



# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК: 616.13/14-092.4-089.843

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ДЕВИТАЛИЗИРОВАННЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Д. В. Бызов, Н. А. Чиж, И. П. Михайлова, Е. В. Шевченко,  
А. Г. Манченко, Б. П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## TRANSPLANTATION OF DEVITALIZED VASCULAR PROSTHESES OF A SMALL DIAMETER IN EXPERIMENT

D. V. Byzov, N. A. Chizh, I. P. Mikhaylova, E. V. Shevchenko,  
A. G. Manchenko, B. P. Sandomirskiy

Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkov

Органическое поражение сердечно—сосудистой системы является одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения в мире, превышая их уровень от всех видов онкологических заболеваний.

Наиболее распространенным, а часто и единственно возможным хирургическим методом лечения обструктивного поражения артерий является реконструкция пораженного участка с использованием различных сосудистых протезов [1]. Современные хирургические технологии позволяют минимизировать риск практически любой сосудистой реконструктивной операции, улучшить качество и продолжительность жизни пациентов. При этом результаты таких операций во многом определяются видом и качеством используемых протезов [2].

Перспективным направлением в современной биоинженерии является разработка биологических кардиоваскулярных имплантатов. Из всех используемых сегодня подходов применение девитализированных ксенотрансплантатов представляется наиболее перспективным [3, 4]. Естественные биологические ткани в значительной мере превосходят синтетические материалы в качестве имплантатов, и, в зависимо-

### Реферат

Внедрение в клиническую практику новых поколений сосудистых протезов требует предварительного проведения доклинических исследований *in vivo*. Представлены результаты протезирования брюшной части аорты (БЧА) кроля с использованием сосудистых ксенотрансплантатов, обработанных криорадиационным способом. Последовательно изложены хирургические этапы экспериментальной сосудистой трансплантации. По результатам ультразвукового исследования оценено морфофункциональное состояние сосудистого протеза, установлено, что через 2 года после трансплантации происходит некоторое расширение внутреннего диаметра протеза, уменьшение скорости кровотока на 15% по сравнению с таковой в дистальном и проксимальном отделах аорты. По данным морфологических исследований, максимальное ремоделирование протеза отмечено через 14 мес после имплантации, оно характеризовалось замещением внутренней и наружной трети его стенки новообразованными соединительнотканными волокнами реципиента.

**Ключевые слова:** трансплантация; протезирование; сосудистый ксенотрансплантат; эксперимент.

### Abstract

Introduction of new generations of vascular prostheses into clinical practice demands preliminary conduction of preclinical investigations *in vivo*. Results of the rabbit abdominal aorta prosthesis, using vascular xenotransplants, finished with the help of cryoradiation method, were demonstrated. Surgical stages of experimental vascular transplantation were expounded in series. Taking into account the ultrasonographic investigation results concerning morphofunctional state of vascular prosthesis, there was established, that in 2 yrs after transplantation some dilation of the prosthesis internal diameter occurs, and the blood flow velocity become reduced by 15% in comparison with such in distal and proximal parts of aorta. In accordance to morphological investigations data, maximal remodeling of prosthesis was noted in 14 mo after implantation, it was characterized by replacement of internal and external third part of wall by a newly formed connective tissue fibers of a recipient.

**Keywords:** transplantation; prosthesis; vascular xenotransplant; experiment.

сти от метода обработки, могут проявлять механические свойства, подобные таковым нативных тканей. После имплантации таких ксенотрансплантатов в организме реципиента

происходит их постепенное преобразование, замещение аутологичным внеклеточным матриксом, формируемым собственными клетками реципиента [5, 6].

В последнее время акцентируют внимание на перспективности использования различных физических факторов для девитализации кардиоваскулярных тканей в целях снижения иммуногенности при создании биологических имплантатов [4, 7]. В Институте разработана технология девитализации артерий свиньи путем комбинированного действия холодого фактора и ионизирующего излучения в целях создания биологических гипоиммунных сосудистых протезов [8].

