призводить до порушень ліпідного обміну, що проявляється в виникненні вогнищ ліпоїдозу в інтимі аорти, атеросклеротичних уражень коронарних артерій, осередкових змін дистрофічного, некробіотичного характеру з дифузним кардіосклерозом у серцевому м'язі.

Формування постійно діючого стресового впливу шляхом утримання експериментальних тварин при цілодобовому освітленні за морфологічними показниками, приводить до розвитку у тварин хронічного психоемоційного, а потім гуморального стресу. Це обумовлене тим, що тривале цілодобове освітлення викликає пригнічення мелатонінутворючої функції пінеальної залози і в подальшому призводить до функціонального гіпопінеалізму, який, в свою чергу, забезпечує пусковий механізм розвитку прискореного «злорякісного» атеросклерозу.

Додаткове дослідження гістологічних зрізів серця та пінеальної залози дозволить провести прицільну та детальну оцінку патоморфологічних порушень серця та стану його вегетативної нервової системи.

Це обумовлено тим, що безпосереднє дослідження серця наряду з оцінкою стану артерій дає більш обґрунтовану та детальну оцінку розвитку експериментальної ІХС.

Моделювання ішемічної хвороби серця, згідно способу, що заявляється, здійснювали в Інституті проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України та в Інституті терапії АМН України на експериментальних тваринах (всього 67 тварин) - статевозрілі самці породи "шиншила". Комплексна оцінка морфологічних змін пінеальної залози, судинної стінки, серця та його вегетативної нервової системи дослідних тварин дозволяє в порівнянні з прототипом, створити більш адекватну модель ІХС (див. таблицю).

Перевага способу, що заявляється, над відомим (прототипом).

Таблиця

№ п/п	Показники, що порівнюються	Прототип	Спосіб, що заявляється
1.	Дослідний матеріал	Гістологічні зрізи аорти	Гістологічні зрізи аорти, серця та пінеальної залози
2.	Метод формування стресу	Імобілізація експериментальних тварин та внутрішньочеревне введення обзидану на 8-й добі.	Тривале (5 місяців) цілодобове освітлення експериментальних тварин.
3.	Ступінь адекватності моделювання ІХС	Не відтворює патофізіологічні умови	Відтворює патофізіологічні умови за рахунок створення функціонального гіпопінеалізму в процесі експерименту

Спосіб, що заявляють здійснюють в такій послідовності:

Моделювання атеросклеротичних змін здійснюють шляхом утримання експериментальних тварин на атерогенній дієті на тлі формування стресового впливу, виділення та дослідження гістологічних зразків аорти.

Згідно з винаходом до раціону експериментальним тваринам додають кристалічний холестерин в дозі 200мг на кг ваги тварини *per os* за схемою: 5 днів - введення холестерину; 2 дні - відпочинок.

Одночасно з утриманням на холестериновій дієті формують постійно діючий стресовий вплив. Для цього експериментальних тварин (статевозрілі самці кролів породи «шиншила») утримують в приміщенні віварію при кімнатній температурі в умовах тривалого цілодобового освітлення: удень - звичайне сонячне світло, уночі - електричне освітлення з використанням ламп накаливання потужністю 100Вт (інтенсивність освітлення, визначена за допомогою люксметра - Ю117, складала 20 люкс).

Для проведення порівняльного аналізу піддослідні кролі розподілені на 3 групи:

1 - інтактні;

2 - кролі, які отримували холестерин;

3 - кролі, які утримувались в умовах постійного цілодобового освітлення і додатково до цього отримували холестерин.

5. Для оцінки атеросклеротичних ушкоджень досліджують біологічні зразки експериментальних тварин, яких виводять під наркозом з експерименту.

6. Виділяють та досліджують гістологічні зрізи аорти за відомою методикою [Саркісов Д.С., Перов Ю.Л. // Микроскопическая техника // Руководство. М., Медицина, 1996г. - 544стр.]. Для цього роблять розтин черевної порожнини, виділяють аорту та беруть кусочки дуги й першого сегменту грудного відділу аорти для дослідження на трансмісійному та растровому електронних мікроскопах ЕМВ-100АК (м. Суми) та РЕМ-100У (м. Суми), відповідно.

