

ВОССТАНОВЛЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МАГИСТРАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ СУЛЬФАТИРОВАННОЙ ФОРМЫ ХИТОЗАНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

DOI: 10.17691/stm2017.9.4.14

УДК 611.018.74:615.035.4:616.13–004.6

Поступила 5.04.2017 г.



А.К. Кириченко, д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии им. П.Г. Подзолкова с курсом последипломного образования;

А.В. Шульмин, д.м.н., профессор кафедры общественного здоровья и здравоохранения с курсом социальной работы;

А.Ф. Шаркова, студент кафедры патологической анатомии им. П.Г. Подзолкова с курсом последипломного образования;

Н.Н. Патлатая, к.м.н., ассистент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии;

И.Н. Большаков, д.м.н., профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии

Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, 660022, ул. Партизана Железняка, 1

Цель исследования — демонстрация восстановления морфологической структуры магистральных артерий задних конечностей кроликов в модели атеросклероза путем периваскулярной имплантации сульфатированной формы хитозана.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 24 кроликах, распределенных на четыре группы по 6 животных. Опытной группе кроликов, которая находилась на интенсивной холестериновой диете в течение 110 сут, в околососудистый фасциальный футляр артерии сафена и бедренной артерии левой задней конечности имплантировали 1% гель сульфатированного водорастворимого хитозана. Части животных, также находившихся на холестериновой диете, имплантацию не выполняли. Группа кроликов, получавшая обычную диету вивария, подвергалась периваскулярной имплантации биополимера, а серия из 6 кроликов, тоже находившаяся на обычной диете, служила в качестве интактного контроля. Оценивали толщину стенки бедренной артерии, артерии сафена, средний диаметр их просвета, среднюю площадь просвета новообразованных сосудов в адвентиции.

Результаты. Ежедневная интенсивная холестериновая диета у кроликов в течение 3,5 мес приводит к формированию ярких признаков атерогенного воспаления в интимном и среднем слоях магистральных артерий задних конечностей. Введение в паравазальный футляр бедренной артерии и артерии сафена 1% геля сульфатированного водорастворимого хитозана стимулирует новообразование большого числа микрососудов в месте резорбции полимера, увеличивая удельную площадь новых сосудов. Морфологическая реконструкция магистральных артерий достигнута за счет снижения толщины сосудистой стенки, увеличения просвета сосуда и роста числа микрососудов параадвентициального ложа.

Заключение. Имплантация сульфатированного хитозана в периваскулярный футляр позволяет достичь эффекта терапевтического паравазального ангиогенеза и снижения ранних признаков атерогенного воспаления.

Ключевые слова: атерогенное воспаление; периваскулярная имплантация хитозана; ишемия задних конечностей; терапевтический ангиогенез; морфологическая реконструкция стенки сосуда; биodeградируемый полимер.

Как цитировать: Kirichenko A.K., Shulmin A.V., Sharkova A.F., Patlataya N.N., Bolshakov I.N. Morphological reconstruction of main arteries by perivascular implantation of sulfated chitosan in experimental atherosclerosis. *Modern Tehnologies in Medicine* 2017; 9(4): 115–122, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.14>

Для контактов: Большаков Игорь Николаевич, e-mail: bol.bol@mail.ru

Morphological Reconstruction of Main Arteries by Perivascular Implantation of Sulfated Chitosan in Experimental Atherosclerosis

A.K. Kirichenko, MD, DSc, Professor, Pathological Anatomy Department named after P.G. Podzolkov with the Course of Postgraduate Education;

A.V. Shulmin, MD, DSc, Professor, Department of Public Health and Healthcare with the Course of Social Work;

A.F. Sharkova, Student, Pathological Anatomy Department named after P. G. Podzolkov with the Course of Postgraduate Education;

N.N. Patlataya, MD, PhD, Teaching Assistant, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy;

I.N. Bolshakov, MD, DSc, Professor, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, 1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

The aim of the study is to demonstrate morphological reconstruction of the main arteries of rabbit hind limbs by perivascular implantation of sulfated chitosan in an atherosclerosis model.

Materials and Methods. The study was performed on 24 rabbits divided into four groups of 6 animals. The rabbits in the experimental group kept on intensive cholesterol diet for 110 days were implanted 1% water-soluble sulfated chitosan gel in the perivascular fascial compartment of the saphenous artery and the femoral artery of the left hind limb. Some animals that were also kept on cholesterol diet did not undergo implantation. The group of rabbits fed with normal vivarium diet were subjected to perivascular implantation of the biopolymer, while a group of 6 rabbits also kept on normal diet served as the intact control. We estimated wall thickness of the femoral artery and the saphenous artery, their average lumen diameter, the mean lumen area of the newly formed vessels in the adventitia.

