

Model eksperymentalnej miażdżycy tętnic biodrowych u królika

AGNIESZKA NOSZCZYK-NOWAK, PIOTR SKRZYPCZAK*,
DARIUSZ BIAŁY**, JÓZEF NICPOŃ, WALENTYNA MAZUREK**

Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Chorób Koni, Psów i Kotów
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław

*Katedra i Klinika Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

**Katedra i Klinika Kardiologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. Pasteura 4, 50-366 Wrocław

Noszczyk-Nowak A., Skrzypczak P., Biały D., Nicpoń J., Mazurek W.
Model of experimental atherosclerosis of iliac arteries in rabbits

Summary

The aim of the study was to elaborate an effective method of triggering iliac artery atherosclerosis in rabbits. The authors applied a diet rich in fat, not based on cholesterol.

Investigations were performed on 18 White New Zealand breed rabbits. After 3 weeks of adjustment, morphological and biochemical blood analysis was carried out: ALT activity, AST activity, urea, creatinine, cholesterol and its fraction (LDL, HDL), triglycerides (TGL), bilirubin and protein. Next, a diet rich in fat with 7% arachnid oil was administered to the rabbits. After 8 weeks the blood test was carried out again and indicated a significant increase in cholesterol concentration and LDL, following which the procedure of injuring the iliac artery was performed. Control blood analysis and iliac arteriography were performed after 12 weeks. A significant continuous increase in cholesterol concentration and LDL in the biochemical blood analysis was observed. Angiography indicated the narrowing of both iliac arteries in 12 rabbits (66.6%) and the narrowing of one artery in 6 rabbits (33.3%).

Injuring the endothelium of the iliac arteries by means of a balloon used for angioplasty in hypercholesterolemia leads to narrowing the vessel lumen. This method of experimental atherosclerosis in vessels is a good one for further research into this pathology.

Keywords: rabbit, atherosclerosis

Miażdżycą jest przewlekłym ogniskowym procesem zapalnym obejmującym głównie duże i średnie tętnice. Stanowi podstawową przyczynę chorób serca i zawałów. Już w 1856 r. Virchow opisał zmiany miażdżycowe i wysunął hipotezę, że jest to aktywny proces zapalny (11). Na początku XIX wieku udowodniono rolę cholesterolu w patogenezie miażdżycy, zaś w 1999 r. opublikowano teorię głoszącą, że miażdżycą jest przewlekłym procesem zapalnym w odpowiedzi na uszkodzenie ściany tętnicy (14). Uważa się, że jest ona wywoływana przez współdziałanie co najmniej kilku czynników, zarówno genetycznych, jak i środowiskowych oraz przez długowieczność (1). Rozwój zmian miażdżycowych obejmuje ciąg wzajemnie powiązanych zjawisk. Początkowo dochodzi do uszkodzenia śródbłonna o charakterze czynnościowym lub morfologicznym przez: turbulentny przepływ krwi w naczyniach w wyniku nadciśnienia tętniczego, toksyczne składniki dymu tytoniowego, stres oksydacyjny, zmodyfikowane cząsteczki LDL, przeciwciała skierowane przeciw komórkom śródbłonna, zakażenia (głównie wirusy i *Chlamydia sp.*) oraz przez produkty glikacji powstające w cukrzycy (1). Naruszenie bariery śródbłonna skutkuje jego uszkodzeniem, a następnie jego dysfunkcją, w prze-

biegu której dochodzi do zmniejszenia dostępności tlenu azotu (NO) i skurczu naczynia, agregacji płytek, proliferacji mięśni gładkich ściany naczyniowej oraz adhezji jednojądrzastych leukocytów. Kolejnym etapem rozwoju miażdżycy jest przyleganie monocytów i limfocytów do śródbłonna naczyń wskutek zwiększonej ekspresji adhezyn, głównie VCAM-1 i selektyny P i L. Następnie monocyty i limfocyty przechodzą przez śródbłonek pod wpływem działania cytokin. Kolejnym etapem jest przemiana monocytów w makrofagi i dalej powstawanie z nich komórek piankowatych. Równocześnie dochodzi do rozrostu komórek mięśni gładkich w błonie wewnętrznej naczynia pod wpływem płytkowopochodnego czynnika wzrostu (PDGF), endoteliny 1, trombiny i angiotensyny II oraz zwiększonej produkcji macierzy pozakomórkowej przez komórki mięśni gładkich ściany naczyniowej. Następnie dochodzi do przekształcania makrofagów w komórki piankowate, które po rozpadzie tworzą „rdzeń tłuszczowy”, zawierający gromadzący się pozakomórkowo cholesterol z jego estrami i komórki piankowate. W obrębie zmian miażdżycowych, pod wpływem czynników stymulujących angiogenezę (naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna, zasadowe czynniki wzrostu fibroblastów i on-

