

**ВЛИЯНИЕ АКТИВНОСТИ ВОСПАЛЕНИЯ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ НА
ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ У
ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ОБЛИТЕРИРУЮЩИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ
АОРТЫ И АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ**

А. А. Полянцев*, П. В. Мозговой, Д. В. Фролов*, Г. Л. Снигур*.**

*Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра общей
хирургии.

**Клиника № 1 Волгоградского государственного медицинского университета,
отделение сердечно-сосудистой хирургии

*** Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра
патологической анатомии

Адрес: 400066, г. Волгоград, пл. Павших борцов 1, Волгоградский государственный
медицинский университет, кафедра общей хирургии с курсом урологии, Полянцеву А. А.

Телефон: 8-8442-362914, 8-917-3303458 Фролов Денис Владимирович

Факс: 8-8442-371590, для отделения сосудистой хирургии

Резюме: В данное исследование вошли 42 пациента (основная группа), оперированных на аортоподвздошном артериальном сегменте в отделении сосудистой хирургии клиники общей хирургии им. А.А. Полянцева Волгоградского государственного медицинского университета в 2007 году. Период наблюдения за пациентами после операции составил 3 года. Средний возраст больных: 58,48 года $\pm$ 6,4. Все пациенты в исследуемой группе мужчины. Поздние тромботические реоклюзии наблюдались у 6 пациентов (14,3%) в период от 1 до 3-х лет, что потребовало выполнить ампутацию конечности на уровне верхней трети бедра у 2 больных (4,8%). Для проведения гистологического исследования использовали материал, полученный в ходе оперативных вмешательств от пациентов с облитерирующим атеросклерозом аорты и артерий нижних конечностей. Во время операции производился забор ткани стенки аорты в области

проксимального анастомоза и, если оперативное лечение проводилось только в области дистального анастомоза, то забиралась часть стенки общей бедренной артерии. Использовали моноклональные антитела к каспазе 3 и эндотелиальной NO-синтазе (Novocastra, Великобритания), а так же к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) и протеину Ki-67 (Lab Vision, США). Для визуализации использовали непрямой иммунопероксидазный метод с высокотемпературной демаскировкой антигенов с использованием позитивного и негативного контроля. **Выводы:** Пациенты с атеросклерозом аорты и артерий нижних конечностей имеют высокий уровень пролиферативной активности эндотелия, по сравнению с пациентами без атеросклероза. Пролиферативная активность эндотелиальных и гладкомышечных клеток стенки аорты, агрессивность и активность атеросклероза у больных с тромботическими реокклюзиями в отдаленном послеоперационном периоде превышает таковую у больных без тромбозов, и способствует наступлению данного осложнения после операции.

Ключевые слова: атеросклероз, артерии нижних конечностей, оперативное лечение, отдаленные результаты, иммуногистохимия, морфометрия.

INFLUENCE OF THE ACTIVITY OF VASCULAR WALL INFLAMMATION ON THE RESULTS OF RECONSTRUCTIVE SURGERY IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS OBLITERANCE OF THE AORTA AND LOWER EXTREMITY ARTERIES.

Authors: A.A. Poliantsev, P.V. Mozgovoy**, D.V. Frolov*, G. L. Snigur****

Abstract: This study included 42 patients (basic group) who were operated on aortoiliac arterial segments in the department of vascular surgery of The Clinic of General Surgery after A.A. Polyantsev, Volgograd State Medical University in 2007. Observation period for patients after operation was 3 years. The average age of patients: 58.48 years $\pm$ 6.4. All patients in the study group - male. Late thrombotic reocclusion occurred in 6 patients (14.3%) in the period from 1 to 3 years old and required to perform the amputation of limbs at the thigh in 2

patients (4.8%). To carry out histological studies the material obtained during surgical operations on patients with atherosclerosis obliterans of the aorta and lower extremity arteries was used. During the operation tissues of wall of the aorta in the proximal anastomosis were carried out. If surgery was performed only in the distal anastomosis, then the wall of the common femoral artery was carried out. Monoclonal antibodies to caspase 3 and endothelial NO-synthase (Novocastra, UK), as well as to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 protein (Lab Vision, USA) were used. To visualize the indirect immunoperoxidase method with high temperature demasking of antigens with positive and negative controls was used.