Results. Daily intensive cholesterol diet for 3.5 months in rabbits leads to vivid signs of atherogenic inflammation forming in the intimal and medial layers of the main arteries of the hind limbs. Introduction of 1% water-soluble sulfated chitosan gel into the paravasal compartment of the saphenous and femoral arteries promotes formation of a large number of microvessels at the polymer resorption site increasing the specific area of new vessels. Morphological reconstruction of the main arteries is achieved through reducing the vascular wall thickness, increasing the vessel lumen and the number of para-adventitial microvessels.

Conclusion. Implantation of sulfated chitosan into the perivascular compartment allows achieving the effect of therapeutic paravasal angiogenesis and inhibiting the early signs of atherogenic inflammation.

Key words: atherogenic inflammation; perivascular implantation of chitosan; ischemia of the hind limbs; therapeutic angiogenesis; morphological reconstruction of the vessel wall; biodegradable polymer.

Атеросклероз считается одной из основных причин заболеваемости и смертности в высокоразвитых странах [1]. Весьма распространенной его клинико-морфологической формой является атеросклероз артерий нижних конечностей, приводящий к инвалидизации и ассоциирующийся с высоким риском смерти [1–5]. Разработка новых методов профилактики и лечения атеросклероза реализуется через управление процессом атерогенного воспаления. При этом особая роль в патогенезе атеросклероза отводится адвентиции [6, 7]. Она считается не менее важным компонентом сосудистой стенки, чем средний слой и интима, так как принимает участие в регуляции пролиферации гладкомышечных клеток среднего и внутреннего слоев сосуда при атерогенезе [8–11].

В настоящее время накопилось достаточное количество публикаций, демонстрирующих положительный эффект использования производных хитозана при лечении некоторых заболеваний, и в том числе атеро-

склероза, по причине высокой аффинности молекулы биополимера к липопротеинам низкой и очень низкой плотности. Однако холестеринснижающий эффект хитозана в многочисленных публикациях продемонстрирован при энтеральном введении биополимера или в стендовых исследованиях *in vitro*. В дополнение к этому эффекту различные по составу хитозансодержащие препараты стимулируют ангиогенез в ишемизированных тканях, что приводит к улучшению их кровоснабжения [12–14]. Однако проблема управления атерогенным воспалением в стенке магистральных артерий остается нерешенной, поскольку отсутствуют технологии прицельного подведения аффинных к холестерину биополимеров к зоне сегментарного поражения для одновременного запуска как механизма терапевтического ангиогенеза, так и механизма резорбции мягкой бляшки в подинтимном слое сосуда.

Оптимальным вариантом, предоставляющим возможности для полноценного изучения ранних при-

знаков атерогенного воспаления в стенках сосудов, уже более ста лет считается холестеринная модель атеросклероза у экспериментальных животных. Использование холестеринной диеты у кроликов породы шиншилла в течение 80–110 сут обеспечивает существенное повышение в плазме крови уровня триглицеридов, холестерина, липопротеинов фракций ЛПНП и ЛПОНП, что сопряжено с высоким уровнем липидных фракций в стенках магистральных артерий [15, 16].

Цель исследования — демонстрация восстановления морфологической структуры магистральных артерий задних конечностей кроликов в модели атеросклероза путем периваскулярной имплантации сульфатированной формы хитозана.

Материалы и методы. Исследование проведено на 24 кроликах-самцах породы шиншилла массой $3,5 \pm 0,5$ кг. При исследовании неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с нормативами, указанными в руководстве «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ILAR publication, 1996, The National Academies Press)». Работа одобрена Этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Половина животных в течение 110 сут получала стандартный рацион вивария. Другая половина — холестеринную диету с целью создания экспериментальной модели атерогенного воспаления. Диета включала следующий комплекс ингредиентов: 0,8 г холестерина на 1 кг массы тела кролика в нерафинированном подсолнечном растительном масле. Данную смесь кролики получали ежедневно на протяжении всего эксперимента, к воде доступ был свободный. Один раз в неделю в рацион добавлялись сырые овощи. На 80-е сутки эксперимента шесть кроликов, находившихся на холестеринной диете, и шесть кроликов, получавших стандартный рацион вивария, подвергали периваскулярной имплантации 1% геля сульфатированного водорастворимого хитозана (β 1,4D-глюкопиранозид-N-метил-сульфат натрия, мол. масса — 250 кДа, степень дезацетилирования — 85%).

Технология имплантации биополимера состояла в следующем: под общей анестезией кроликам на задней конечности в нижней трети голени в проекции магистрального сосудисто-нервного пучка производилось рассечение кожных покровов и подкожно-жировой клетчатки; в паравазальное фасциальное ложе артерии сафена с помощью шприца объемом 5 мл и одетой на него пластиковой канюли вводился в гелевой форме 1% сульфатированный водорастворимый хитозан в объеме 4 мл с расчетом на распростране-

ние продукта в ложе бедренной артерии до уровня паховой складки. Рану закрывали однорядными швами, накладывали асептическую марлевую повязку. Смену повязки осуществляли ежедневно с применением антибактериальных средств до полного заживления кожной раны.