kostatynę M) tworzą się nowe naczynia. W wyniku ich uszkodzenia dochodzi do wylewów krwi w obrębie blaszki miażdżycowej, co przyczynia się do jej wzrostu. Kolejnym etapem jest wapnienie w blaszce miażdżycowej. Zachodzi ono pod wpływem cytokin i wapnia oraz przy udziale produkcji białek sprzyjających mineralizacji. W wyniku tych procesów ściana tętnic jest twarda i krucha.

Miażdżycza tętnic wieńcowych jest powodem około 50% zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych (7), dlatego też badania nad jej rozwojem, skutkami i metodami leczenia już rozwiniętej miażdżycy na modelu zwierzęcym pozwolą w przyszłości na wzrost skuteczności jej zapobiegania, dalsze spowolnienie rozwoju i poprawienie opieki nad chorymi z miażdżycą.

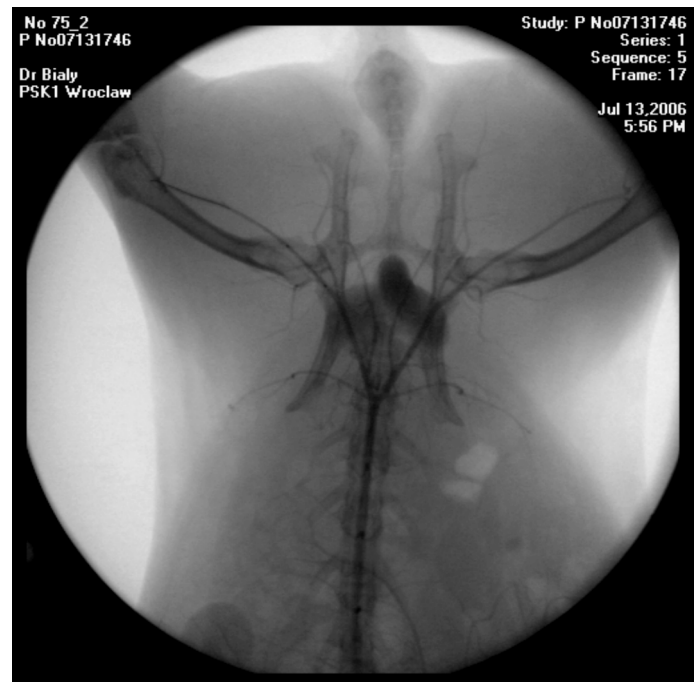
Celem badań było opracowanie skutecznej metody wywołania zwiężenia tętnic biodrowych u królików z zastosowaniem diety bogatotłuszczowej nie opartej na cholesterolu oraz mechanicznego uszkodzenia naczyń tętniczych.