Conclusion: Patients with atherosclerosis of aorta and lower extremity arteries have a high level of proliferative activity of the endothelium, compared with patients without atherosclerosis. Proliferative activity of endothelial and smooth muscle cells of aortic wall, aggressiveness and activity of atherosclerosis in patients with thrombotic reocclusion in the late postoperative period exceeds that of patients without thrombosis, and contributes to the offensive of the complications after surgery.

Key words: atherosclerosis, the arteries of the lower limbs, surgical treatment, long-term results, immunohistochemistry, morphometry.

Ведение: Реконструктивные операции по поводу атеросклероза аорты и магистральных артерий вошли в повседневную практику отделений сосудистой хирургии и составляют 1,8% от числа всех хирургических вмешательств в стране. С развитием сосудистой хирургии и анестезиологии-реаниматологии неуклонно снижается количество ранних осложнений после реконструктивных операций при облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей и острее звучит вопрос снижения поздних осложнений после подобных операций [2]. Наиболее частыми причинами тромботических осложнений после реконструктивных операций являются: неадекватная оценка состояния проксимального и дистального сосудистого русла, гемокоагуляционные нарушения, технические ошибки, вид шунтирующего материала [5]. Кроме того, фактически не учитывается прогрессирующий характер течения атеросклероза, на фоне которого осуществляется имплантация протеза. Так же игнорируется воспалительная природа данного заболевания, разная степень тяжести и быстрота прогрессирования [6,7].

Цель исследования: оценить связь между активностью (в том числе и воспалительной) атеросклеротического процесса в зоне артериальной реконструкции у больных, оперированных на аортоподвздошном артериальном сегменте, и поздними тромботическими реокклюзиями. Эти данные можно использовать для коррекции терапии в послеоперационном периоде с целью профилактики поздних тромботических реокклюзий и прочих осложнений в других сосудистых бассейнах.

Материалы и методы: В данное исследование вошли 42 пациента (основная группа), оперированных на аортоподвздошном артериальном сегменте в отделении сосудистой хирургии клиники общей хирургии им. А.А. Полянцева Волгоградского государственного медицинского университета в 2007 году. Период наблюдения за пациентами после операции составил 3 года. Средний возраст больных: 58,48 года $\pm$ 6,4. Все пациенты в исследуемой группе мужчины. Изолированный облитерирующий процесс наблюдался у 32 (76,2%). Сочетание облитерирующего процесса с аневризматическим - у 10 (23,8%). По стадии заболевания (по Фонтейну-Покровскому) больные распределились следующим образом: IIБ стадия – 18 (42,8%), III стадия – 20 (47,6%). IV стадия – 4 (9,5%). Виды и количество вмешательств представлены в таблице 1.

Таблица 1

Виды и количество выполненных операций

Название операции	Количество
Аортобедренное бифуркационное протезирование	20 (47,6%)
Аортобедренное бифуркационное шунтирование	20 (47,6%)
Аортобедренное бифуркационное репротезирование	2 (4,8%)
Всего:	42 (100%)

Поздние тромботические реокклюзии наблюдались у 6 пациентов (14,3%) в период от 1 до 3-х лет, что потребовало выполнить ампутацию конечности на уровне верхней трети бедра у 2 больных (4,8%).

В качестве контрольной группы использовали 14 препаратов стенок брюшной аорты, изъятые при вскрытии трупов мужчин 23 – 37 лет, смерть, которых наступила в результате травмы.