Для исследования все кролики были разделены на 4 группы по 6 животных. Животные 1-й группы получали стандартный рацион вивария и служили группой интактного контроля. 2-я группа находилась на холестеринной диете и не получала имплантацию биополимера. Животные 3-й группы, получавшие обычный рацион вивария, подверглись имплантации сульфатированного хитозана объемом 4 мл в область периаортального фасциального футляра артерий левой задней конечности. 4-й группе животных, получавших холестеринную диету, идентично вводили хитозан.

Условия проведения эксперимента были одинаковыми для кроликов контрольной и опытных групп. Всех животных выводили из эксперимента на 110-е сутки. У всех проводили забор мягких тканей бедра и голени обеих задних конечностей, включающих магистральный сосудисто-нервный пучок, для выполнения гистологического исследования. Образцы тканей фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин по общепринятой методике и изготавливали гистологические срезы толщиной 3–4 мкм с последующей окраской гематоксилином и эозином. Микропрепараты подвергали обзорной микроскопии и морфометрическому исследованию с помощью программы JMicroVision v. 1.2.7. Количественная оценка включала определение толщины стенки бедренной артерии и артерии сафена, среднего диаметра и средней площади их просветов. Измерение каждого показателя производили в 5 срезах при увеличении 100. Микрофотографии получены с помощью микроскопа Axio Imager A1 с системой фотосъемки AxioCam MRc5 и программой Axio Vision (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 100, 200 и 400.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы SPSS20. Описательные статистики представлены абсолютными значениями и статистическими коэффициентами. Для оценки нормальности распределения использовали критерии Шапиро–Уилка (W) и Колмогорова–Смирнова. Для непараметрических учетных признаков описательные статистики представлены медианой и процентилями (Me [25; 75]). Общее межгрупповое сравнение проводили по критерию Краскела–Уоллисса, а затем попарное сравнение — по критерию Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. При обзорной микроскопии стенки артерий интактных животных имеют обычное строение, равномерную толщину (рис. 1). Адвентиция образована рыхлой волокнистой соединительной тканью, которая без четких границ переходит в периваскулярную

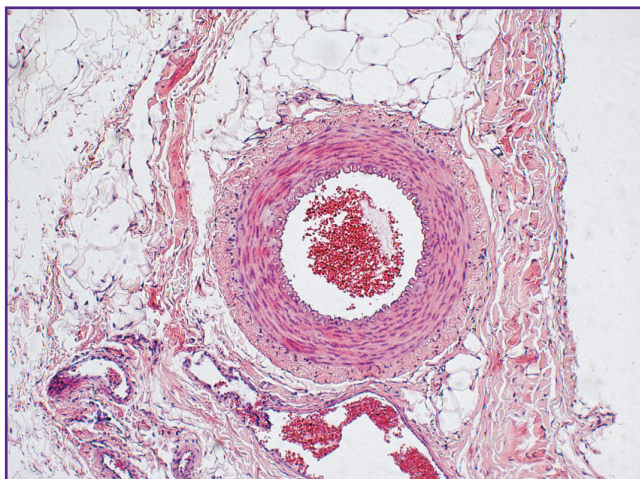


Рис. 1. Поперечный срез бедренной артерии интактно-го животного; $\times 200$; окраска гематоксилином и эозином

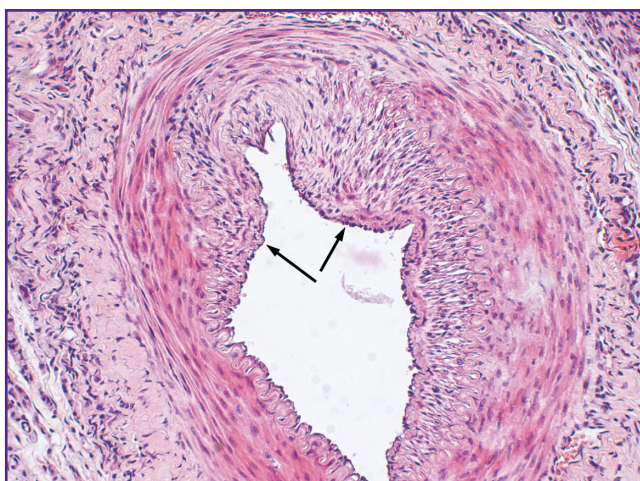


Рис. 2. Экспериментальное атерогенное воспаление, сегментарное утолщение стенки бедренной артерии с формированием мягких бляшек (показаны стрелками), основу которых составляют активно пролиферирующие фибробласты и гладкомышечные клетки субэндотелиальной оболочки; $\times 200$; окраска гематоксилином и эозином

соединительную ткань, содержащую немногочисленные мелкие сосуды.