Materiał i metody

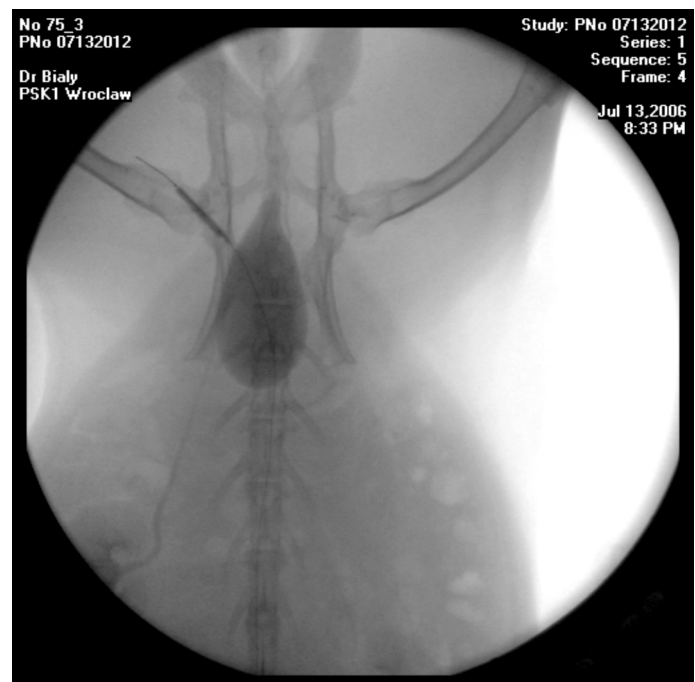
Materiał badawczy stanowiło 18 królików rasy białej nowozelandzkiej, pochodzących z hodowli królików w Małujowicach. Po 3 tygodniach aklimatyzacji przeprowadzono badania hematologiczne i biochemiczne: aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT), aktywność aminotransferazy asparaginanowej (AST), stężenie mocznika, kreatyniny, cholesterolu i jego frakcji (LDL, HDL) oraz trójglicerydów (TGL), bilirubiny oraz ilość białka całkowitego. Następnie rozpoczęto u zwierząt podawanie diety wysokotłuszczowej z 7% dodatkiem oleju arachidowego. Olej arachidowy ma w swoim składzie: 13-45% kwasu linolowego, 36-72% kwasu olejowego, 6-16% kwasu palmitynowego, 1-7% kwasu stearynowego, 1-3% kwasu arachinowego, 2-5% kwasu behenowego, 1-3% kwasu lignocerynowego. Granulowana dieta królików składała się z: owsa, pszenicy, suszu z lucerny i traw, śruty sojowej i mieszanki mineralno-witaminowej (tab. 1). Zwierzęta były żywione *ad libitum*. Po 8 tygodniach przeprowadzono ponownie badanie krwi i wykonano zabieg uszkodzenia tętnic biodrowych. Zabieg przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym inazyjnym: ksylazyna 2 mg/kg m.c. + ketamina 10 mg/kg m.c. Wenflon zakładano do żyły brzeżnej ucha. Okolicę szyjną do brzusznej golono, a pole operacyjne dezynfekowano roztworem jodyny. Skórę nacinano, rozdzielano tkankę podskórną i mięśnie celem uwidocznienia tętnicy szyjnej. Zmodyfikowaną metodą Selinger (10) zakładano do naczynia koszulkę naczyniową średnicy 4 Fr., przez którą podawano rentgenodiagnostyczny środek kontrastowy Urografin 76% celem uwidocznienia przebiegu tętnic (ryc. 1). Następnie, pod kontrolą promieni RTG, przez koszulkę naczyniową wprowadzano, po przewodniku, balon do angioplastyki Elekt 2,5 × 20, kolejno do obu tętnic biodrowych (ryc. 2). Po umieszczeniu go w świetle naczynia na wysokości stawów biodrowych, balon wypełniano płynem fizjologicznym z kontrastem za pomocą strzykawki automatycznej do poziomu ciśnienia wewnątrz balonu 10 atm i jego średnicy 8 mm. Balon napełniano trzykrotnie i utrzymywano go w tym stanie przez 30 s, celem uszkodzenia śródbłonna naczyń tętniczych. Po usunięciu balonu i koszulki naczyniowej tętnicę szyjną zamykano szwem naczyniowym. Tkanekę podskórną zszywano szwem ciągłym nićmi rozpuszczalnymi, zaś skórę – szwem pojedynczym nićmi nierozpuszczalnymi Amifil 3.0. Ranę zabezpieczano preparatem zawierającym zmikronizowane aluminium. Przez kolejne 12 tygodni króliki