Гистологическое исследование препаратов стенок аорты и артерий проводили на кафедре патологической анатомии ВолгГМУ. Для проведения гистологического исследования использовали материал, полученный в ходе оперативных вмешательств от пациентов с облитерирующим атеросклерозом аорты и артерий нижних конечностей. Во время операции производился забор ткани стенки аорты в области проксимального

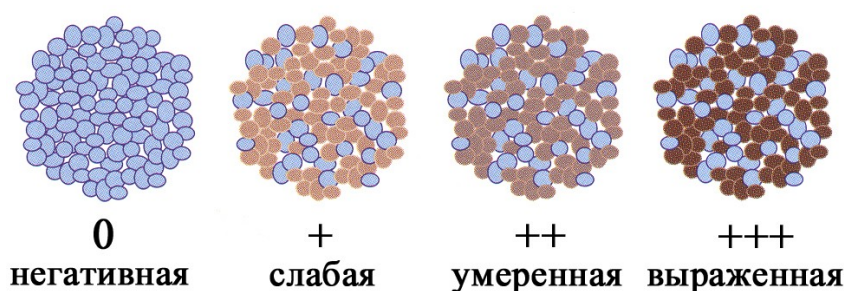
анастомоза и, если оперативное лечение проводилось только в области дистального анастомоза, то забиралась часть стенки общей бедренной артерии. Ткань фиксировали в течение 48 часов в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4). После фиксации материал проводили по общепринятой гистологической методике через батарею спиртов возрастающей концентрации, хлороформ и заливали в парафин [4].

На роторном микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 5-6 мкм. В дальнейшем производили окрашивание гематоксилином и эозином по общепринятой гистологической методике (депарафинизация в ксилоле, проводка по спиртам убывающей концентрации до воды, окраска гематоксилином Бёмера, дифференцировка солянокислым спиртом, окраска эозином, проводка по спиртам возрастающей концентрации до абсолютного этанола, просветление в ксилоле, заключение в канадский бальзам) [4].

При выборе антигенов для иммуногистохимического исследования руководствовались тем, что пролиферативная активность является одним из ведущих факторов атерогенеза. Определение ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) позволяет судить не только об индексе пролиферативной активности, но и определять популяции клеток, участвующих в репаративных процессах. Высокоинформативным способом определения индекса пролиферативной активности является регистрация экспрессии протеина Ki-67, так как последний выявляется только в пролиферативной фазе клеточного цикла (G1). Каспаза-3 (эффекторная каспаза из семейства цистиновых протеаз) играет важную роль в разрушении клетки при апоптозе. Изменение экспрессии эндотелиальной NO-синтазы лежит в основе дисфункции эндотелия, атерогенезе, артериосклерозе и многих других патологических процессов возникающих в сосудистой стенке.

Иммуногистохимическое исследование проводили на базе лаборатории морфологии и иммуногистохимии Волгоградского медицинского научного центра. Использовали моноклональные антитела к каспазе 3 и эндотелиальной NO-синтазе (Novocastra, Великобритания), а так же к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) и протеину Ki-67 (Lab Vision, США). Для визуализации использовали непрямой иммунопероксидазный метод с высокотемпературной демаскировкой антигенов с использованием позитивного и негативного контроля [3].

Осуществляли оценку интенсивности иммуногистохимической реакции с использованием полуколичественной шкалы [1]:



Морфометрический анализ производили с использованием компьютерной системы «ВидеоТестМорфо-4» (Россия, СПб). Определяли индекс пролиферативной активности (процент иммунопозитивных клеток на 100 исследуемых клеток).

Результаты исследования: При определении индекса пролиферативной активности макрофагов по ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA), получена медиана 10 клеток (мода 10). Следующим маркером индекса пролиферативной активности макрофагов была экспрессия протеина Ki-67, медиана составила 5 клеток (мода 5). В контрольной группе PCNA 3 (3) и Ki-67 2 (2), соответственно (таблица 2).

При описании индекса пролиферативной активности гладкомышечных клеток стенки аорты PCNA в основной группе медиана составила – 24 активных клетки (мода 25). При определении экспрессии протеина Ki-67 у ГМК стенки аорты медиана пролиферирующих клеток составила – 15 (мода 17). В контрольной группе PCNA – 9 (8) и Ki-67 – 7 (6), соответственно (таблица 2).

Индекс пролиферативной активности эндотелиальных клеток аорты в области проксимального анастомоза в основной группе – медиана 9 (мода 6) клеток. Следующим маркером индекса пролиферативной активности эндотелиальных клеток была экспрессия протеина Ki-67, медиана составила 6 клеток (мода 7). В контрольной группе PCNA – 2 (2) и Ki-67 – 4 (2), соответственно (таблица 2).