Целью исследования был анализ результатов сосудистого протезирования в эксперименте с использованием девитализированных артерий свиньи в качестве сосудистых трансплантатов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте использовали внутреннюю грудную артерию (a. thoracica interna) свиньи. Диаметр скелетированных артерий от 2,5 до 4,5 мм. После предварительной обработки сосуды помещали в стерильные криоконтейнеры и погружали в жидкий азот, где хранили до последующего этапа обработки. После отогрева проводили дискретное облучение пробирок потоком электронов с помощью линейного ускорителя электронов (ЛУЭ—1000) на базе Харьковского физико-технического института [8].

Обработанные артерии использовали в качестве сосудистых протезов для замещения участка БЧА кроля.

Работа проведена на 25 кролях породы шиншила массой тела 3 200—4 500 г с соблюдением принципов биоэтики в соответствии с Хельсинской декларацией и Законом Украины "О защите животных от жестокого обращения" (№ 1759 от 15.12.09). Методики утверждены комиссией по биоэтике Института.

**Операция.** В стерильных условиях, после достижения хирургической стадии наркоза, животных фиксировали в положении лежа на спине. Послойно выполняли нижнюю срединную лапаротомию. Участок БЧА над бифуркацией длиной 3—3,5

см мобилизовали и пережимали двумя атравматичными сосудистыми клипсами. Длительность клипирования аорты 70—90 мин. Непосредственно перед наложением клипс внутрибрюшинно вводили раствор гепарина из расчета 100 ЕД/кг для предупреждения образования тромбов в зонах клипирования сосуда. Аорту пересекали между клипсами. Подбирали подходящий по диаметру протез и моделировали его по длине от 15 до 45 мм. Между аортой и девитализированным протезом накладывали сосудистый анастомоз конец в конец с помощью узловых швов по методике Карреля в модификации Морозовой с применением атравматичного нерассасывающегося шовного материала (Prolen 7—0, "Ethicon", Германия).

Клипсы удаляли, начиная с дистальной. Осуществляли окончательный гемостаз, контролировали пульсацию на бедренных артериях. Общая длительность оперативного вмешательства около 3,5 ч. Непосредственно после операции однократно вводили раствор гепарина 100 ЕД/кг подкожно, цефтриаксон (КМП, Украина) 250 мг внутримышечно.

Для изучения скорости ремоделирования ксенотрансплантатов животных выводили из эксперимента в сроки 7, 14 сут, 6, 9, 12 и 14 мес. Морфологические изменения протезов оценивали по данным гистологических исследований с окра-

ской срезов гематоксилином и эозином.

Параметры кровотока БЧА кролей через 2 года после имплантации сосудистых протезов исследовали с помощью ультразвукового сканера "Сономед 500" (Россия) с использованием линейного датчика 7,5L38 в В— и D—режиме.

Результаты обрабатывали параметрическим методом Стьюдента—Фишера с использованием t—критерия и непараметрическим методом MANOVA.

Показатели рассчитывали с помощью программ SPSS 17.0 для Windows.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После операции умерли 7 (28%) животных вследствие острого тромбоза. У 5 из них причиной тромбоза была грубая техническая погрешность при наложении сосудистого шва и/или выраженное несоответствие диаметра сосудов (прошивание задней стенки анастомоза, гофрирование анастомоза); у 1 — в сроки до 1 мес после операции возникла острая аневризма протеза с последующим ее разрывом; у 1 — выявлена острая эмпиема плевры. У 2 оперированных животных возник парализованный задних конечностей вследствие длительного пережатия БЧА. Таким образом, летальность, непосредственно обусловленная свойствами протеза, составила 4%.

