

ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР ДЛЯ СОЗДАНИЯ КСЕНОГЕННЫХ СОСУДИСТЫХ СКАФФОЛДОВ

Д. В. Бызов¹
О. П. Сынчикова¹
И. П. Михайлова¹
С. М. Дергун²
Б. П. Сандомирский¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

²Харьковский национальный технический институт «НТУ ХПИ»

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

В работе изучено влияние низких температур на артерии свиньи при создании бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов. В группе замороженных-оттаявших артерий ($n = 15$) наблюдали частичную децеллюларизацию эндотелия, изменение структуры соединительнотканых волокон при сохранении прочностных свойств сосудов.

Ключевые слова: сосудистые протезы, скаффолды, биоинженерия, децеллюларизация.

Единственным радикальным методом лечения окклюзионных и травматических поражений магистральных сосудов, включая ишемическую болезнь сердца, является оперативный — замена участка поврежденной артерии с целью реваскуляризации зоны ишемии. Существует также серьезная проблема, связанная с обеспечением сосудистого доступа для проведения гемодиализа у больных с почечной недостаточностью, стандартом которого считается наложение периферического артериовенозного шунта с использованием сосудистых протезов. В связи с этим возрастает необходимость в сосудистых трансплантатах, поскольку количество случаев сердечно-сосудистых заболеваний постоянно увеличивается, а возраст больных неуклонно снижается [1].

На сегодняшний день в сосудистой хирургии применяются следующие виды трансплантатов: аутогенные (*v.saphena magna*, *a.thoracica interna*, *a.radialis*); синтетические протезы (PTFE, ePTFE в различных модификациях), алло- и ксеногенные сосудистые графты [2, 3]. Однако наиболее перспективными, лишенными недостатков биологических и синтетических трансплантатов, являются биоинженерные сосудистые протезы [4]. Они представляют собой двух- или трехслойные тканево-клеточные струк-

туры, выращиваемые в особых условиях *in vitro* на основе сосудистого каркаса (скаффолда), выполняющего опорную функцию для наслаиваемых клеточных структур. На первом этапе на скаффолд наслаивают гладкомышечные клетки стенки артерий, затем — эндотелиальные клетки реципиента.

Идеальный скаффолд должен обладать такими свойствами [5]:

1) био-, гемосовместимость; 2) нетоксичность; 3) функциональность; 4) прочность; 5) проявление адекватных упругоэластических свойств; 6) способность к адгезии и росту наслаиваемых клеток.

Естественные бесклеточные ксеногенные биологические ткани в значительной степени превосходят синтетические материалы в качестве каркасов сосудистых протезов мелкого диаметра, проявляя лучшие адгезивные свойства при последующей эндотелизации, способствуют росту эндотелия и, в зависимости от метода обработки, могут обладать механическими свойствами, подобными нативным сосудам [6]. Отсутствие синтетического материала способствует формированию устойчивой, долгосрочной структуры биоинженерного сосуда и обеспечивает полноценную интеграцию трансплантата в организм реципиента [7]. Бесклеточный ксенокаркас постепенно преобразовывается,

замещаясь аутогенным внеклеточным матриксом, формируемым собственными клетками реципиента [8].

Цель данного исследования — изучение влияния низких температур на морфологическую структуру и биомеханические свойства артериальных сосудов свиньи при создании бесклеточных ксеногенных сосудистых скаффолдов.

Материалы и методы

Общие сонные и внутригрудные артерии были взяты от половозрелых свиней с соблюдением правил биоэтики. В стерильных условиях выполняли препарирование сосудов: удаляли соединительную ткань и излишек адвентициальной оболочки.

Для исследования 14 сонных и 16 внутригрудных артерий разделили на две группы: 1-я — группа контроля (нативные артерии — 7 *a. carotis com.*, 8 *a. thoracica int.*), $n = 15$; 2-я группа — 7 сонных и 8 внутригрудных артерий, подвергающихся воздействию низких температур, $n = 15$.

Сосуды 2-й группы погружали в жидкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), изучение проводили после их полного оттаивания на водяной бане ($+37\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Оценку морфологической структуры сосудов выполняли с помощью оптической микроскопии ($\times 200$) при импрегнации серебром межклеточных границ эндотелия, окраске гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону.

Биомеханические свойства оценивали, определяя механическую прочность при продольном растяжении с помощью деформирующего устройства FP 100/1 (VEB TIW Rauenstein) и измеряя давление на разрыв на установке, состоящей из ресивера с электронным датчиком давления (Freescale Semiconductor MPX-5700DP).

