

**Крохин Дмитрий Иванович**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДА  
ПОЛУЧЕНИЯ АУТОПРОТЕЗОВ ДЛЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ  
ХИРУРГИИ СОСУДОВ**

14.00.27 – Хирургия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Екатеринбург – 2007**

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования “Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию” на базе Муниципального учреждения «Городская клиническая больница № 40» г. Екатеринбурга.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Ходаков Валерий Васильевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор **Макарова Нина Петровна**

доктор медицинских наук **Левчик Евгений Юрьевич**

**Ведущая организация:** Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию”.

Защита состоится 23 мая 2007г. в \_\_\_\_ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.102.01 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования “Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию” Уральской государственной медицинской академии по адресу: 620028 г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО УГМА Росздрава (г. Екатеринбург, ул. Ключевская, 17), а с авторефератом на сайте академии [www.usma.ru](http://www.usma.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2007г.

Ученый секретарь Совета

доктор медицинских наук, профессор

**В. А. Руднов**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одной из основных проблем в современной медицине является поиск путей совершенствования и разработка принципиально новых подходов в хирургическом лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы. Еще не решен вопрос о получении эффективного материала для протезирования и шунтирования артерий малого и среднего калибра (Miller J. H. et al., 1984; Rankin J. S. et al., 1986; Weinschelbaum E. E. et al., 1997).

В клинической практике в настоящее время используется пластика артерий собственными сосудами организма – а. mammaria, а. thoracica interna, v. saphena magna, и т. д. (Лебедев Л. В. с соавт., 1997; Шнейдер Ю. А. с соавт., 2004; Miller J. H. et al., Rankin J. S. et al., 1984; Weinschelbaum E. E. et al., 1997), либо искусственными протезами (Л. А. Бокерия с соавт., Л. В. Лебедев с соавт., 1996; Лазарев С. Н. с соавт., 2000; В. Воусе, 1982). При этом указываются и недостатки данных методов. Так, например, J. H. Campbell (1999) указывает на варикозно-дегенеративные изменения вен у больных преклонного возраста, которые приводят к формированию аневризм венозных трансплантатов в условиях воздействия на них артериального давления. Аутовены в 25-30% недоступны из-за анатомического строения и использования их в предыдущих операциях (Барсуков В.Л., 1987; Campbell J. H., 1999). Известно, что после аорто-коронарного шунтирования аутовеной уже через 2-5 лет остаются проходимыми лишь 60-70% трансплантатов (Miller J. H., 1984). Шунты из аутоартерий, как правило, атеросклеротически изменены, что ограничивает возможность их применения (Шнейдер Ю. А., 2004; Miller J. H., 1984; Weinschelbaum E. E., 1997; Campbell J. H., 1999).

В 80-е годы большой интерес вызывало использование ксенопротезов, получаемых при ферментативно-химической обработке артерий млекопитающих. Они обладают нулевой хирургической порозностью, адекватными пластическими и иммунологическими свойствами (Бохуа Н. К., 1979; Сычеников И. А., 1980; Дронов А. Ф., 1983; Егембердиев Т. Ж., 1984; Леманев В. Л., 1985). Простые ксенотрансплантаты склонны к формированию аневризм и слабо резистентны к инфекции и тромботической индукции, не более 40% их остаются проходимыми в течение 6-8 месяцев (Буяновский В. Л., 1983; Барсуков В. Л., 1987; Campbell J. H., 1999). Гепаринизация их внутренней поверхности не обеспечивает необходимого антиагрегантного потенциала (Иоселиани Г. Д., Бохуа Н. К., 1979; Шумаков В. И., 1981; Доброва Н. Б., 1985; 1979; Sawyer P., 1978). Известны другие способы увеличить тромборезистентность и продолжительность функционирования ксенопротеза (Кованова В. В., 1967; Егембердиев Т. Ж., 1984; Барсуков В. Л., 1987; Sawyer P., 1978; Raghunth K., 1983).

Общеизвестно, что синтетические сосудистые протезы в отдаленные сроки после имплантации в артерии малого калибра тромбируются в 100%

случаев (Stanley J. C., Burkel W. E., 1982). Перспективны экплантопротезы с эндотелиальным покрытием, чему посвящено много работ в России и за рубежом (Абзианидзе Г. А., 1989; Stanley J. C., Burkel W. E., 1982; Shepard A. D., Eldrup-Jorgensen J., 1986; Schneider P. A. et al., Wakefield T. W., 1988). Эндотелиальное покрытие ангиоэксплантатов выполняли как аутологичными, так и культивируемыми алло - и ксенокультурами клеток интимы. Однако выделение и выращивание эндотелиальных клеток *in vitro* – дорогой и трудоемкий метод, а эндотелий таких ангиопротезов либо слущивается, либо подвергается иммунной атаке "организм против трансплантата" в относительно неотдаленные сроки (Campbell J. H., 1999). Поэтому в последние годы начаты работы по формированию сосудов из клеток различных тканевых культур.

Значительное распространение в клинической практике и научных исследованиях, посвященных проблеме лечения ишемических заболеваний, связанных с поражением артерий малого калибра, получили методы, основанные на ангиогенезе за счет имплантации стволовых клеток в ишемизированную ткань (К. Hirata, 2002; Н. F. Tse, 2003; J. Chen, 2003; А. Al-Khaldi, 2003; Н. Kamihata, 2002). Другие разработки, освященные в литературе, осуществляются несколькими путями: засеиванием биополимерных каркасов культурой гладкомышечных клеток (McKee J.A., 2003), выращиванием протезов в организме, требующем ангиопластики (Campbell J. H., 1999, 2000; Efendy J. L., 2000). Данные методы вызывают значительный научный интерес и требуют дальнейшего детального изучения. При этом недостаточно изучены механизмы формирования сосудистых аутопротезов *in vivo*, влияние регуляторных систем организма на этот процесс. Огромный интерес для ученых вызывают вопросы регуляции на клеточном уровне, межклеточных взаимодействий, регуляции роста, дифференцировки и регенерации клеток с помощью факторов роста, которые вырабатываются специфическими регуляторными клетками. Исследована и описана данная функция у макрофагов, тучных и иммунокомпетентных клеток (Юшков Б. Г., Черешнев В. А., 2002) Эти разработки послужили теоретическим обоснованием созданию современных протезов для ангиопластики.