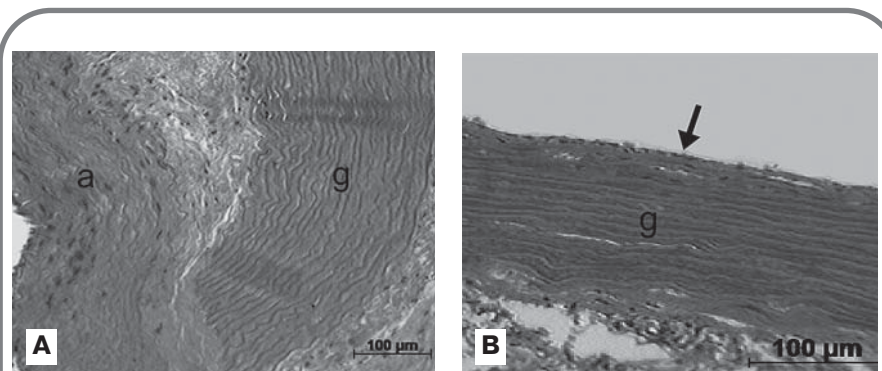


Рис. 1. Микрофото. Девитализированный протез в ранние сроки наблюдения. А - 7-е сутки после операции, зона анастомоза; В - 14-е сутки после операции; g - протез; а - аорта; стрелкой обозначена люминальная поверхность протеза. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×200.

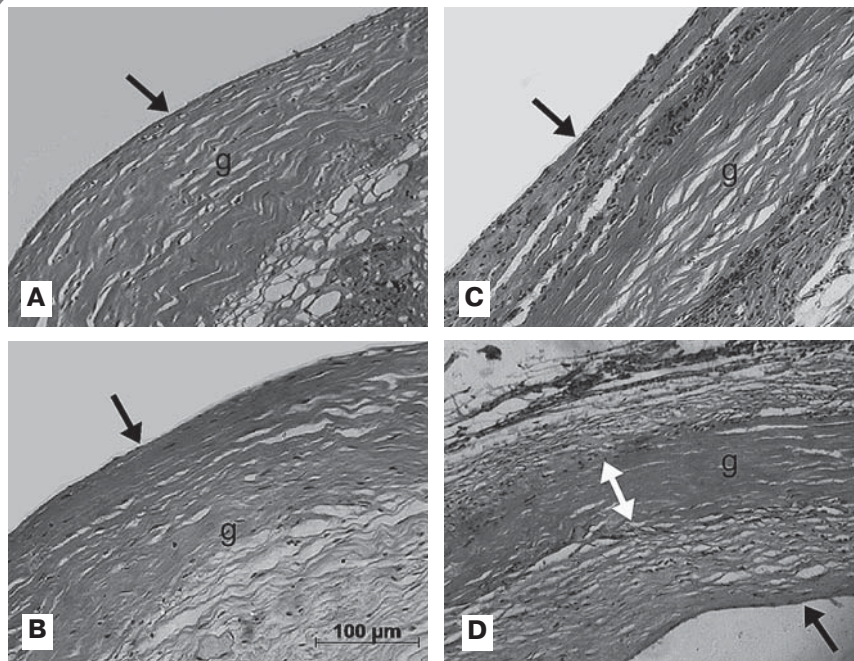


Рис. 2.  
Микрофото.

Девитализированный протез после имплантации в БЧА кроля.  
А - через 6 мес; В - через 9 мес; С - через 12 мес; D - через 14 мес; g - протез;  
черная стрелка - люминальная поверхность протеза; белая стрелка - средняя  
треть средней оболочки БЧА.  
Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$ .

Отдаленных осложнений после операции не было.

По данным гистологических исследований, на 7-е сутки после трансплантации соединительнотканная структура протеза не повреждена, представлена упорядоченно расположенными, непрерывными волокнами, без признаков биодеградации и деструктивно-некротических изменений. Фрагмен-

ты клеток не визуализировались. В зонах около анастомоза определяли отдельные группы эндотелиоцитов, стенка аорты соединена со стенкой протеза прослойками новообразованной соединительной ткани, заполняющей пространство между швами (рис. 1).