Морфологические изменения в стенках артерий подопытных животных 2-й группы при экспериментальном моделировании атерогенного воспаления являются свидетельством его начальных стадий. На поперечных срезах сосудов интима имеет вид прерывистой выстилки, что обусловлено частичной деструкцией эндотелиоцитов (рис. 2). Сохранившиеся клетки эндотелия обладают неравномерно расположенными гиперхромными ядрами, выступающими в сосудистый просвет. Стенки сегментарно утолщены с формированием бляшек, основу которых составляют активно пролиферирующие фибробласты и гладко-

мышечные клетки субэндотелиальной оболочки. Ядра последних в этих местах располагаются в несколько рядов, перпендикулярно внутренней поверхности сосуда. Волокнистые структуры бляшки местами имеют рыхлый вид, что является свидетельством мукоидного отека. Интима лишена складчатости, внутренняя эластическая мембрана смещена в глубь сосудистой стенки. Средняя оболочка артерий под бляшкой истончена. В трех случайных наблюдениях в месте утолщения артериальной стенки отдельные миоциты средней оболочки имеют вакуолизированную, оптически пустую цитоплазму, что подтверждает их трансформацию в ксантомные клетки (рис. 3). Рыхлая волокнистая соединительная ткань адвентиции содержит располагающиеся небольшими группами неравномерно полнокровные узкие кровеносные сосуды.

Имплантиция в периваскулярную клетчатку полисахаридного биополимера во всех случаях 3-й и 4-й групп сопровождается местной ответной тканевой реакцией. На момент выведения животных из эксперимента реакция имеет признаки хронического продуктивного воспаления вокруг инородных тел. Импантированный биополимер в обеих группах подвергся частичной резорбции. Его небольшие депозиты рассеяны на участках различной площади. В местах их локализации определяются скопления макрофагов в виде разрозненных небольших групп, местами располагающихся по ходу межтканевых промежутков и в виде муфт вокруг нервных волокон и кровеносных сосудов. В составе макрофагальных инфильтратов присутствуют ксантомные клетки, имеющие полигональные очертания, небольшое гиперхромное ядро и слабо базофильную «пенистую» вида цитоплазму. Не меньшее представительство имеют гигантские многоядерные клетки, характеризующиеся интенсивно окрашенной амфобильной цитоплазмой, содержащей беспорядочно распределенные гиперхромные ядра

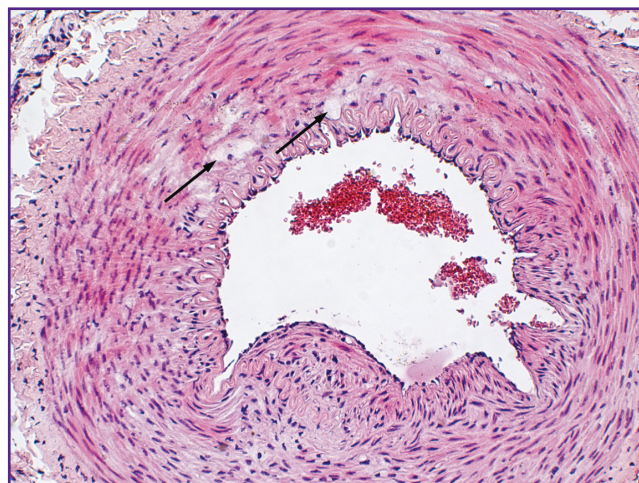


Рис. 3. Экспериментальное атерогенное воспаление; ксантомные клетки в стенке артерии (показаны стрелками); $\times 200$; окраска гематоксилином и эозином

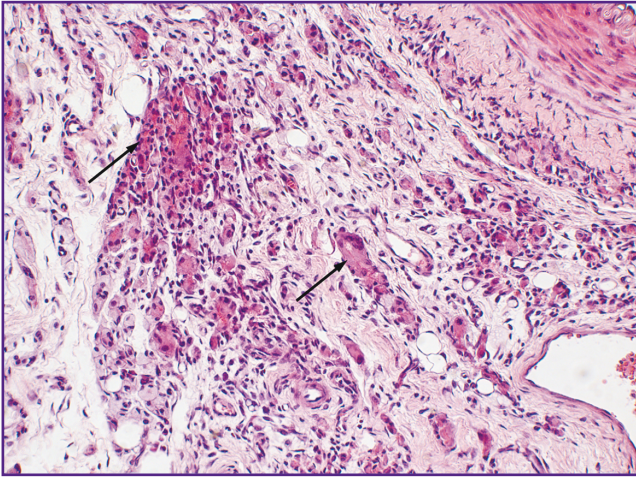


Рис. 4. Обилие гигантских многоядерных клеток в месте введения полисахаридного биополимера в периваскулярный слой (показано стрелками); $\times 200$; окраска гематоксилином и эозином