Таким образом, имеющиеся недостатки уже разработанных методов послужили основанием для дальнейших исследований в этой области. Остается нерешенным вопрос о подходящем материале для пластики артерий малого и среднего калибра, а современные наработки в области использования стволовых клеток не являются путем решения хирургических проблем, требующих ангиопластики, а имеют терапевтический подход. Остаются недостаточно исследованными механизмы формирования сосудистых соединительнотканых аутопротезов и участие регуляторных систем организма в этом процессе.

Все выше изложенное послужило основанием для определения **цели и задач настоящего исследования.**

**Целью** исследования является получение сосудистых аутопротезов для

пластики сосудов малого калибра.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

- 1) разработать метод получения сосудистых протезов на разных видах экспериментальных животных;
- 2) дать сравнительную характеристику аутопротезов для ангиопластики, полученных в организме крыс и кроликов;
- 3) дать сравнительную характеристику аутопротезов, полученных при подкожном и внутрибрюшинном введении миллиметровых и полихлорвиниловых трубчатых имплантатов;
- 4) дать характеристику механизмов регуляции в формировании сосудистых аутопротезов;
- 5) разработать метод ангиопластики на сосудах малого калибра, на экспериментальных животных, с использованием полученных аутопротезов;
- 6) оценить эффективность метода с помощью инструментальных и морфологических исследований.

**Научная новизна** исследования состоит в том, что впервые показана (на экспериментальных животных) возможность создания и использования соединительнотканых аутопротезов для пластики сосудов малого и среднего калибра. Проведена комплексная оценка эффективности полученных протезов при ангиопластике. Впервые продемонстрировано, что соединительнотканый протез, имплантируемый в артерии разного типа, обеспечивает в оперированном сосуде кровотоки и служит основой для формирования элементов стенки сосуда данного типа.

Определены физические и биологические свойства протезов (прочность, гистологическое строение, состав клеточного компонента и межклеточного вещества). Определено значение некоторых механизмов регуляции процесса формирования соединительнотканых аутопротезов *in vivo*.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Показано, что в условиях пластики полученными аутопротезами артерий малого и среднего калибра происходит дифференцировка соединительнотканых элементов и формирование структур сосудистой стенки – интимы, предшественников гладкомышечных клеток мезенхимы, и зрелых эластических структур внутренних и наружных эластических мембран. Дано научное обоснование возможности использования данных сосудистых аутопротезов в качестве пластического материала при формировании артериовенозных фистул для гемодиализных больных, в дальнейшем - для повторных аортокоронарных шунтирований, и вообще реконструкций сосудов малого и среднего калибра (Патент за № 2260379 «Способ получения аутопротезов для пластики органов и тканей»).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Для пластики артериальных сосудов малого и среднего калибра может быть использован протез, получаемый как соединительнотканная капсула вокруг инородного тела.
2. Качество соединительнотканного аутопротеза зависит от материала протезформирующего имплантата, от места его введения, вида животных, состояния иммунной системы и различных лекарственных воздействий на их организм.
3. В зависимости от местных условий (параметры кровотока, тип сосуда), в имплантированном сегменте формируется (на основе соединительнотканного протеза) сосуд данного типа, происходит дифференцировка его структур.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты исследования используются при обучении студентов в курсе «Общая хирургия» на кафедре общей хирургии УГМА, в учебном процессе на кафедре патофизиологии Челябинской государственной медицинской академии. Отработанные в процессе выполнения диссертации методические приемы используются в выполняемых в рамках НИР диссертационных и студенческих работах на кафедре общей хирургии УГМА, а также внедрены в научные исследования, выполняемые на кафедре физиологии человека и животных УРГУ (зав. каф. д.м.н., профессор Юшков Б. Г.) и лаборатории Института иммунологии и физиологии УО РАН (зав. д.м.н., академик РАН, профессор Черешнев В. А.).

Получен патент на изобретение № 2260379 от 20.09.2005 г. «Способ получения аутопротезов для пластики органов и тканей».

**Апробация работы и публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, сделан ряд докладов на научных конференциях разного уровня. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседании Областного хирургического научно-практического общества хирургов (Екатеринбург, 2004), на XXI международном съезде физиологов им. И. П. Павлова (Екатеринбург, 2004), на IX итоговой научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 2005), на X Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2005), на Всероссийской конференции «Медицина и патофизиология» (Санкт-Петербург, 2005), на научной конференции «Современные методы диагностики и лечения заболеваний в клинике и эксперименте» (Москва, 2005), в докладах Академии наук РФ (2006).

**Объем и структура диссертации.** Работа состоит из введения, обзора литературы, главы описания материала и методов исследования, двух глав с изложением и обсуждением результатов собственных исследований, общего заключения, выводов и библиографического указателя, включающего 109

отечественных и 95 иностранных источников. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 32 рисунка.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Эксперименты проведены на 70 белых беспородных крысах-самцах с исходной массой 200-250г. и 26 беспородных взрослых кроликах массой 4кг.

Под эфирным наркозом 70 белым беспородным крысам и 26 кроликам при соблюдении правил асептики и антисептики под кожу спины имплантировали трубки из полихлорвинила (ПХВ) и пористой целлюлозы длиной 20мм и диаметром 1-2мм, служившие для формирования соединительнотканного протеза (**протезформирующие имплантаты**). Группе из 30 беспородных крыс внутрибрюшинно имплантировали трубки из пористой целлюлозы (пористый целлюлозный фильтр, НА 0,45μ) длиной 20мм и диаметром 1мм, служившие для формирования соединительнотканного протеза. Группе из 6 кроликов имплантировали целлюлозные трубки подкожно и внутрибрюшинно, и из ПХВ – подкожно. Рану ушивали отдельными узловыми швами.