На 14-е сутки соединительнотканная структура протеза полностью сохранена. Признаки деструк-

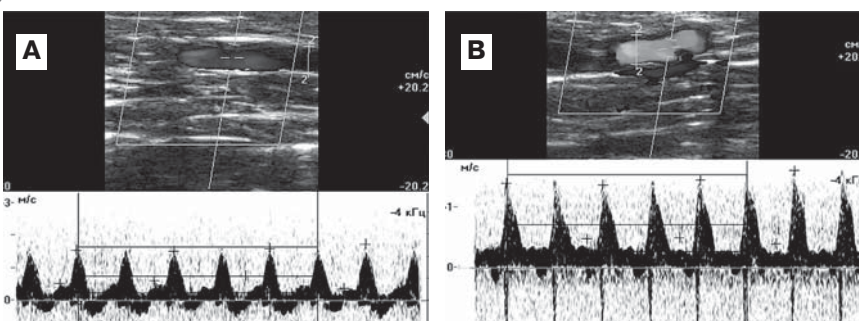


Рис. 3.

Ультрасонограмма БЧА кроля в цветовом D-режиме через 2 года после имплантации ксенопротеза.  
А - проксимальный отдел; В - протез.

тивно-некротических изменений отсутствовали, коллагеновые волокна непрерывные, целые. Реакцию иммуногенного воспаления и отторжения трансплантата не наблюдали. В области внутренней трети стенки сосудистого протеза обнаружены единичные клеточные элементы, преимущественно фибробластического ряда, что характеризовало remodelирование биологической ткани. На люминальной поверхности девитализированного протеза целостность внутренней эластической мембраны сохранена, на ней видны многочисленные группы эндотелиоцитов. Описанные изменения свидетельствуют о начале процесса формирования неointимы по люминальной поверхности сосудистого протеза.

Через 6 мес в толще стенки протеза четко определяли клеточные элементы реципиента, преимущественно макрофаги и фибробласты. Соединительнотканная структура протеза сохранена, внутренняя оболочка представлена множественными сливающимися группами эндотелиоцитов (рис. 2).

Через 9 мес наблюдения деструктивно-дегенеративные изменения биопротеза отсутствовали. В средней оболочке сосуда обнаружены единичные макрофаги, фибробласты и гладкомышечные клетки при сохранении полноценной соединительнотканной структуры стенки протеза.

Максимальное "заселение" стенки протеза клетками реципиента отмечено через 9-12 мес после трансплантации. Так, через 12 мес наблюдали значительное увеличение количества клеток, преимущественно фибробластов, в средней оболочке сосуда при сохранении целостности и упорядоченности соединительнотканной структуры девитализированного сосуда. Деструктивно-некротические изменения отсутствовали на всем протяжении протеза. Люминальная поверхность протеза визуально не отличалась от таковой стенки БЧА, пристеночных тромбов не было. На внутренней оболочке множественные участки эндотелизации. Стенка сосудистого протеза представлена целостными,



### Параметры кровотока в БЧА кроля через 2 года после трансплантации

Показатель	Величина показателя ( $\bar{x} \pm m$ )			
	до операции	в участке		
		проксимальном	протеза	дистальном
Диаметр, мм	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,8 ± 0,2	3,1 ± 0,1
Средняя скорость кровотока, см/с	69,8 ± 7,4	67,4 ± 9,9	51,7 ± 7,6	84,8 ± 11,7
Пульсационный индекс	1,49 ± 0,23	1,56 ± 0,17	1,32 ± 0,24	1,43 ± 0,22
Пульс, в 1 мин	259 ± 15	263 ± 12		

упорядоченно расположенными коллагеновыми и эластиновыми волокнами, между ними видны гладкомышечные клетки и фибробласты реципиента.

Процесс ремоделирования биологического сосудистого протеза четко определялся через 14 мес после операции. Новообразованные соединительнотканые волокна реципиента выполняли внутреннюю и наружную трети протеза, волокна средней трети стенки сосуда сохраняли структурную целостность и упорядоченность.