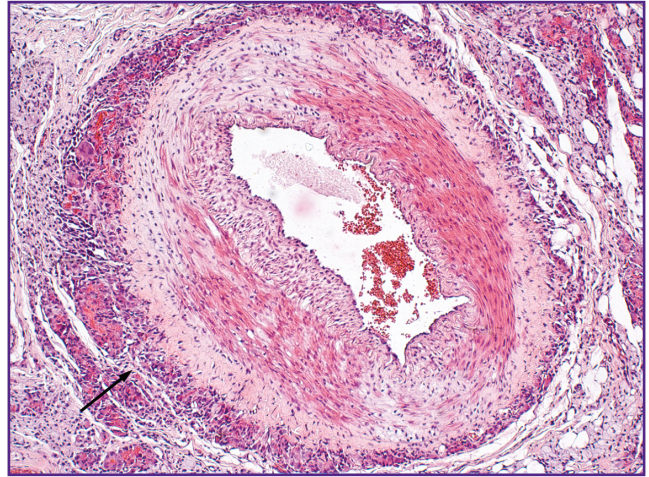


Рис. 6. Макрофагальная реакция определяется в паравазальной клетчатке по всей окружности артерии в месте введения биополимера (показано стрелкой); $\times 100$; окраска гематоксилином и эозином

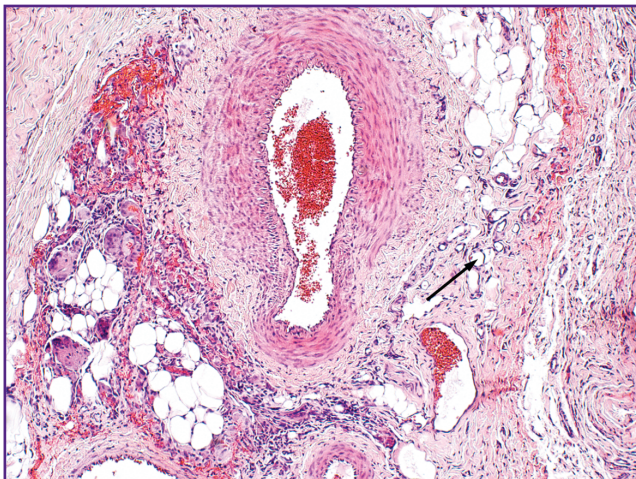


Рис. 5. Многочисленные мелкие сосуды в паравазальной клетчатке в зоне введения биополимера (показано стрелкой); в левой части снимка — продуктивное воспаление; $\times 100$; окраска гематоксилином и эозином

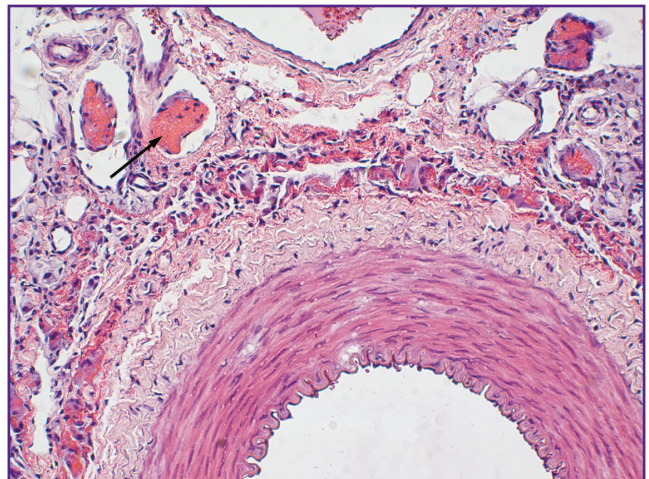


Рис. 7. Дегградация биополимера (показано стрелкой), воспалительная реакция в адвентиции, активный неангиогенез, равномерная, умеренная толщина стенки бедренной артерии кролика, получавшего холестериную диету, после введения хитозана; $\times 200$; окраска гематоксилином и эозином

вытянутой и округлой формы (рис. 4). В меньшем количестве, чем макрофаги, в инфильтратах присутствуют лимфоциты.

Продуктивная макрофагальная тканевая реакция сопровождается появлением многочисленных мелких кровеносных сосудов, являющихся неотъемлемой частью очагов воспаления у животных обеих групп с имплантацией биополимера (рис. 5). Ксантомные и многоядерные клетки, активные макрофаги в большинстве наблюдений окаймляют по всей окружности бедренную артерию (рис. 6). В одном наблюдении макрофагальный инфильтрат контактирует снаружи с частью стенки артерии, которая в этом месте заметно истончена.