Динамику формирования соединительнотканых аутопротезов изучали на протяжении 6 недель у крыс и кроликов. Протезформирующие имплантаты, покрытые соединительнотканной капсулой, извлекали через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 недель, капсулы (далее – аутопротезы) оценивали по макро – и микроскопическим характеристикам. Все животные разделены на 6 групп соответственно срокам введения протезформирующих имплантатов. С целью оценки возможности использования полученных протезов для пластики сосудов 5-недельные аутопротезы под эфирным наркозом, при помощи микрохирургического инструментария и луп с 10-кратным увеличением, вшивали узловыми швами, атравматической пропиленовой нитью фирмы «Ethicon» 9-0, способом «конец в конец» в рассеченную общую сонную артерию 10 крыс. Подобным образом проводили ангиопластику резецированной бедренной артерии у 20 кроликов под нейролептанальгезией (ромитар и гексенал).

Оценивали проходимость аутопротезов через 3 и 6 месяцев после имплантации клинически и с помощью инструментальных методов (в группе кроликов), затем их извлекали для морфологического исследования. При гистологической оценке качества протезирования исследовали: I – участок сонной артерии, II – участок ткани в месте анастомоза, III – участок самого протеза. Контролем служила контралатеральная сонная артерия. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, на эластические структуры по Вейгерту, а также их комбинации;

Морфологическое исследование микропрепаратов проводилось на базе отдела общей патологии ЦНИЛ (зав. – д. м. н., профессор В. В.Базарный) старшим научным сотрудником к.м.н. С. Ю. Медведевой. Для гистологического исследования брались соединительно-тканые протезы, снятые с протезформирующего имплантата в разные сроки эксперимента, и

участки аутопротезов, через 3 и 6 месяцев после протезирования артерий лабораторных животных. После стандартной гистологической обработки срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону на коллагеновые волокна, по Вейгерту на эластические волокна.

Наряду с обзорным гистологическим описанием препаратов проводили морфометрическое исследование толщины стенки протезов с помощью окуляр-микрометра (МОВ-1-15х), полученные результаты выражали в мм, производили подсчет количества клеток на единицу площади ( $0,01 \text{ мм}^2$ ) и определяли их качественный состав.

Прочность на разрыв измеряли и сравнивали между собой на сонных артериях крыс и 5-недельных аутопротезах, сформированных на протезформирующих имплантатах из ПХВ.

Для определения влияния функционально-метаболической активности макрофагов на процесс формирования аутопротезов использовали внутримышечное введение препарата «Тамерит» по 0,4 мг и внутрибрюшинное – каррагинана по 1,5 мг на протяжении 4-х недель, у отдельной группы из 40 крыс. Тамерит – иммуномодулятор, избирательно регулирующий функционально-метаболическую активность макрофагов (Абидов М.Т., Караулов А.В., 2002). Каррагинан – альгельный полисахарид, при попадании в организм захватывается макрофагами, вызывая обратимую ингибицию функции фагоцитирующих клеток (Фримель Г., 1987). Проводили гистологическое и морфометрическое исследования 4-недельных протезов в двух исследуемых группах: 1 – на фоне введения каррагинана ( $n=15$ ), 2 – на фоне введения тамерита ( $n=15$ ), контролем явились 4-недельные протезы животных, не получавших препараты ( $n=10$ ).

Инструментальные методы оценки состоятельности кровотока в имплантатах кроликов выполнялось на базе диагностического отделения (зав. – М. В. Налесник) МУ ГКБ № 40 (гл. врач – д. м. н. Ф.И. Бадаев) врачом М. М. Тутуниной, Ю. Е. Мамонтовой и включали в себя ультразвуковое дуплексное сканирование и рентгеноангиографию бедренной артерии.

Ультразвуковое дуплексное сканирование проводилось с помощью системы Siemens Sonoline Antares (USA), с использованием широкодиапазонных многочастотных датчиков Multi Hertz от 4 до 8,89 МГц в М-режиме, цветовом режиме, в энергетическом режиме, а также в режиме Допплера. Получали изображение графических кривых звуковых пульсовых волн, сравнивали с показателями нормального артериального кровотока артерий соответствующего калибра; оценивались состояние стенки и просвета, толщина, диаметр протезированного участка артерии. Использовалось цветное картирование протезированного участка. Оценивался центробежный (артериальный) кровоток, кодированный в красный цвет, и центростремительный (венозный) кровоток, кодированный в синий цвет – одноименная вена. Рентгеноангиографическое исследование проводилось на рентгенодиагностическом телеуправляемом комплексе «Электрон» - КРТ (г. Санкт-Петербург), при экспозиции 160 mAs, силе тока 63 kV, 250 mS. Выполнялось по 3 серийных снимка подряд, от начала

введения рентген-контраста (урографин 70%-1,0 ml). Контраст вводили через гибкую канюлю, введенную проксимальнее места имплантированного 6 месяцев назад аутоангиопротеза, в наружную подвздошную артерию, с контрольной ангиографией противоположной конечности.

Результаты морфометрического исследования обработаны методами вариационной статистики с вычислением средней величины (M), стандартной ошибки средней величины (m). При сравнении количественных показателей использовался *t* – критерий Стьюдента. Достоверными считались различия при уровне значимости  $P < 0,05$ . Использовался непараметрический метод Манна-Уитни с применением стандартного пакета прикладных программ «Statistica 6.0, StatSoft, Inc», пакет статистических программ Microsoft Excel 7.0.

### **Результаты и их обсуждение**

Первоочередной задачей работы явилась разработка метода получения сосудистых протезов на разных видах экспериментальных животных. 6 группам из 5 крыс и 1 кролика подкожно имплантировали протезформирующие имплантаты из ПХВ и пористой целлюлозы. Другим 6 группам из 6 крыс и 1 кролика внутрибрюшинно вводили целлюлозные имплантаты. Извлечение имплантатов проводилось через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 недель соответственно группе. Уже через 2 недели на протезформирующих имплантатах наблюдали сформировавшиеся соединительнотканые капсулы, которые свободно снимались, сохраняя форму трубки. При макроскопической оценке трубки-аутоангиопротезы имели различную толщину и плотность, на разрезе внутренняя поверхность гладкая, без каких-либо утолщений и разрывов. Далее трубка-аутоангиопротез подвергалась стандартной гистологической обработке для проведения микроскопической оценки.

Последующие морфологические и морфометрические исследования полученных протезов позволили определить структуру их стенки, этапы формирования, особенности их образования в различных условиях эксперимента.