Tab. 1. Składniki diety bogatotłuszczowej stosowanej u królików

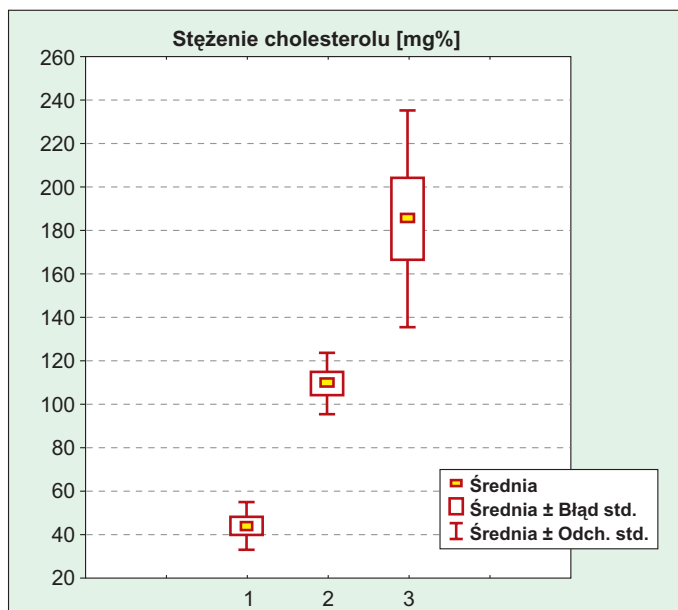
Składnik	Zawartość	
	gramy na 100 g paszy	%
Białko ogólne	16 g	16%
Tłuszcz surowy	7,2 g	7,2%
Popiół surowy	6,7 g	6,5%
Lizyna	0,8 g	0,8%
Włókno surowe	11 g	11%



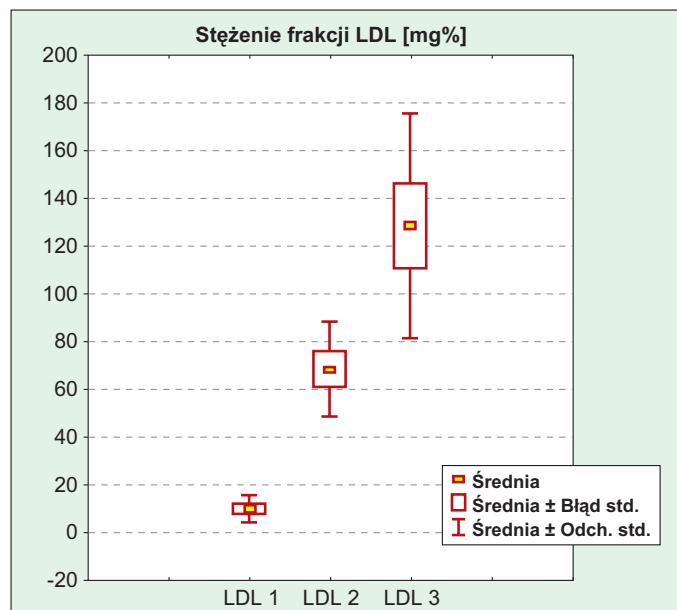
Ryc. 1. Obraz RTG tętnic biodrowych królika po podaniu kontrastu



Ryc. 2. Uszkodzenie śródbłonna tętnic biodrowych balonem. Widoczny balon do angioplastyki wypełniony kontrastem na wysokości stawu biodrowego



Ryc. 3. Stężenie cholesterolu w surowicy krwi królików przed rozpoczęciem podawania diety (1), po 8 tygodniach (2) i po 20 tygodniach (3) stosowania diety bogatotłuszczowej. W kolejnych badaniach różnice istotnie statystycznie $p < 0,01$



Ryc. 4. Stężenie frakcji LDL cholesterolu w surowicy krwi królików przed rozpoczęciem podawania diety (LDL 1), po 8 tygodniach (LDL 2) i po 20 tygodniach (LDL 3) stosowania diety bogatotłuszczowej. W kolejnych badaniach różnice istotnie statystycznie $p < 0,01$

były nadal żywione dietą wysokotłuszczową. Po tym okresie wykonano ponownie badania hematologiczne i biochemiczne oraz angiografię naczyń tętniczych.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników badań morfologicznych i biochemicznych krwi przeprowadzono przy pomocy nieparametrycznego testu dla danych powiązanych – wieloczynnikowej analizy ANOVA rang Friedmana. Poziom istotności przyjęto dla $p < 0,05$.