Внешней границей артерий у кроликов обеих групп после имплантации служит наружная эластическая мембрана, имеющая вид слабозозинофильной гомогенной структуры полосы, содержащая фиброцитоподобные, малодифференцированные клетки и мелкие вновь образованные кровеносные сосуды. Очертания наружной границы сосуда размыты. Гладкомышечные клетки в составе бляшек имеют ядра вытянутой формы, меньшую плотность распределения. Активное развитие сосудистой периваскулярной сети — отличительный признак наблюдений в группах животных с применением биополимера (рис. 7).

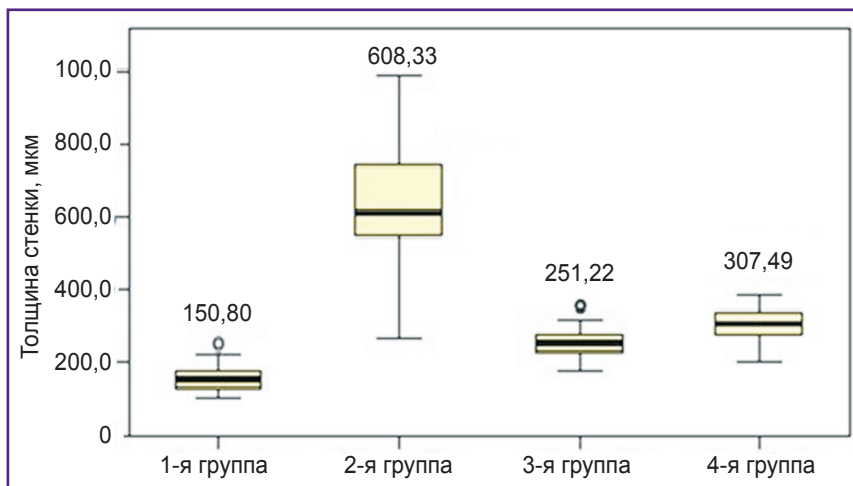


Рис. 8. Сравнительная характеристика толщины стенки бедренной артерии (интима + медиа) у исследуемых животных

В ходе морфометрического анализа срезов артерий бедра и голени кроликов установлено, что толщина сосудистой стенки артерии сафена голени интактных животных (1-я группа) статистически значительно меньше, чем у кроликов, которые в течение 110 сут получали холестериную диету (2-я группа), и составляет 150,80 [130,38; 177,17] против 608,33 [545,38; 748,52] мкм ($p < 0,01$). Однако у животных, содержащихся на холестериновой диете (4-я группа), после имплантации 1% геля сульфатированного хитозана отмечается статистически значимое уменьшение толщины сосудистой стенки до 307,49 [257,48; 334,10] мкм ($p < 0,01$). Толщина сосудистой стенки артерий кроликов, получавших стандартный рацион вивария (3-я группа), после имплантации составляет 251,22 [225,72; 274,74] мкм ($p < 0,01$) (рис. 8).

Изменения среднего диаметра сосудистой стенки в группах имеют статистически значимый характер. Так, в интактной группе этот показатель составляет 214,35 [201,51; 246,64] мкм, а в группе животных, получавших холестериную диету без имплантации биополимера, — 137,58 [124,38; 141,14] мкм ($p < 0,05$). При имплантации 1% геля сульфатированного хитозана у кроликов, получавших холестериную диету, отмечается статистически значимое увеличение среднего диаметра магистрального сосуда, которое составляет 163,39 [157,32; 170,83] мкм ($p < 0,05$). У животных, находившихся на стандартном рационе вивария без имплантации биополимера, этот параметр отличается от показателя в контрольной группе менее значительно — 201,32 [189,26; 214,57] мкм ($p < 0,05$).

Имплантация в паравазальное ложе 1% геля сульфатированного водорастворимого хитозана животным, находившимся на холестериновой диете, приводит к увеличению площади просвета дополнительных сосудов паравазального ложа по сравнению с группой животных, получавших холестериную диету без имплантации полимера — 421,52 [409,89; 435,11] и

294,16 [280,67; 315,21] мкм соответственно ($p < 0,05$).

Наряду с этим отмечается активация пролиферации коллатеральных сосудов рядом с артериальной магистралью после имплантации биополимера у животных на стандартной диете вивария, что влечет за собой улучшение перфузии мягких тканей и оценивается нами как положительный результат терапевтического ангиогенеза.

Обсуждение. Полученные результаты позволяют считать, что экспериментальное атерогенное воспаление в магистральных артериях кроликов морфологически проявляется в формировании типичной липидной («мягкой») бляшки, покрытой фиброзной оболочкой

и приводящей к уменьшению диаметра просвета сосуда. В толще бляшки развиваются межучечный отек, пролиферация субинтимально и в медиі гладких миоцитов, возникают скопления ксантомных клеток. Эти изменения на 110-е сутки холестериновой диеты соответствуют стадии липоидоза и не противоречат ранее опубликованным данным [4, 7, 17, 18].