Формирование аутопротезов для ангиопластики, полученных при подкожном введении имплантата из ПХВ, характеризовалось определенной динамикой. В 2-х недельных аутопротезах наблюдалось преобладание клеточных элементов с межклеточным веществом, что расценено как активная воспалительная реакция на введенный имплантат. Стенка аутопротезов имела четкое разделение на внутренний, средний и наружный слои (рис. 1).

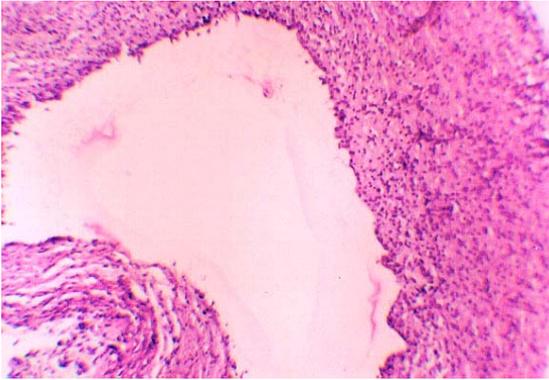


Рис.1. 2-я неделя эксперимента. Стенка протеза, представленная рыхлой соединительной тканью с диффузной лейкоцитарной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 100

Поздние сроки эксперимента характеризовались существенным снижением числа элементов воспаления, более упорядоченной морфоструктурной организацией в стенке протезов, увеличением доли волокнистых структур, их упорядоченным циркулярным и продольным расположением. Особенно показательны это у 5-недельных протезов (рис.2).

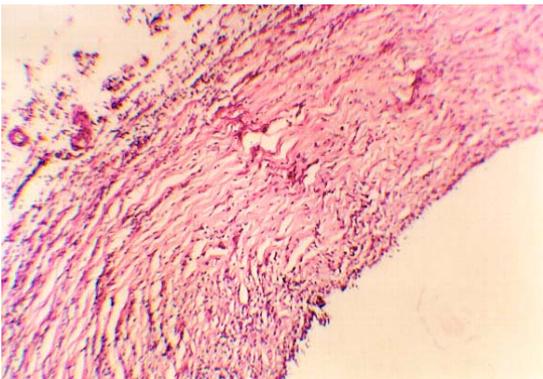


Рис.2. 5-я неделя эксперимента. Стенка протеза, представленная волокнистой соединительной тканью с очаговой лейкоцитарной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 100

Таким образом, проведенные исследования позволили предположить, что пятая неделя – оптимальный срок для использования протезов для ангиопластики, учитывая достаточное количество клеточного материала для его дальнейшей дифференцировки в новых гемодинамических условиях артериального сосуда, минимально выраженную воспалительную реакцию. Достаточно развит в этих сроках и коллагеновый матрикс, что необходимо для прочностных свойств протеза.

На следующем этапе исследования проводилась сравнительная оценка динамики формирования аутопротезов у разных видов лабораторных животных. Особенности формирования соединительнотканых протезов в организме крыс и кроликов наиболее показательны на 5 неделе эксперимента

(табл.1). Толщина стенки протеза в динамике процесса его формирования прогрессивно уменьшается, составляя в сроке 5 недель –  $0,09 \pm 0,05$  мм у крыс, при этом данный показатель в 3,7 раза ( $p < 0,001$ ) больше в группе кроликов.

Количество клеток в стенке протеза сопоставимо в сравниваемых группах, аутопротезы имеют одинаковый клеточный состав, в котором преобладают элементы фибробластического ряда. Фибробласты являются коммитированными клетками и образуют волокна соединительной ткани, а также аморфный компонент межклеточного вещества. Они сосредоточены ближе к наружной и внутренней поверхностям трубки, зонам активного образования соединительной ткани, при этом в центральной части стенки протеза располагаются фиброциты. Количество фибробластов в протезах крыс и кроликов одинаково, а более зрелых клеток - фиброцитов у кроликов на 80% ( $p < 0,01$ ) меньше.

Таблица 1

**Сравнительная характеристика аутопротезов у различных видов животных через 5 недель после имплантации под кожу ПХВ основы**

Показатели	Крысы	Кролики
Толщина стенки, мм	$0,09 \pm 0,005$	$0,34 \pm 0,01$ ***
Кол-во клеток на $0,01 \text{ мм}^2$	$70,04 \pm 1,9$	$28,1 \pm 0,99$
Фибробласты	$15,7 \pm 3,4$	$15,84 \pm 1,5$
Фиброциты	$50,6 \pm 3,1$	$10,1 \pm 1,6$ **
Фибробласты + фиброциты	$66,3 \pm 0,8$	$25,89 \pm 0,6$
Лимфоциты	$3,5 \pm 0,8$	$0,8 \pm 0,3$
Сегментоядерные нейтрофилы	$0,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3$
Макрофаги	0	$0,06 \pm 0,04$
Плазматические клетки	0	0

Примечание: в таблицах 1 и 2

\* различие между группами достоверно ( $p < 0,05$ )

\*\* различие между группами достоверно ( $p < 0,01$ )

\*\*\* различие между группами достоверно ( $p < 0,001$ )

Таким образом, в результате сравнительного гистологического и морфометрического анализа структур стенки аутопротезов у крыс и кроликов обнаружено, что процесс их формирования проходит одинаковые этапы. С увеличением сроков эксперимента уменьшается толщина стенки протеза, уменьшается количество клеток на единицу площади за счет снижения числа элементов воспаления, уменьшения клеток фибробластического ряда, нарастает число зрелых форм – фиброцитов, происходит созревание соединительной ткани с образованием волокнистых структур, ориентированных продольно. Однако с учетом морфометрических данных установлено, что у кроликов дольше сохраняются признаки воспаления, замедлены темпы созревания соединительной ткани, у крыс

процесс формирования аутопротезов протекает существенно быстрее.