Na badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etyki ds. Badań na Zwierzętach nr 59/01 z dn. 12.12.2001 roku.

Wyniki i omówienie

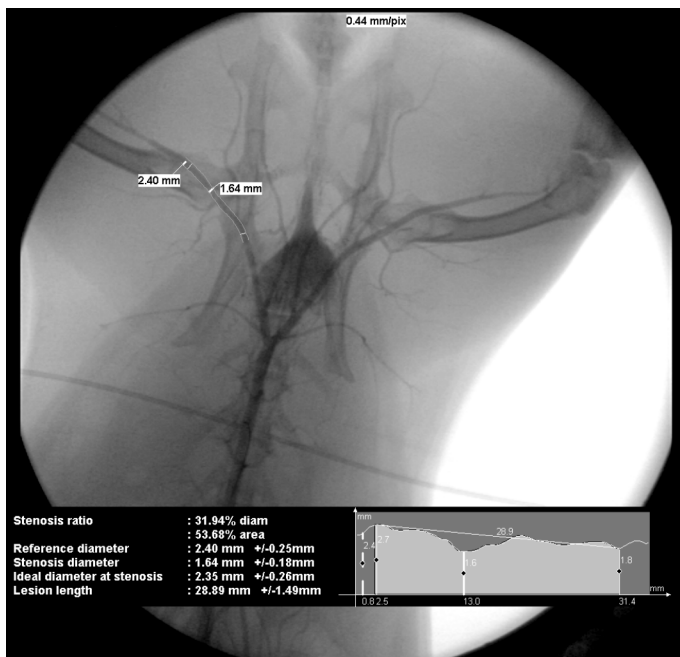
Zapotrzebowanie, a tym samym zawartość tłuszczu surowego w mieszance pełnoporcjowej dla królików wynosi wg dostępnych norm żywieniowych 3% (5). Stosowanie diety wysokotłuszczowej z 7% dodatkiem oleju arachidowego u królików spowodowało istotny statystycznie wzrost stężenia cholesterolu i frakcji LDL w surowicy już po 8 tygodniach jej podawania (ryc. 3). Po tym okresie dokonano uszkodzenia śródbłonna tętnic biodrowych celem odtworzenia warunków powstawania miażdżycy. Jednym z czynników powodujących arterosklerozę jest hipercholesterolemia, uzyskana w tym przypadku dietą z 7% dodatkiem oleju arachidowego. W badaniu krwi przeprowadzonym po kolejnych 12 tygodniach stosowania diety stwierdzono dalszy wzrost stężenia cholesterolu i frakcji LDL (ryc. 3). U królików naturalną reakcją na hipercholesterolemię jest spadek funkcji receptorów dla LDL w wąt-

robie i wzrost LDL w surowicy krwi (8), co obrazują uzyskane wyniki. Frakcja HDL nie różniła się istotnie statystycznie przez cały okres doświadczenia. Stwierdzono też istotny statystycznie wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej w ostatnim badaniu, jednak jej aktywność nie przekroczyła wartości referencyjnych (15) (tab. 2). Wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej jest

Tab. 2. Wyniki badań hematologicznych biochemicznych krwi ($x \pm SD$)