7. Додатково, згідно винаходу, виділяють та досліджують гістологічні зрізи серця за відомою методикою [див. п.6]. Для цього роблять розтин черевної порожнини та виділяють серце. Зрізи серця фарбують гематоксиліном і еозином, за ван Гізон, за Шабадашем, за Більшовським-Гросс, за Нісслем, за Pero, ставиться PAS-реакція. Морфометричне дослідження проводиться за допомогою програми Olympus DP-Soft (Version 3.1).

8. Виділяють та досліджують гістологічні зрізи пінеальної залози за відомою методикою [див. п. 6]. Для цього розтинають черепну коробку, виділяють пінеальну залозу та піддають її фіксації в 10% розчині формаліну, проводять через спирти наростаючої концентрації та заливають в парафін, після чого виготовляють зрізи товщиною 5мкм, які фарбують гематоксиліном та еозином.

9. Здійснюють сумісну оцінку патоморфологічних порушень, судинної стінки та серця з врахуванням стану вегетативної нервової системи серця.

Можливість здійснення способу моделювання ІХС підтверджується прикладами:

Приклад 1. Кроля-самця масою 1970г утримують в приміщенні віварію при кімнатній температурі в умовах тривалого цілодобового освітлення: удень - звичайне сонячне світло, уночі - електричне освітлення з використанням ламп накаливання потужністю 100Вт (інтенсивність освітлення, визначена за допомогою люксметра - Ю117, складала 20 люкс). На протязі 3 місяців кроль отримує стандартний раціон віварію й кристалічний холестерин в дозі 200мг на кг ваги тварини *per os* за схемою: 5 днів - введення холестерину; 2 дні - відпочинок.

Під наркозом експериментальну тварину виводять з експерименту, розтинають черепну коробку та виділяють пінеальну залозу, роблять розтин черевної порожнини і виділяють аорту та серце.

Пінеальну залозу піддають фіксації в 10% розчині формаліну, проводять через спирти наростаючої концентрації та заливають в парафін, після чого виготовляють зрізи товщиною 5мкм, які фарбують гематоксиліном та еозином.

Беруть кусочки дуги та першого сегмента грудного відділу аорти для гістологічного і електронно-мікроскопічного дослідження на трансмісійному та растровому електронних мікроскопах ЕМВ-ЮОАК (м. Суми) та РЕМ-100У (м. Суми), відповідно. Для цього аорту відділяють від клапанів до біфуркації на клубові артерії, відмивають від крові в фізіологічному розчині, розсікають по довжині, звільняють від адвентиції і перед фіксацією в альдегідних фіксаторах розправляють на картоні люмінальною поверхнею догори. Частину аорт фіксують в

суміші 9% розчину нейтрального формаліну і 40% розчину глюкози для імпрегнації міжклеточних границь. Частину аорт фіксують 9% розчином формаліну для фарбування Суданом червоним на ліпіди.

Для гістологічних і гістохімічних досліджень зрізи серця фарбують гематоксиліном і еозином, за ван Гізон, за Шабадашем, за Більшовським-Гросс, за Нісслем, за Рего, ставиться PAS-реакція [див. п.6]. Морфометричне дослідження проводиться за допомогою програми Olympus DP-Soft (Version 3.1).

Результати дослідження пінеальної залози:

Тривале утримування кролів в умовах цілодобового освітлення викликає в пінеальній залозі суттєве зменшення загальної кількості пінеалоцитів, диференціювання клітин, що залишилися, на переважну продукцію індоламінів, а також масову загибель функціонуючих з перенапругою пінеалоцитів завдяки апоптозу. Ці кінцеві зміни можна розглядати як експериментальну модель функціонального гіпопінеалізму.

При утримуванні експериментальної тварини водночас на холестериновій дієті та в умовах цілодобового освітлення, паренхіма пінеальної залози також виявляє яскраво виражені структурні зміни. Звертає увагу той факт, що в структурі залози зовсім відсутні пінеалоцити, які морфологічно характеризуються як «запасні». В цьому випадку виразно домінують пінеалоцити, які мають вакуолізовану цитоплазму і характеризуються як ті, що спеціалізуються на продукції індоламінів, проте серед них дуже багато клітин з явищами апоптозу. В пінеальній залозі починається формування псевдоальвеол.