Использование разных материалов при имплантации под кожу как основы для формирования соединительнотканых протезов (на примере целлюлозы и ПХВ) позволило установить общие закономерности формирования структурных элементов образованных соединительнотканых капсул-протезов. При морфологическом исследовании аутопротезов, полученных подкожно на целлюлозных имплантатах, выявлена определенная динамика их формирования, подобная увиденной в эксперименте с использованием ПХВ имплантатов. С увеличением срока зрелости протеза уменьшается толщина его стенки, в ее структуре происходит уменьшение клеточности за счет снижения числа элементов воспаления, фибробластов, увеличивается количество зрелых фиброцитов и упорядоченных коллагеновых и эластических волокон.

При морфометрическом исследовании структурных элементов стенки аутопротезов, полученных на ПХВ и целлюлозной основах на 5-й неделе эксперимента, установлен ряд особенностей (табл.2).

Таблица 2

**Сравнительная характеристика аутопротезов у крыс через 5 недель после имплантации под кожу ПХВ и целлюлозной основы**

<b>Показатели</b>	<b>ПХВ</b>	<b>целлюлоза</b>
Толщина стенки, мм	0,09±0,005	0,22±0,02***
Кол-во клеток на 0,01 мм <sup>2</sup>	70,04±1,9	100,42±3,6***
Фибробласты	15,7±3,4	23,7±2,0*
Фиброциты	50,6±3,1	57,6±8,7
Фибробласты + фиброциты	66,3±0,8	81,3±6,9*
Лимфоциты	3,5±0,8	3,2±1,4
Сегментоядерные нейтрофилы	0,3±0,2	12,9±5,7*
Макрофаги	0	3,0±1,3
Плазматические клетки	0	0

При сравнительном анализе выявлено, что у протезов, полученных на целлюлозной основе, в сроке 5 недель толщина стенки больше в 2,4 раза ( $p<0,001$ ), в соединительной ткани выражен клеточный компонент, он преобладает над волокнистыми структурами, количество клеток на единицу площади больше на 43,4% ( $p<0,001$ ). Более высокое суммарное количество фибробластов и фиброцитов на 22,6% ( $p<0,05$ ), в основном за счет фибробластов, число которых больше на 50,9% ( $p<0,05$ ), существенно больше элементов воспаления в стенке протеза.

Таким образом, аутопротезы на целлюлозной основе характеризуются большей толщиной стенки, в структуре которой более выражен клеточный компонент за счет фибробластов, более выражена воспалительная реакция, чем в протезах, полученных на ПХВ имплантатах. Полученные данные дают основание считать, что формирование аутопротезов на подкожно введенных целлюлозных трубчатых имплантатах у крыс отличается более медленной

динамикой, чем на ПВХ имплантатах, что делает последние более привлекательными для формирования аутопротезов.

В проведенных экспериментах наряду с подкожным введением целлюлозных имплантатов животным проводилось и внутрибрюшинное их введение с целью сравнения качества получаемых при этом протезов. При исследовании протезов, полученных внутрибрюшинным введением имплантатов, выявлены аналогичные этапы формирования структур, образующих стенку протеза. Динамика внутрибрюшинного формирования сосудистых аутопротезов имеет ряд особенностей при морфологическом и морфометрическом анализе. С увеличением срока формирования не выявлено динамического уменьшения толщины стенки протеза за счет сохраняющегося отека. Уменьшение количества фибробластов в структуре стенки не сопровождалось увеличением числа зрелых фиброцитов, в более поздние сроки происходило снижение интенсивности воспалительной лимфоидной реакции по сравнению с подкожной имплантацией. Полученные данные свидетельствуют о том, что внутрибрюшинное формирование соединительнотканых протезов характеризуется замедленной динамикой, что позволяет считать подкожное моделирование аутопротезов для ангиопластики более предпочтительным.

Моделирование сосудистого протеза, проведенное нами в эксперименте, основано на привлечении и дифференцировке стволовых клеток соединительной ткани. В настоящее время чрезвычайно актуально изучение вопросов межклеточных взаимодействий, регуляции роста, дифференцировки и регенерации клеток с помощью факторов роста, которые вырабатываются специфическими регуляторными клетками. Ведущую роль в регуляции роста соматических клеток организма играют макрофаги, тучные и иммунокомпетентные клетки (Бабаева А. Г., 1990; Маянский Д. Н., 1991; Маянский Д. Н., Пикуза О. И., 1993; Донцов В. И., 1998; Шехтер А. Б., Серов В. В., 1991; Черешнев В. А., Юшков Б. Г. с соавт., 2002; Cotran R. S., 1999).

Механизмы формирования сосудистых аутопротезов остаются недостаточно изученными. При гистологическом исследовании в стенке протеза обнаружено значительное количество клеточных элементов, которое уменьшается и претерпевает качественные изменения в поздние сроки эксперимента. Среди клеток инфильтрата в стенке протеза выявляются лимфоциты и макрофаги. В этой связи нам представлялось актуальным исследовать влияние функционального состояния макрофагов на динамику формирования сосудистых аутопротезов. Для изменения функционального состояния макрофагов внутримышечно вводили животным тамерит, и внутрибрюшинно – каррагинан. В результате проведенного исследования, среди различных механизмов регуляции, влияющих на процесс формирования сосудистого аутопротеза, показана важная роль системы фагоцитирующих мононуклеаров. По нашим данным, подавление функции макрофагов каррагинаном тормозило формирование соединительнотканых аутопротезов, в то время как ее стимуляция тамеритом ускоряла этот

процесс. Следовательно, процесс формирования сосудистых аутопротезов зависит от функционального состояния макрофагов (табл.3).

Таблица 3

**Сравнительная характеристика 4-недельных аутопротезов при введении препаратов разнонаправленного действия**

Показатели	Контроль	Тамерит	Каррагинан
Толщина стенки (мм)	0,14±0,02	0,02±0,001***	0,30±0,02***
Количество клеток на 0,01 мм <sup>2</sup>	62,33±1,95	48,93±1,68***	65,46±2,41
Фибробласты	17,9±3,7	7,3±1,5	31,3±2,9*
Фиброциты	37,2±4,4	41,6±1,5	26,8±4,3
Фибробласты + фиброциты	55,6±0,75	48,93±0,001**	58,13±1,7
Лимфоциты	4,6±0,9	0	2,5±1,0
Сегментоядерные лейкоциты	1,5±1,2	0	4,8±2,0
Макрофаги	1,2±0,7	0	0

Примечание: \* - различие с контролем достоверно (p<0,05)

\*\*\* - различие с контролем достоверно (p<0,01)

\*\*\* - различие с контролем достоверно (p<0,001)

Исходя из этого, можно полагать, что темпы созревания аутопротезов для ангиопластики могут модулироваться путем направленной фармакологической коррекции активности системы фагоцитирующих мононуклеаров организма.