Parametr	Badanie 1 przed wprowadzeniem diety wysokotłuszczowej	Badanie 2 po 8 tyg. stosowania diety	Badanie 3 po 20 tyg. stosowania diety
Eryocyty ($10^{12}/l$)	5,5 ± 1,24	5,8 ± 1,56	4,98 ± 2,21
Leukocyty ($10^9/l$)	10,45 ± 3,2	8,98 ± 5,29	12,67 ± 6,23
Granulocyty (%)	69,87 ± 8,78	76,98 ± 4,89	71,34 ± 7,98
Limfocyty (%)	18,97 ± 5,67	14,45 ± 7,87	19,99 ± 4,98
Monocyty (%)	3,42 ± 1,43	2,52 ± 1,96	3,02 ± 1,79
Hb (mmol/l)	8,99 ± 3,34	9,79 ± 4,54	7,89 ± 6,49
Ht (l/l)	43,4 ± 6,21	40,98 ± 8,34	45,67 ± 3,96
ALT (U/l)	14,00 ± 4,72	23,00 ± 15,9	25,42 ± 2,1
AST (U/l)	32,00 ± 14,13*	35,00 ± 18,32	47,14 ± 5,3*
Mocznik (mg%)	39,14 ± 10,38	44,57 ± 4,27	44,85 ± 7,88
Kreatynina ($\mu\text{mol/l}$)	106,00 ± 14,07	111,86 ± 14,18	139,85 ± 23,34
Cholesterol (mg%)	43,41 ± 11,01*	109,14 ± 14,18*	185,14 ± 50,01*
HDL (mg%)	27,57 ± 6,78	27,85 ± 12,65	48,14 ± 14,65
LDL (mg%)	9,71 ± 5,70*	68,28 ± 19,88*	128,29 ± 47,09*
TGL (mg%)	48,28 ± 17,85	66,71 ± 27,65	61,85 ± 7,75
Bilirubina ($\mu\text{mol/l}$)	1,04 ± 0,15	1,38 ± 0,42	1,05 ± 0,27
Białko całkowite (g/l)	42,28 ± 7,15	42,42 ± 3,64	47,00 ± 4,72

Objaśnienie: * – $p < 0,05$



Ryc. 5. Obraz RTG zwężonej tętnicy biodrowej po wcześniejszym uszkodzeniu śródbłonka naczynia

związany ze zwiększonymi przemianami tłuszczu dostarczanych wraz z dietą. Pozostałe parametry biochemiczne i hematologiczne przez cały okres doświadczenia nie uległy istotnej statystycznie zmianie i nie przekroczyły wartości referencyjnych (tab. 2) (15). W większości modeli arteriosklerozy wykorzystuje się dodatek cholesterolu w diecie (1, 2, 6, 16). W naturze jednak królik nie pobiera paszy zawierającej tłuszcze zwierzęce-cholesterol, stąd też podjęto próbę opracowania skutecznej diety aterogennej bez dodatku cholesterolu. Mononienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) podnoszą stężenie LDL, działając tym samym aterogennie. Kwasy tłuszczowe wielonienasycone (PUFA) omega 3 obniżają stężenie frakcji LDL, a podnoszą stężenie frakcji HDL, działając tym samym ochronnie (9). Stwierdzono, że zarówno MUFA, jak i PUFA mogą zwiększać utlenianie cholesterolu, co prowadzi dalej do jego estryfikacji i odkładania się w naczyniach (10). Olej arachidowy zawiera 36-72% kwasu oleinowego, który jest kwasem mononienasyconym. Kwasy tłuszczowe nasycone: palmitynowy stanowi 6-16%, a stearynowy 1-7% składu oleju arachidowego. Jedynie 13% stanowi kwas linolowy, który jest kwasem nienasyconym, zawierającym dwa podwójne wiązania, jednak należącym do frakcji omega 6, która działa również aterogennie (12). Niewielki procent stanowią inne kwasy tłuszczowe, głównie nasycone. Tak mała zawartość PUFA, znaczna MUFA i nasyconych kwasów tłuszczowych w zastosowanej diecie wysokotłuszczowej z 7% dodatkiem oleju arachidowego doprowadziła w czasie 8 tygodni do hipercholesterolemii u królików. Wysokie stężenie cholesterolu i frakcji LDL oraz jego utlenienie przyczynia się w znacznym stopniu do rozwoju procesu miażdżycowego (4, 7, 8). Po mechanicznym uszkodzeniu śródbłonka tętnic biodrowych w stanie hipercholesterolemii wywołano zmiany miażdżycowe w tych naczyniach. Potwierdzone one zostały w angiografii tętnic biodrowych wykonanej po 12 tygodniach od uszkodzenia śródbłonka tętnic. W badaniu tym stwierdzono zwężenia obu tętnic biodrowych u 12 królików

(66,6%), u 6 królików (33,3%) doszło do zwężenia jednej tętnicy (ryc. 5). Uszkodzenie śródbłonka tętnic jest pierwszym i niezbędnym warunkiem do naturalnego rozwoju miażdżycy u człowieka. Uszkodzenie to uruchamia kaskadę zmian i powoduje rozwój procesu zapalnego, którego zaistnienie jest konieczne do rozwoju zmian arteriosklerotycznych (4, 7). Warunki te zostały odtworzone poprzez mechaniczne uszkodzenie tętnic biodrowych. Wiadomo, że podanie kwasu acetylosalicylowego u królików z hipercholesterolemią redukuje rozwój zmian miażdżycowych poprzez hamowanie procesu zapalnego, nie wpływając na stężenie cholesterolu we krwi (3, 8).