Результати дослідження гістологічних зрізів аорти та серця:

Морфологічний аналіз ділянок ліпоїдозу інтими аорти виявив глибокі дистрофічні і некробіотичні зміни як в інтимі, так і в середній оболонці аорти. Основну масу клітинних елементів у вогнищах ліпоїдозу складали піністі клітини гладком'язового походження. Процес трансформації гладком'язових клітин у піністі клітини супроводжувався значним нагромадженням в інтимі судини екстрацелюлярних ліпідів, формуванням атероматозного ядра, що свідчить про активне прогресування патологічного процесу.

Під епікардом відмічається значна кількість жирової тканини, судини епікарда та інтрамуральні артерії повнокровні, їхня стінка гіпертрофована, зовнішня третина меді артерій склерозована.

У периваскулярному просторі спостерігається виражене розростання сполучної тканини. Відзначається поява ділянок з кардіоміоцитами, що замуrowані у сполучно-тканинний каркас. У субепікардіальному відділі відзначається гіпертрофія кардіоміоцитів з явищами міофібрілолізу. Крім того, мають місце дрібноосердкові некротичні зміни, при цьому локалізація та поширеність таких змін відповідають ступеню ураження коронарних артерій. Описані мікроінфаркти знаходяться як у гострій стадії, так і у стадії рубцювання з колагенізацією аргірофільних волокон та міофіброзом. М'язові волокна, що прилягають до некробіотичних зон, мають виражене поперечне покреслення. Пофарбування м'язових волокон серця нерівномірне, спостерігається виражена базofilія цитоплазми кардіоміоцитів. Відмічається дрібно- і середньокраплинна жирова дистрофія. Капіляри розширені, повнокровні. Навколо капілярів, артеріол, дрібних артерій спостерігаються помірно виражені лімфоцитарно-гістіоцитарні скупчення. Інтерстиціальна тканина набрякла. У ділянках набряку кардіоміоцити з ознаками контрактурних і міофібрілолітичних змін. При гістохімічному дослідженні відмічається дифузне посилення накопичення кислих глікозаміногліканів. Має місце зменшення базofilії інтрамуральних нейроцитів, збільшення відносної кількості атрофічних нейроцитів, зменшення мережі інтрамуральних та субендокардіальних нервових волокон.

Приклад 2. Кроля самця масою 2050 г утримують в приміщенні віварію при кімнатній температурі в умовах звичайного освітлення. На протязі 3 місяців кроль отримує стандартний раціон віварію й кристалічний холестерин в дозі 200 мг на кг ваги тварини per os за схемою: 5 днів - введення холестерину; 2 дні - відпочинок.

Під наркозом тварину виводять з експерименту. Для оцінки атеросклеротичних ушкоджень досліджують біологічні зразки експериментальної тварини. Для цього розкривають черепну коробку та виділяють пінеальну залозу, здійснюють розтин черевної порожнини та виділяють аорту й серце.

Пінеальну залозу піддають фіксації в 10% розчині формаліну, проводять через спирти наростаючої концентрації та заливають в парафін, після чого виготовляють зрізи товщиною 5 мкм, які фарбують гематоксиліном та еозином.

Беруть кусочки дуги та першого сегмента грудного відділу аорти для гістологічного і електронно-мікроскопічного дослідження на трансмісійному та растровому електронних мікроскопах EMB-100AK (м. Суми) та РЕМ-100У (м. Суми), відповідно. Для цього аорту відділяють від клапанів до біфуркації на клубові артерії, відмивають від крові в фізіологічному розчині, розсікають по довжині, звільняють від адвентиції і перед фіксацією в альдегідних фіксаторах розправляють на картоні люмінальною поверхнею дотри. Частину аорт фіксують в суміші 9% розчину нейтрального формаліну і 40% розчину глюкози для імпрегнації міжклеточних границь. Частину аорт фіксують 9% розчином формаліну для фарбування Суданом червоним на ліпіди.