При анализе интенсивности окраски, экспрессия NO-синтазы эндотелиальных клеток аорты в области проксимального анастомоза в препаратах пациентов основной группы составила – медиана 1 (мода 1) в целом низкая. Экспрессия PCNA клетками стенки аорты оценена в целом как умеренная - медиана 2 (мода 2). Интенсивность окраски клеток на экспрессию протеина Ki-67 и каспазы-3 составила – медиана 1 (мода 1) одинаковая для одного и другого маркера, в целом низкая. В контрольной группе, описываемые показатели были на уровне 1, в целом экспрессия указанных антигенов – низкая (таблица 2).

Таблица 2

Морфометрические иммуногистохимические показатели препаратов стенок аорты в обеих группах.

№	Иммуногистохимические морфометрические показатели.		Основная группа – медиана (мода)	Контрольная группа - медиана (мода)	
1	Индекс пролиферативной активности (процент иммунопозитивных клеток на 100 исследуемых клеток).	Макрофаги	PCNA	10 (10)	3 (3)**
2			Ki-67	5 (5)	2 (2)*
3		ГМК	PCNA	24 (25)	9 (8)**
4			Ki-67	15 (17)	7 (6)*
5		Эндотелий	PCNA	9 (6)	2 (2)*
6			Ki-67	6 (7)	4 (2)*
7	Оценка интенсивности иммуногистохимической реакции с использованием полуколичественной шкалы.	Эндотелиальная NO-синтаза		1 (1)	1 (1)
8		PCNA		2 (2)	1 (1)*
9		Ki-67		1 (1)	1 (1)
10		Каспаза-3		1 (1)	1 (1)

где * - уровень значимости различия $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ при использовании критерия Колмогорова-Смирнова (индекс пролиферативной активности) и критерия Фишера (интенсивность иммуногистохимической реакции).

Таким образом, пациенты с атеросклерозом аорты и артерий нижних конечностей имеют высокий уровень пролиферативной активности, по сравнению с пациентами без атеросклероза.

Далее мы условно разделили основную группу на две. Первая группа, где тромбозы зон реконструкции в отдаленном послеоперационном периоде зарегистрированы не были – это группа из 36 пациентов. И вторая группа из 6 больных, у которых случились тромбозы после операции (таблица 3).

При сравнении индекса пролиферативной активности макрофагов по ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA), с проходимыми протезами после операции медиана 10 клеток (мода 10), в группе сравнения медиана 6 (мода 6), группы достоверно отличались друг от друга $p < 0,05$, при использовании критерия Колмогорова-Смирнова. Следующим маркером для сравнения индекса пролиферативной активности макрофагов была экспрессия протеина Ki-67, медиана в группе без тромбозов составила 5 клеток (мода 5), в группе с тромбозом протеза – медиана 4 (мода 4), группы по данному показателю относительно однородны, однако различия не достоверны (таблица 3).

Сравнение групп по индексу пролиферативной активности гладкомышечных клеток стенки аорты маркер PCNA, в первой группе медиана составила – 24 активных клеток (мода 25), во второй 16 (25), соответственно. При сравнении экспрессии протеина Ki-67 у ГМК стенки аорты медиана пролиферирующих клеток в группе без осложнений составила – 16 (мода 17) и в группе с тромботическими осложнениями медиана 9 (мода 14). Различия групп друг от друга по индексу пролиферативной активности гладкомышечных клеток стенки аорты не достоверны (таблица 3).

Последний для сравнения индекс пролиферативной активности эндотелиальных клеток аорты в области проксимального анастомоза в группе без тромботических реокклюзий – медиана 9 (мода 6) клеток, в группе с тромботическими реокклюзиями – медиана 5 (мода 5), различие групп не достоверно. И при сравнении этого же показателя по экспрессии протеина Ki-67, медиана составила 7 клеток (мода 7) в группе без тромбозов и 4 (3), различие групп при использовании критерия Колмогорова-Смирнова достоверны $p < 0,05$ (таблица 3).