Прочность 5-недельных соединительнотканых протезов и сонной артерии крыс определяли и сравнивали на разрыв. Предельную прочность высчитывали по формуле:

$$\sigma_{\text{в}} = P / F_{\text{р}} \quad (1)$$

где  $\sigma_{\text{в}}$  - предельная прочность, кг/мм<sup>2</sup>, P - приложенная нагрузка, кг, F<sub>р</sub> – площадь артерии или протеза после разрыва, мм<sup>2</sup>

$$F_{\text{р}} = 0,785 (d_{\text{н}}^2 - d_{\text{в}}^2) \quad (2)$$

где d<sub>н</sub> – наружный диаметр артерии или протеза после разрыва, мм, d<sub>в</sub> – внутренний диаметр артерии или протеза после разрыва, мм

**Таблица 4**

**Сравнительная характеристика показателей сонной артерии и 5-недельного соединительнотканного аутопротеза после испытания их на разрыв**

Показатели	Сонная артерия	Аутопротез
$d_n$ (наружный диаметр, мм)	0,34±0,02	0,58±0,1
$d_b$ (внутренний диаметр), мм	0,06±0,02	0,18±0,03*
P (нагрузка), кг	0,287±0,04	0,334±0,14
$F_p$ (площадь), мм <sup>2</sup>	0,085±0,01	0,254±0,1
$\sigma_b$ (предельная прочность), кг/мм <sup>2</sup>	3,42±0,21	1,31±0,04***

Примечание: \* - различие с сонной артерией достоверно ( $p < 0,05$ )

\*\*\* - различие с сонной артерией достоверно ( $p < 0,001$ )

Как видно из таблицы, предельная прочность протеза в 2,5 раза меньше предельной прочности сонной артерии крысы. Этого оказалось достаточно для проведения реконструкции артерии малого и среднего диаметра.

Следующей важной задачей для осуществления поставленной цели явилась разработка метода ангиопластики на сосудах малого калибра на экспериментальных животных, с использованием полученных аутопротезов. С целью оценки возможности использования полученных протезов для реконструкции сосудов в рассеченную общую сонную артерию 10 крыс и в резецированную бедренную артерию 20 кроликов вшивали 5-недельные соединительнотканые аутопротезы.

После проведенной операции состояние лабораторных животных оставалось удовлетворительным, признаки ишемических расстройств отсутствовали на всех сроках наблюдения.

Особый интерес в нашей работе представляла оценка эффективности метода ангиопластики полученными в эксперименте аутопротезами с помощью инструментальных и морфологических исследований. У крыс инструментальная оценка их проходимости не проводилась, а эффективность протезирования оценивали тремя способами:

1) путем перевязки противоположной общей сонной артерии. Отсутствие церебральных нарушений свидетельствовало о проходимости протеза, поскольку последние проявляются у крыс при закупорке сонных артерий;

2) извлечение протезов начинали со стороны дистального конца анастомоза, и наличие кровотечения указывало на проходимость имплантата;

3) исследование гистологических препаратов.

У кроликов через 6 месяцев после реконструкции бедренной артерии кроликов соединительноткаными аутопротезами проводили оценку эффективности кровотока с использованием инструментальных методов

исследования, а в последующем - гистологический анализ извлеченных аутопротезов и сегментов протезированной артерии.

По данным проведенного дуплексного исследования протезированной бедренной артерии кролика, выявлен активный артериальный кровоток, соответствующий нормальному по всем показателям исследования; стенка протеза и его просвет аналогичны нормальным интактным бедренным артериям животного (рис. 3).

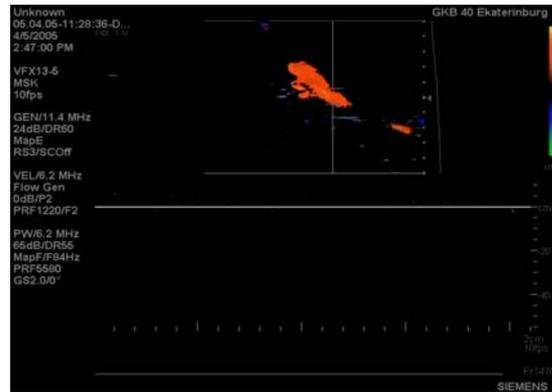


Рис. 3. УЗДГ протезированного сосуда.

По результатам ангиографии протезированной бедренной артерии кролика, установлен активный артериальный кровоток через протезированный участок сосуда и воспринимающих дистально лежащих артерий, соответствующий нормальному кровотоку; стенка протеза и его просвет аналогичны нормальным интактным бедренным артериям животного (рис. 4).



Рис. 4. рентгеноконтрастная ангиография протезированной артерии.

Таким образом, результаты проведенных инструментальных исследований сосудистого кровотока (ультразвуковое дуплексное сканирование, рентгеноконтрастная ангиография) свидетельствуют о состоятельности анастомоза и проходимости аутопротеза у всех

экспериментальных животных в течение 6 месяцев наблюдения.

В результате проведенного гистологического исследования установлено, что при протезировании аутопротезом бедренной артерии кролика, относящейся к артерии мышечно-эластического типа, через 6 месяцев эксперимента имплантат является проходимым, происходит дифференцировка структурных элементов его стенки. Наблюдается образование и упорядоченное расположение эластических волокон, формирование эластических мембран, определяется васкуляризация слоев наружной оболочки, имеется четкая дифференцировка стенки протеза на слои, обнаруживаются эндотелиоподобные клетки (рис. 5).