Результаты и обсуждение

Поскольку эндотелиальные клетки являются «первым эшелонем», который реагирует на изменения среды, использовали серебрение клеточных границ для оценки степени их повреждения (рис. 1, 2).

Характерными свойствами эндотелия в норме являются непрерывность выстилки и полиморфизм клеток. После погружения в жидкий азот отмечали обширные деэндотелизированные поля, чередующиеся с участками сохранившейся эндотелиальной выстилки, а также единичные группы эндотелиоцитов.



Рис. 1. Эндотелий нативного сосуда (импрегнация межклеточных границ серебром): 1 — непрерывность выстилки и полиморфизм клеток. Подобную структуру имели все изучаемые образцы ($n = 15$)



Рис. 2. Артерия после охлаждения до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (импрегнация межклеточных границ серебром): 1 — деэндотелизированные поля; 2 — сохранившийся эндотелий; 3 — отдельные группы эндотелиоцитов. Подобные изменения выявлены во всех образцах ($n = 15$)

При окраске гематоксилин-эозином замороженных сосудов обнаруживали множественные участки десквамации эндотелия (рис. 3, 4).

В средней оболочке артерий образовались продольные дефекты в виде микроразрывов и расслоения стромы, что, очевидно, связано с механическими напряжениями, которые претерпевает стенка сосуда после воздействия. Наружная эластическая мембрана сохраняла свою целостность.

Возможности окраски по Ван-Гизону позволили оценить состояние коллагеновых, мышечных и эластических волокон стенки артерий (рис. 5, 6).

Отмечалось изменение структурной ориентации волокон. Каждое из коллагеновых волокон нативной артерии демонстрировало выраженную извитость, в то время как в ох-

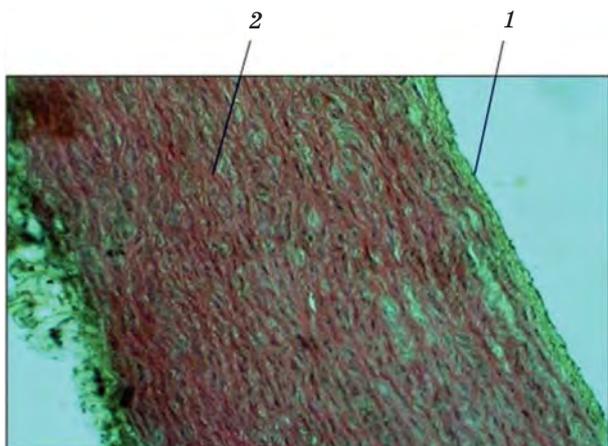


Рис. 3. Нативный сосуд (окраска гематоксилин-эозином):

1 — эндотелиальная выстилка;
2 — коллагеновые и мышечные волокна.

Подобную структуру имели все изучаемые образцы ($n = 15$)

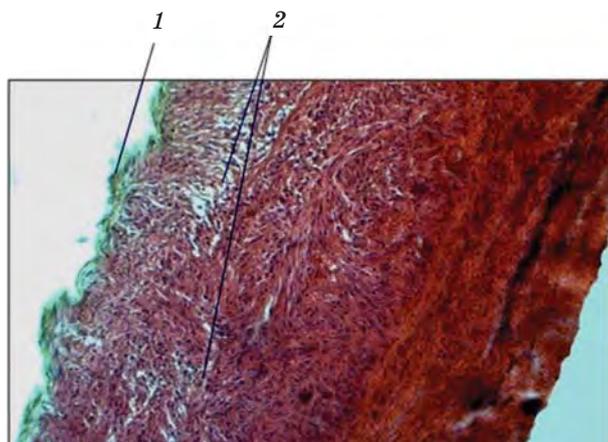


Рис. 4. Артерия после охлаждения до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (окраска гематоксилин-эозином):

1 — участки десквамированного эндотелия;
2 — средняя оболочка сосуда (определяются дефекты в виде микротрещин и микроразрывов).

Подобные изменения, разной степени выраженности, выявлены во всех изучаемых образцах ($n = 15$)

лажденных до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ сосудах извитость снижена, волокна уплотнены и утолщены. Продольная ориентация и структурная целостность коллагеновых и эластиновых волокон сохранялись.

Биомеханические свойства сосудов обеих групп представлены в виде диаграмм. Испытание на разрыв выявило тенденцию к увеличению прочностных свойств замороженных-оттаянных сосудов по сравнению с контролем (рис. 7).

Наблюдали также достоверное увеличение (в 1,5 раза) механической прочности замороженных сосудов в экспериментах на растяжение (рис. 8).