Морфологические изменения в стенках артерий, обусловленные имплантацией полисахаридного биополимера, сводятся к снижению активности пролиферации гладкомышечных элементов, уменьшению отека и, соответственно, толщины артериальной стенки, что объективно подтверждается результатами морфометрии. В связи с тем, что адвентициальная функционально сопряжена со средним и интимным слоями магистральных сосудов и активно включена в атерогенное воспаление, важно, чтобы адвентициальный и параадвентициальный слои заняли основное место при выполнении терапевтического вмешательства и доставки лекарственных средств, что позволит эффективно решать вопросы управления воспалительным процессом, включая атерогенез [10]. Кроме достижения эффекта терапевтического ангиогенеза, хитозановые сополимеры создают непосредственный контакт с атерогенными продуктами в субэндотелиальном пространстве магистральных артерий в силу электростатических, концентрационных и аффинных взаимодействий, а точнее, с холестеринсодержащими молекулами не только липидного ядра мягких бляшек, но и «пенистых» клеток интимного слоя. Эксперименты показали, что введение биополимеров в зоне адвентиции при открытом или закрытом хирургическом вмешательстве позволит уменьшить толщину интимы, будет тормозить рестеноз, отрицательное ремоделирование [9].

Таким образом, периваскулярное введение полисахаридного биополимера хитозана открывает перспективы для смещения центра атерогенного воспаления

из субинтимальной в околоадвентициальную область, при этом большое значение будет иметь усиление неоангиогенеза в зоне воспаления вокруг инородного тела, что способствует лучшей оксигенации ишемизированных тканей. В то же время стимуляция ангиогенеза, сопровождающаяся активацией таких факторов, как эндотелиальный сосудистый фактор роста (VEGF) и фактор роста фибробластов (FGF), в итоге может вызвать пролиферацию эндотелия и формирование васкуляризированных атероматозных очагов, т.е. прогрессирование атерогенеза [19].

Заключение. Технология имплантации 1% геля сульфатированного водорастворимого хитозана в периваскулярный футляр магистральных артерий конечности при экспериментальном атеросклерозе позволяет достичь эффекта терапевтического паравазального ангиогенеза и снижения ранних признаков атерогенного воспаления. Это дает основания оценивать предложенный метод как перспективный при лечении хронической ишемии нижних конечностей, вызванной атеросклерозом. Механизмы, лежащие в основе торможения атерогенеза выраженным продуктивным пери- и параваскулярным воспалительным процессом, требуют детального морфологического и маркерного молекулярного анализа.

Финансирование исследования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта №16-44-240506.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Литература/References

1. Аронов Д.М. Социальные аспекты атеросклероза и методы его лечения. *Русский медицинский журнал* 2000; 7: 276. Aronov D.M. Social aspects of atherosclerosis and methods of its treatment. *Russkiy meditsinskiy zhurnal* 2000; 7: 276.
2. Андожская Ю.С., Гирина М.Б., Васина Е.Ю. Современные методы оценки микроциркуляции в эфферентной терапии при лечении больных с атеросклерозом. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 2002; 1(1): 52–59. Andozhskaya Yu.S., Girina M.B., Vasina E.Yu. Present-day methods of microcirculation estimate in efferent therapy of patients with atherosclerosis. *Regionaroe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya* 2002; 1(1): 52–59.
3. Карпов Ю.А., Сорокин Е.В. Интенсивное медикаментозное лечение больных с атеросклерозом. *Кардиология* 2005; 45(8): 4–7. Karpov Yu.A., Sorokin E.V. Intensive medical treatment of patients with atherosclerosis. *Kardiologiya* 2005; 45(8): 4–7.
4. Клименко Е.Д., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б., Хабарина И.Ю. Состояние системы микроциркуляции при длительной регрессии ранних стадий атерогенеза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1988; 105(3): 365–368. Klimenko E.D., Kobozeva L.P.,

Michunskaya A.B., Khabarina I.Iu. Function of the microcirculatory system during the long-term regression of the early stages of atherogenesis. *Biull Eksp Biol Med* 1988; 105(3): 365–368.

5. Dua A., Lee J.C. Epidemiology of peripheral arterial disease and critical limb ischemia. *Tech Vasc Interv Radiol* 2016; 19(2): 91–95, <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2016.04.001>.

6. Auger F.A., D'Orléans-Juste P., Germain L. Adventitial contribution to vascular contraction: hints provided by tissue-engineered substitutes. *Cardiovasc Res* 2007; 75(4): 669–678, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.06.001>.