Podsumowanie

Zastosowanie u królików diety bogatotłuszczowej z dodatkiem 7% oleju arachidowego powoduje już po 8 tygodniach hipercholesterolemię. Uszkodzeniu śródbłonka tętnic biodrowych przy pomocy balonu do angioplastyki w stanie hipercholesterolemii prowadzi do powstania zwężenia światła naczynia. Opracowany sposób doświadczalnego wywoływania zmian, zbliżonych do procesu miażdżycowego w naczyniach, stanowi dobry model do dalszych badań nad tą chorobą.

Piśmiennictwo

1. Cimini M., Boughner D. R., Ronald J. A., Aldington L., Rogers K. A.: Development of aortic valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis: an immunohistochemical and histological study. *J. Heart Valve Dis.* 2005, 14, 365-375.
2. Drolet M. C., Arsenault M., Couet J.: Experimental aortic valve stenosis in rabbits. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003, 41, 1211-1217.
3. Guo Y., Wang Q. Z., Tang B. S., Zuo Y. F., Li F. M., Jiang X., Wang L., Ma K. F.: Effects of aspirin on atherosclerosis and the cyclooxygenase-2 expression in atherosclerotic rabbits. *Chin. Med. J.* 2006, 119, 1808-1814.
4. Hansson G. K.: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 1685-1695.
5. Jamroz D.: Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo. PWN, Warszawa 2001, 396-403.
6. Jia X., Huo Y., Zhu G.: Relationship of vascular remodeling and restenosis after interventional therapy: an experimental study on rabbit atherosclerotic iliac artery model. *Chin. Med. J.* 1999, 112, 400-403.
7. Knopp R. H.: Drug treatment of lipid disorders. *N. Engl. J. Med.* 1999, 341, 498-511.
8. Kouraklis G., Patapis E., Misiakos E., Glinavau A., Sioka C., Karayiannakos P.: Effects of acetylosalicylic acid on experimental atherosclerosis induced in rabbits. *Int. Angiol.* 2004, 23, 139-143.
9. Kritchevsky D., Tepper S. A., Wright S., Czarnecki S., Wilson T., Nicolosi R.: Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis: avocado oil. *J. Am. Coll. Nutr.* 2003, 22, 52-55.
10. Nicolosi R., Wilson T., Foxall T., Kaenay F., Vita J.: Decreased aortic fatty streak formation in hamsters fed diets high in monounsaturated fat versus polyunsaturated fat. *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 392-402.
11. Noszczyk-Nowak A., Pasławska U., Skrzypczak P., Gajek J., Zysko D.: Modyfikacja własna metody Selingera wprowadzania cewnika do żyły szynowej wewnętrznej. *Magazyn Wet.* 2006, 6, 44-46.
12. Ramasamy S., Boissonneault G. A., Decker E. A., Hennig B.: Linoleic acid-induced endothelial cell injury: role of membrane-bound enzymes and lipid oxidation. *J. Biochem. Toxicol.* 1991, 1, 29-35.
13. Ross R.: Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, 115-126.
14. Szczeklik A.: Choroby wewnętrzne. Medycyna Praktyczna, Kraków 2005, s. 135.
15. Winnicka A.: Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. SGGW, Warszawa 1997, s. 100, 111.
16. Wojakowski W., Gminski J., Siemianowicz K., Goss M., Machalski M.: The influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the aorta elastin metabolism in diet-induced hypercholesterolaemia in rabbits. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* 2001, 2, 37-42.

Adres autora: dr Agnieszka Noszczyk-Nowak, pl. Grunwaldzki 47, 50-314 Wrocław; e-mail: agnieszkan@poczta.onet.pl