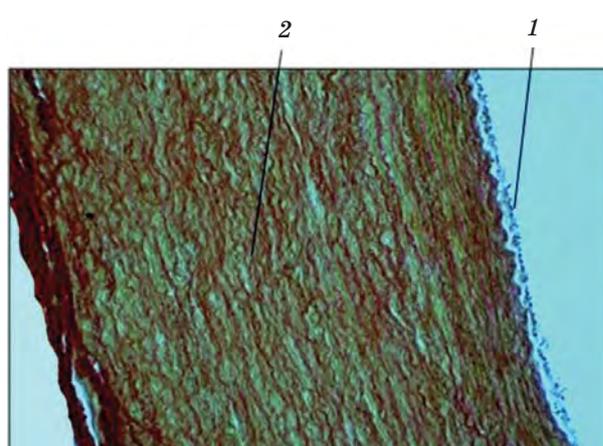


Рис. 5. Нативный сосуд (окраска по Ван-Гизону):
1 — эндотелий;

2 — коллагеновые и эластиновые волокна.

Подобную структуру имели все изучаемые образцы ($n = 15$)

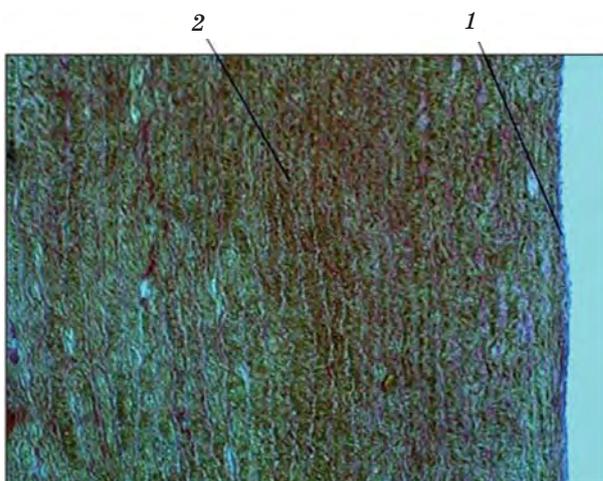
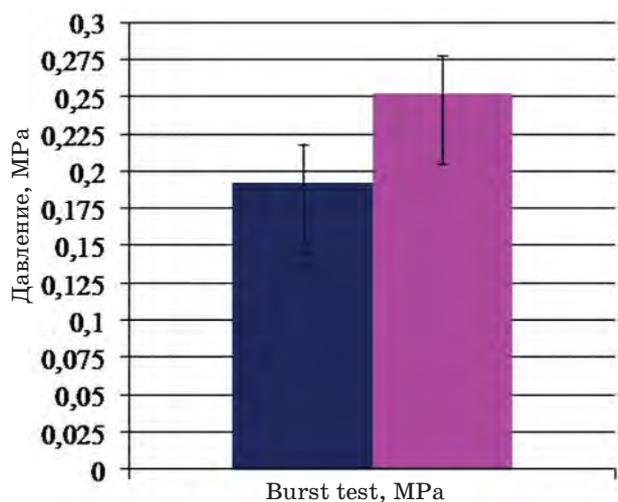


Рис. 6. Артерия после охлаждения до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (окраска по Ван-Гизону):

1 — десквамированный эндотелий;
2 — утолщенные и уплотненные соединительнотканые волокна.

Такие изменения наблюдали во всех изучаемых образцах ($n = 15$)

Таким образом, замораживание-оттаивание свиных артерий малого диаметра ($\leq 6\text{ мм}$) приводило к их начальной девитализации: во всех изучаемых образцах ($n = 15$) образовывались обширные дезэндотелизированные поля и участки десквамированного эндотелия, чередующиеся с отдельными группами сохранившихся эндотелиоцитов. Отмечалось сохранение структурной целостности эластической мембраны стенки сосуда. Охлаждение сосудов до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ во всех случаях обуславливало изменение структурной ориентации соединительнотканых волокон, что проявлялось в снижении степени



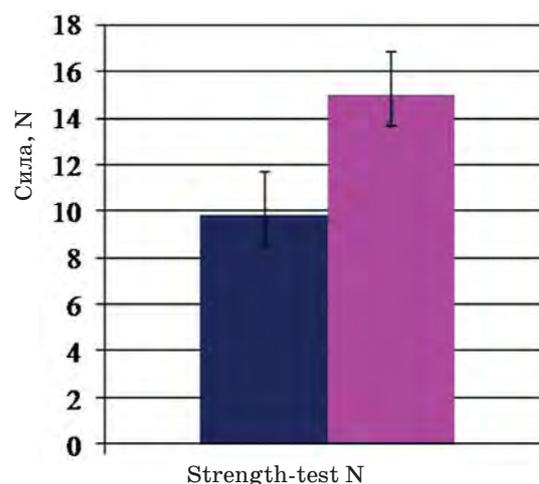
- — Нативные артерии (1-я группа)
- — Артерии после замораживания до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2-я группа)