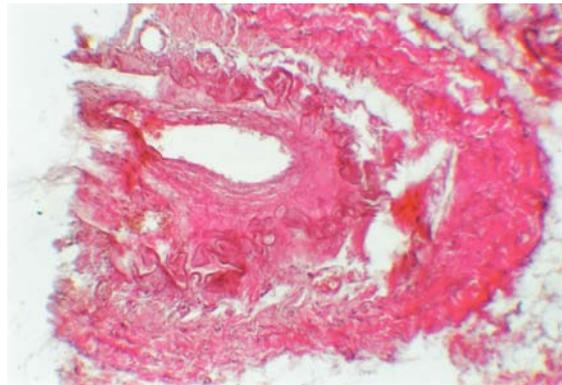


Рис. 5. Имплантат бедренной артерии. Просвет свободен, эластическая мембрана – с признаками деструкции. Адвентициальная оболочка сосуда представлена плотной волокнистой соединительной тканью, коллагеновые волокна сопровождаются тонкими эластическими – «протез в сосуде». Комбинированная окраска (по Ван-Гизону и Вейгерту). Ув. x 100.

С целью морфологической оценки динамики формирования структурных элементов стенки аутопротезов в гемодинамических условиях протезированной артерии группе животных проводилось оперативное извлечение и последующее гистологическое исследование 3-месячных аутопротезов и сегментов бедренной артерии. По данным гистологического исследования протезированных участков бедренных артерий кроликов, являющихся у этих животных артериями мышечно-эластического типа, зафиксировано формирование основных структур сосудов данного типа уже через 3 месяца после имплантации соединительнотканного протеза. На гистопрепаратах определяются формирующиеся эластические волокна и мембраны, просвет артерий проходим, нет четкой дифференцировки сосудистой стенки на слои (рис. 6).



Рис. 6. 3-месячный аутопротез. В стенке контурируются слои: внутренний, средний, наружный, сегментарно выражена внутренняя эластическая мембрана. Комбинированная окраска (по Ван-Гизону и Вейгерту). Ув. х 100.

У крыс в сроке 6 месяцев после имплантации соединительнотканых аутопротезов обнаруживается более высокая степень дифференцировки последних в сосуды того типа, в который были имплантированы (рис. 7). Кроме развитых эластических мембран и довольно четкой дифференцировкой на слои, обнаруживаются формирующийся эндотелий, а также скопления миобластов, что говорит о формировании гладкомышечных клеток (рис. 8).



Рис. 7. Участок протеза через 6 мес. Тонкие эластические волокна во внутренней и средней оболочках, зрелые утолщенные эластические волокна в наружной. Комбинированная окраска (по Ван-Гизону и Вейгерту). Ув. х 496.

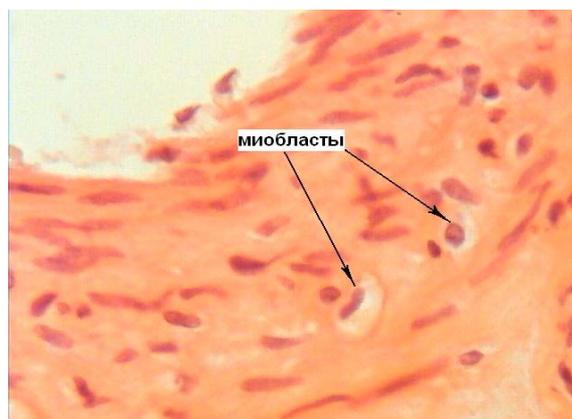


Рис. 8. Участок имплантата. Единичные эндотелиоциты во внутренней оболочке, единичные миобласты в средней оболочке. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x 2000.

Таким образом, в результате проведенного гистологического исследования показана возможность использования соединительнотканых аутопротезов в качестве материала для ангиопластики артерий мышечно-эластического типа. При гистологическом исследовании протеза у крыс и кроликов на 6 месяце наблюдения установлено, что при протезировании аутопротезом бедренной артерии кролика и сонной артерии крысы, относящихся к артерии мышечно-эластического типа, протез является проходимым, происходит дифференцировка структурных элементов его стенки. Наблюдается образование и упорядоченное расположение эластических волокон, формирование эластических мембран, определяется васкуляризация слоев наружной оболочки, имеется четкая дифференцировка стенки имплантата на слои, обнаруживаются эндотелиоподобные клетки. В ряде случаев наблюдается врастание ткани протеза в просвет прилегающей артерии и формирование в этом протезе структур артерии - эндотелий, внутренняя и наружная эластическая мембраны, элементы средней оболочки. У крыс в сроке 6 месяцев после имплантации соединительнотканых аутопротезов обнаруживается более высокая степень дифференцировки структурных элементов их стенки, определяются эндотелиальные клетки в интиме и гладкомышечные элементы средней оболочки.

## ВЫВОДЫ

1. В эксперименте на крысах и кроликах разработана методика и доказана возможность получения соединительнотканых аутопротезов для ангиопластики, формирующихся в течение 5 недель при подкожном или внутрибрюшинном введении полихлорвиниловых и целлюлозных трубчатых основ.

2. При гистологическом и морфометрическом исследовании соединительнотканых протезов у разных видов лабораторных животных, полученных при подкожном введении полихлорвиниловой основы, определена динамика их формирования. Стенка аутопротезов у крыс и кроликов представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с

воспалительной реакцией, при этом процесс формирования протезов проходит одинаковые этапы. С увеличением срока эксперимента уменьшается толщина стенки протеза, уменьшается количество элементов воспаления и фибробластов, нарастает число зрелых форм – фиброцитов, происходит созревание соединительной ткани с увеличением упорядоченно расположенных коллагеновых и эластических волокон. Однако у крыс процесс формирования аутопротезов протекает существенно быстрее.

3. При сравнительном анализе формирования структурных элементов стенки аутопротезов, полученных подкожно на целлюлозной и полихлорвиниловой основах, установлены общие закономерности. При этом аутопротезы на целлюлозной основе характеризуются замедленной динамикой созревания, более выраженной воспалительной реакцией, чем протезы, полученные на полихлорвиниловых имплантатах, что делает последние более эффективными при формировании протезов для ангиопластики.

При исследовании соединительнотканых протезов, полученных при внутрибрюшинном введении трубчатых имплантатов, выявлены аналогичные этапы формирования структур, образующих их стенку. При этом длительно сохраняющийся отек стенки протеза, снижение темпов созревания соединительной ткани и сохранение воспалительной реакции в поздние сроки свидетельствует о том, что внутрибрюшинное формирование соединительнотканых протезов характеризуется замедленной динамикой, что позволило считать подкожное моделирование аутопротезов для ангиопластики более предпочтительным.