Для гістологічних і гістохімічних досліджень зрізи серця фарбують гематоксиліном і еозином, за ван Гізон, за Шабадашем, за Більшовським-Гросс, за Нісслем, за Рего, ставиться PAS-реакція [див. п.6]. Морфометричне дослідження проводиться за допомогою програми Olympus DP-Soft (Version 3.1).

Результати дослідження пінеальної залози.

Холестеринова дієта призводить до появи в структурі пінеальної залози великої кількості пінеалоцитів, які мають ознаки низького рівня синтезу та інкреції біологічно активних речовин як індоламінової, так і поліпептидної природи, а саме, - ядро мале і темне, цитоплазма слабо вакуолізована, а невакуолізовані ділянки цитоплазми досить щільні. Лише в центрі залози спостерігаються декілька груп клітин з більш великими ядрами, які представлені дифузним гетерохроматином та дуже вакуолізованою цитоплазмою. Поряд з цими виявляються ядра з маргіналією хроматина, а також апоптозні тільця.

Результати дослідження гістологічних зрізів аорти та серця:

Морфологічний аналіз ділянок ліпоїдозу інтими аорти визначає помірні дистрофічні і некробіотичні зміни як в інтимі, так і в середній оболонці аорти. Процес трансформації гладком'язових клітин у піністі клітини супроводжується значним нагромадженням в інтимі судини екстрацелюлярних ліпідів, формуванням атероматозного ядра, що свідчить про активне прогресування патологічного процесу передусім за рахунок накопичення ліпідів.

У субендокардіальному шарі відзначається підвищене відкладення жирової тканини, острівці якої виявляються і між м'язовими волокнами. При морфометричному дослідженні відзначається стовщення стінки інтрамуральних артерій, зменшення їхньої площі поперечного перетину. У периваскулярному просторі виражені розростання сполучної тканини з поширенням волокон між кардіоміоцитами. М'язові волокна пофарбовані не рівномірно. У кардіоміоцитах при фарбуванні гематоксиліном і еозином відзначається дрібно- і середньокраплинна жирова дистрофія. Виявляються дрібноосердкові некротичні зміни. У ділянках, що прилягають до зон розпаду м'язових волокон і фокусів мікроміомалії, спостерігаються м'язові волокна, що збереглися з вираженим поперечним покресленням. Відзначається піперемія капілярів переважно субендокардіального регіону. Просвіти капілярів розширені. Навколо капілярів, артеріол, дрібних артерій спостерігаються помірковано виражені лімфоцитарно-гістіоцитарні скупчення. Інтерстиціальна тканина набрякла. У ділянках набряку кардіоміоцити з ознаками контрактурних і міофібрілолізісних змін.

Висновки:

Таким чином, при моделюванні ішемічної хвороби серця тільки за допомогою холестеринової дієти в серцево-судинній системі визначаються значно слабші зміни: слабо виражені атеросклеротичні ураження коронарних артерій, осередкові зміни дистрофічного, некробіотичного характеру з дифузним кардіосклерозом у серцевому м'язі, не відтворюються патофізіологічні умови. Моделювання ІХС шляхом холестеринової дієти та формування постійно діючого стресу за допомогою цілодобового освітлення експериментальних тварин викликає у експериментальних тварин функціональний гіпопінеалізм та призводить до розвитку значних ліпідних уражень аорти з глибокими некробіотичними та дистрофічними змінами як в інтимі, так і в середній оболонці, а на препаратах серця мають місце ознаки дифузного кардіосклерозу та зменшення базofilії інтрамуральних нейронів, збільшення відносної кількості атрофічних нейронів, зменшення мережі інтрамуральних та субендокардіальних нервових волокон. Вище означені зміни та порушення в більшій мірі відповідають картині, що спостерігається при ІХС у людини.

Технічний результат:

Моделювання ІХС за способом, що заявляють, у порівнянні з прототипом, дозволяє здійснити більш адекватну модель патології і визначити нові підходи для розробки способів діагностики та медикаментозного лікування ІХС.