7. Laflamme K., Roberge C.J., Grenier G., Rémy-Zolghadri M., Pouliot S., Baker K., Labbé R., D'Orléans-Juste P., Auger F.A., Germain L. Adventitia contribution in vascular tone: insights from adventitia-derived cells in a tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 2006; 20(8): 1245–1247, <https://doi.org/10.1096/fj.05-4702fje>.

8. Ni W., Kitamoto S., Ishibashi M., Usui M., Inoue S., Hiasa K., Zhao Q., Nishida K., Takeshita A., Egashira K. Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(3): 534–539, <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000118275.60121.2b>.

9. Nugent H.M., Sjin R.T., White D., Milton L.G., Manson R.J., Lawson J.H., Edelman E.R. Adventitial endothelial implants reduce matrix metalloproteinase-2 expression and increase luminal diameter in porcine arteriovenous grafts. *J Vasc Surg* 2007; 46(3): 548–556, <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2007.04.074>.

10. Pagano P.J., Gutterman D.D. The adventitia: the outs and ins of vascular disease. *Cardiovasc Res* 2007; 75(4): 636–639, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.07.006>.

11. Rey F.E., Pagano P.J. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(12): 1962–1971, <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000043452.30772.18>.

12. Большаков И.Н., Шестакова Л.А., Котиков А.Р., Каптюк Г.И. Экспериментальный атерогенез у крыс. Морфологическая реконструкция стенки магистральной артерии полисахаридными биополимерами. *Фундаментальные исследования* 2013; 10–3: 557–563. Bolshakov I.N., Shestakova L.A., Kotikov A.R., Kaptyuk G.I. Experimental atherosclerosis in rats. morphological reconstruction of the main artery wall with the polysaccharide biopolymers. *Fundamental'nye issledovaniya* 2013; 10–3: 557–563.

13. Kim S., Kawai T., Wang D., Yang Y. Engineering a dual-layer chitosan-lactide hydrogel to create endothelial cell aggregate-induced microvascular networks in vitro and increase blood perfusion in vivo. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016; 8(30): 19245–19255, <https://doi.org/10.1021/acsami.6b04431>.

14. Lee S., Valmikinathan C.M., Byun J., Kim S., Lee G., Mokarram N., Pai S.B., Um E., Bellamkonda R.V., Yoon Y.S. Enhanced therapeutic neovascularization by CD31-expressing cells and embryonic stem cell-derived endothelial cells engineered with chitosan hydrogel containing VEGF-releasing microtubes. *Biomaterials* 2015; 63: 158–167, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.06.009>.

15. Большаков И.Н., Долгих О.А., Кириченко А.К., Котиков А.Р., Горбунова В.О. Липидный спектр и микроциркуляция при использовании биополимеров в модели атерогенеза. *Фундаментальные исследования* 2009;

S7: 41–42. Bolshakov I.N., Dolgikh O.A., Kirichenko A.K., Kotikov A.R., Gorbunova V.O. Lipid spectrum and microcirculation when using biopolymers in an atherogenesis model. *Fundamental'nye issledovaniya* 2009; S7: 41–42.

16. Климов А.Н., Парфенова Н.С., Голиков Ю.П. К 100-летию создания холестериновой модели атеросклероза. Биомедицинская химия 2012; 58(1): 5–11. Klimov A.N., Parfenova N.S., Golikov Y.P. One century of the cholesterol model of atherosclerosis. *Biomeditsinskaya khimiya* 2012; 58(1): 5–11.

17. Большаков И.Н., Шестакова Л.А., Котиков А.Р., Каптюк Г.И. Экспериментальное атерогенное воспаление магистральных артерий у кроликов. Малоинвазивная технология морфологической реконструкции сосудистой стенки на ранних стадиях атерогенеза. Фундаментальные

исследования 2013; 8–2: 343–350. Bolshakov I.N., Shestakova L.A., Kotikov A.R., Kaptyuk G.I. The experimental atherosclerotic inflammation of the main arteries in rabbits. Low traumatic technology of morphological reconstruction of the vascular wall at the early atherosclerotic stages. *Fundamental'nye issledovaniya* 2013; 8–2: 343–350.

18. Дзяк Г.В., Коваль Е.Л. Атеросклероз и воспаление. Проблема старения и долголетия 1999; 3: 316–326. Dzyak G.V., Koval' E.L. Atherosclerosis and inflammation. *Problema stareniya i dolgoletiya* 1999; 3: 316–326.

19. Liu M.H., Tang Z.H., Li G.H., Qu S.L., Zhang Y., Ren Z., Liu L.S., Jiang Z.S. Janus-like role of fibroblast growth factor 2 in arteriosclerotic coronary artery disease: atherogenesis and angiogenesis. *Atherosclerosis* 2013; 229(1): 10–17, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.013>.