4. Среди различных механизмов регуляции, влияющих на процесс формирования сосудистого аутопротеза у крыс, определена зависимость темпов созревания протезов от функционального состояния макрофагов. Установлено, что подавление функции макрофагов каррагинаном тормозило формирование соединительнотканых аутопротезов, в то время как ее стимуляция тамеритом ускоряла этот процесс.

5. На основании морфологического исследования определено, что 5 недель – оптимальный срок для формирования и использования протезов для ангиопластики, учитывая достаточное количество клеточного материала для его дальнейшей дифференцировки в новых гемодинамических условиях артериального сосуда, минимально выраженную воспалительную реакцию, достаточные прочностные свойства протеза. Разработана методика ангиопластики пятинедельными аутопротезами сонной артерии крыс, бедренной артерии кролика.

6. На основании результатов ультразвукового дуплексного сканирования и рентгеноконтрастной ангиографии доказана состоятельность анастомоза и проходимость аутопротеза у кроликов в течение 6 месяцев наблюдения. При гистологическом исследовании установлено, что при протезировании аутопротезом бедренной артерии кролика и сонной артерии крысы, через 6 месяцев эксперимента аутопротез проходим, в гемодинамических условиях артерии мышечно-эластического

типа происходит дифференцировка структурных элементов стенки протеза в виде четкого разделения на слои, соответствующие оболочкам артерии, формирования эластических мембран, эндотелиальных клеток, гладкомышечных элементов меди, васкуляризации наружной оболочки.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Ходаков В. В. Экспериментальное обоснование метода получения аутопротезов для артерий / В. В. Ходаков, Д. И. Крохин, С. Ю. Медведева, Б. Г. Юшков, Н. В. Тюменцева // Хирургия. – 2005. - №9. – С. 10-13.

2. Юшков Б. Г. Роль надпочечников в формировании аутопротезов для ангиопластики / Б. Г. Юшков, В. А. Черешнев, Н. В. Тюменцева, Д. И. Крохин, В. В. Ходаков, С. Ю. Медведева // Вестник Уральской медицинской академической науки. – Екатеринбург. - 2004. - №3. –С. 57-60.

3. Тюменцева Н. В. Аутопротезы в пластике сосудов / Н. В. Тюменцева, Д. И. Крохин, Б. Г. Юшков // Материалы международного симпозиума «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки». – Тюмень, 2005. – С. 263.

4. Юшков Б. Г. Способ получения аутопротезов для пластики органов и тканей / Б. Г. Юшков, В. В. Ходаков, Н. В. Тюменцева, Д. И. Крохин, М. А. Ранцев // Бюллетень. Изобретения. Полезные модели. - 2005. – Часть 3. - №26. – С. 423.

5. Тюменцева Н. В. Роль стимуляторов и ингибиторов макрофагов в формировании аутопротезов для ангиопластики / Н. В. Тюменцева, Д. И. Крохин // Материалы IX итоговой научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке». – Киров, 2005. –С. 54.

6. Крохин Д. И. Метод получения сосудистых протезов для ангиопластики / Д. И. Крохин, Н. В. Тюменцева // Материалы IX итоговой научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке». – Киров, 2005. – С. 17.

7. Черешнев В. А. Роль функциональной активности системы фагоцитирующих мононуклеаров в формировании аутопротезов для ангиопластики / В. А. Черешнев, Н. В. Тюменцева, Б. Г. Юшков, И. Г. Данилова, В. В. Ходаков, Д. И. Крохин, С. Ю. Медведева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140. – №8. – С. 186-188.

8. Тюменцева Н. В. Особенности внутрибрюшинного формирования сосудистых аутопротезов для ангиопластики / Н. В. Тюменцева, Д. И. Крохин // Тезисы докладов X Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2005. – С. 263.

9. Тюменцева Н. В. Влияние гепатэктомии на формирование сосудистых аутопротезов для ангиопластики / Н. В. Тюменцева, Д. И. Крохин // Материалы XI межвузовской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии». – Санкт-Петербург, 2005. – С. 79-81.

10. Тюменцева Н. В. Сравнение соединительнотканых протезов для ангиопластики, полученных в организме крыс и кроликов / Н. В. Тюменцева, Б. Г. Юшков, Д. И. Крохин, В. В. Ходаков, С. Ю. Медведева // Бюллетень Сибирской медицины. – Т. 4. – Приложение 1. – Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда. – Томск: СибГМУ. – 2005. – С. 22.

11. Тюменцева Н. В. Новый метод получения сосудистых аутопротезов для ангиопластики / Н. В. Тюменцева, Б. Г. Юшков, Д. И. Крохин, В. В. Ходаков // Научные труды 1-ого съезда физиологов СНГ. – Дагомыс. – 2005. – Т. 2. – С. 153-154.

12. Тюменцева Н. В. Возможность стимуляции формирования сосудистых аутопротезов препаратом «Тамерит» / Н. В. Тюменцева, Д. И. Крохин // Вестник молодых ученых. – Приложение к серии науки о жизни. – Материалы Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина». – Санкт-Петербург, 2005. – С. 122.

13. Черешнев В. А. Новый подход к получению аутопротезов для пластики сосудов / В. А. Черешнев, Б. Г. Юшков, Н. В. Тюменцева, С. Ю. Медведева, В. В. Ходаков, Д. И. Крохин, К. В. Мерсаидов // Доклады академии наук. – 2006. – Т. 408. – № 5. – С. 711-713.

Крохин Дмитрий Иванович

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ  
АУТОПРОТЕЗОВ ДЛЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ  
СОСУДОВ

14.00.27 – Хирургия

АВТОРЕФЕРАТ

ЛР №----- от --.--.2004г.

---

Подписано в печать --.--.2007г. Формат 60x84 1/16 Усл. Печ. л. 1.4. Тираж 100 экз.  
Заказ №\_20\_. Отпечатано в типографии УГМА, ул. Репина, 3. Тел/факс 2314264