Сравнение групп по интенсивности окраски по экспрессии NO-синтазы эндотелиальных клеток аорты в области проксимального анастомоза в препаратах пациентов группы без окклюзий в отдаленном послеоперационном периоде медиана составила 1 (мода 1) в целом низкая, в группе с окклюзиями протезов – 2 (2), соответственно. Данное различие достоверно $p < 0,05$, при использовании точного критерия Фишера. Экспрессия PCNA клетками стенки аорты в первой группе оценена в целом как умеренная - медиана 2 (мода 2), в группе сравнения – 1 (1) - низкая, различие достоверно $p < 0,05$. Интенсивность окраски клеток на экспрессию протеина Ki-67 в группе без осложнений составила – медиана 1 (мода 1), в целом низкая, в группе с тромботическими осложнениями – 2 (2) – умеренная, различие групп достоверно $p < 0,05$. И при сравнении последнего показателя интенсивности окраски по экспрессии каспазы-3 в первой группе медиана 1 (мода 1), во второй – 1 (1) соответственно, группы равны (таблица 3).

Таблица 3

Иммуногистохимические показатели препаратов стенок аорты в области проксимального анастомоза в группах с тромбозом зоны реконструкции и без них.

№	Иммуногистохимические показатели			Группа больных без тромбозов п/о – медиана (мода)	Группа пациентов с тромботическим и реокклюзиями п/о – медиана (мода)
1	Индекс пролиферативной активности (процент иммунопозитивных клеток на 100 исследуемых клеток).	Макрофаги	PCNA	10 (10)	6 (6)*
2			Ki-67	5 (5)	4 (4)
3		ГМК	PCNA	24 (25)	16 (25)
4			Ki-67	16 (17)	9 (14)
5		Эндотелий	PCNA	9 (6)	5 (5)
6			Ki-67	7 (7)	4 (3)*
7	Оценка интенсивности иммуногистохимической реакции с использованием полуколичественной шкалы.	Эндотелиальная NO-синтетаза		1 (1)	2 (2)*
8					
9		PCNA		2 (2)	1 (1)*
10		Ki-67		1 (1)	2 (2)*
		Каспаза-3		1 (1)	1 (1)

где * - уровень значимости различия $p < 0,05$, при использовании критерия Колмогорова-Смирнова (индекс пролиферативной активности) и критерия Фишера (интенсивность иммуногистохимической реакции).

Вывод: Таким образом, пролиферативная активность эндотелиальных и гладкомышечных клеток стенки аорты, агрессивность и активность атеросклероза у больных с тромботическими реокклюзиями в отдаленном послеоперационном периоде превышает таковую у больных без тромбозов и способствует наступлению данного осложнения после операции.

Список литературы:

1. Коржевский Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. – Санкт-Петербург, 2005. – 48с.
2. Кузнецов М. Р., Болдин Б. В., Кошечкин В. М. и др. Прогнозирование отдаленных результатов оперативного лечения больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008 г. – Том 14 - № 1 – С. 106 – 112.
3. Петрова С.В., Райхлин Н.Т. под ред. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Издание 3-е, дополненное и переработанное.– Казань, 2004. – 456 с., ил.
4. Саркисов Д. С., Перов Ю. Л. Микроскопическая техника.- М.: Медицина, 1996. - 544 с.
5. Швальб П. Г., Калинин Р. Е., Ухов Ю. И., Алферов Ю. В., Левитин А. В. Гиперплазия неоинтимы как причина рестеноза после реконструктивных и эндоваскулярных операций на артериях нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия – Т. 13 - № 4 – 2007 – С. 144 – 147
6. Шилкина Н. П. Ревматические заболевания и атеросклероз: роль реологических и микроциркуляторных нарушений // Ангиология и сосудистая хирургия – 2010 – Т. 16. № 2 – С. 23 – 29
7. Федорченко Н. П., Федорченко Н. Н. Теоретические и морфологические закономерности патогенеза атеросклероза и основных его осложнений. Новые подходы к их профилактике и лечению // Морфология – 2009 – Т.3 - № 1 – С. 14 – 21