Рис. 7. Диаграмма сравнения влияния приложенного давления на разрыв сосудов (Burst test) для артерий нативных и после замораживания, МПа ($n = 15$)

извитости, их уплотнении и утолщении при сохранении продольной ориентации и структурной целостности. Учитывая сохранение биомеханических свойств группы замороженных-оттаянных артерий ($n = 15$), охлаждение кровеносных сосудов до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$

ЛИТЕРАТУРА

1. Бокерия Л. А., Ступаков И. Н., Самородская И. В. и др. Мнение врачей первичного звена в оценке потребности пациентов в хирургических методах лечения ишемической болезни сердца // Кардиол. серд.-сосуд. хир. — 2008. — № 1. — С. 10–15.
2. Kannan R. Y., Salacinski H. J., Butler P. E. et al. Current status of prosthetic bypass grafts: A review // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. — 2005. — V. 74. — P. 570–581.
3. Rashid S. T., Salacinski H. J., Fuller B. J. et al. Engineering of bypass conduits to improve patency // Cell Prolif. — 2004. — V. 37. — P. 351–366.
4. Григорян А. С. Испытания новых тканеинженерных кровеносных сосудов в экспериментальных моделях // Клет. трансплантол. ткан. инженер. — 2006. — № 3(5). — С. 23–24.



- — Нативные артерии (1-я группа)
- — Артерии после замораживания до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2-я группа)

Рис. 8. Диаграмма сравнения результатов испытаний зависимости разрыва сосудов от силы растяжения (Strength-test N), ($n = 15$), $p < 0,05$ для артерий нативных и после замораживания

может явиться одним из этапов создания бесклеточных сосудистых скаффолдов.

5. Elazer R. Edelman. Vascular tissue engineering: designer arteries // Circul. Res. — 1999. — V. 85. — P. 1115–1117.
6. Prachi Dixit, Diane Hern-Anderson, John Ranieri et al. Vascular graft endothelialization: Comparative analysis of canine and human endothelial cell migration on natural biomaterials // J. Biomed. Mater. Res. Part A. — 2001. — V. 56, Is. 4. — P. 545–555.
7. Omke E. Teebken, Axel Haverich. Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts // Eur. Jour. Vasc. Endovasc. Surg. — 2002. — V. 23, Is. 6. — P. 475–485.
8. Lee R. T., Berditchevski F., Cheng G. C., Hemler M. E. Integrinmediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells // Circ. Res. — 1995. — V. 76. — P. 209–214.

**ЗАСТОСУВАННЯ НИЗЬКИХ
ТЕМПЕРАТУР ДЛЯ СТВОРЕННЯ
КСЕНОГЕННИХ СУДИННИХ СКАФОЛДІВ**

*Д. В. Бизов¹
О. П. Синчикова¹
І. П. Михайлова¹
С. М. Дергун²
В. П. Сандомирський¹*

¹ Інститут проблем кріобіології
і кріомедицини НАН України, Харків

² Харківський національний
технічний інститут «НТУ ХПІ»

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

У роботі вивчено вплив низьких температур на артерії свині під час створення безклітинних ксеногенних скафолдів судин. У групі заморожених-відтанутих артерій ($n = 15$) спостерігали часткову децелюляризацію ендотелію, зміну структури сполучнотканинних волокон при збереженні властивостей міцності судин.

Ключові слова: судинні протези, скафолди, біоінженерія, децелюляризація.

**USE OF LOW TEMPERATURES
FOR CREATION
OF VASCULAR SCAFFOLDS**

*D. V. Byzov¹
O. P. Synchikova¹
I. P. Mikhaylova¹
S. M. Dergun²
B. P. Sandomirskiy¹*

¹ Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

² National Technical University
«Kharkiv Polytechnical Institute «NTU KhPI»

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

We investigated the effect of low temperatures on pig's arterial vessels at creation of acellular xenogeneic vascular scaffolds. It was observed partial decellularization of endothelium layer, structure changing of connective tissue's fibers and preservation of mechanical properties of vessels in a group of frozen-thawed arteries.

Key words: vascular grafts, scaffolds, bioengineering, decellularization.