По данным ультразвукового сканирования оценены морфофункциональные особенности протеза в организме реципиента в динамике. При анализе данных, полученных в В-режиме, проводили количественную оценку внутреннего диаметра сосуда (см. таблицу). В сроки наблюдения до 2 лет у кролей диаметр протеза увеличился на 0,6 мм по сравнению с исходным, что отразилось на скорости кровотока и свидетельствовало о незначительном аневризматическом расширении сосудистого протеза.

При исследовании в цветовом доплеровском режиме после операции во всех отделах БЧА отмечали однородность и равномерность заполнения просвета сосуда, однако на уровне протеза наблюдали незначительное расширение цветовой картограммы (рис. 3).

При исследовании в спектральном доплеровском режиме установлено, что средняя скорость кровотока в протезе уменьшилась на 15% по сравнению со скоростью в нативном сосуде.

Пульсационный индекс, который косвенно характеризует состояние периферического сопротивления в исследуемом сосудистом бассейне, до операции составлял 1,49 ± 0,23. После имплантации в протезе он уменьшился по сравнению с таковым в проксимальном и дистальном участках аорты. Пульс в течение этого периода сохранялся на одном уровне — (263 ± 12) в 1 мин.

### ВЫВОДЫ

1. Обработанные криорадиационным способом сосудистые ксенопротезы в процессе функциониро-

вания в позиции БЧА кроля могут выдерживать длительные гемодинамические нагрузки без явных сосудистых осложнений.

2. Ранняя послеоперационная летальность отмечена на этапе обработки техники наложения сосудистого шва в эксперименте и обусловлена прошиванием задней стенки протеза и/или отсутствием конгруэнтности диаметра протеза и аорты реципиента.

3. По данным морфологических исследований, максимальное ремоделирование протеза происходило через 14 мес после имплантации, оно характеризовалось замещением внутренней и наружной трети стенки протеза новообразованными соединительноткаными волокнами реципиента.

4. По результатам ультразвукового исследования, через 2 года после имплантации в сосудистом протезе отмечали незначительное увеличение внутреннего диаметра протеза, уменьшение скорости кровотока в нем на 15%.

### ЛИТЕРАТУРА

- Slovut D. P. Surgical technique and peripheral artery disease / D. P. Slovut, E. C. Lipsitz // *Circulation*. — 2012. — Vol. 126. — P. 1127 — 1138.
- Chinta S. K. Medical textiles — vascular graft / S. K. Chinta // *Intern. J. Advanced Biol. Res.* — 2012. — Vol. 2, N 3. — P. 557 — 560.
- Teebken O. E. Tissue engineering of small diameter vascular grafts / O. E. Teebken, A. Haverich // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* — 2002. — Vol. 23. — P. 475 — 485.
- Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation / S. L. Dahl, J. Koh, V. Prabhakar, L. E. Niklason // *Cell Transplant.* — 2003. — Vol. 12. — P. 659 — 666.
- Let's understand nature better: de- and regeneration of autologous and artificial small caliber vascular grafts / W. Stoker, C. R. Wildevuur, V. W. Van Hinsbergh, L. Eijssman // *Artific. Organs.* — 1998. — Vol. 22, N 1. — P. 63 — 67.
- Campbell E. M. Investigation of a small-diameter decellularised artery as a potential scaffold for vascular tissue engineering; Biomechanical evaluation and preliminary cell seeding / E. M. Campbell, P. A. Cahill, C. Lally // *J. Mech. Behav. Biomed. Materials.* — 2012. — Vol. 14. — P. 130 — 142.
- The effect of vacuum freeze-drying and radiation on allogeneic aorta grafts / Q. Cao, L. Tao, M. Liu, M. Yin // *Molec. Med. Report.* — 2013. — Vol. 7, N 1. — P. 144 — 148.
- Пат. 68379 Украина, МПК А61L27/00, А01N1/02. Способ подготовки ксеногенных артерий для сосудистого протезирования / Б. П. Сандомирский Д. В. Бызов, И. П. Михайлова [и др.] (Украина). — Заявитель и патентообладатель ИПКиК НАН Украины. — Оpubл. 26.03.12. Бюл. №6.