

Е.В. ШАЙДАКОВ¹, В.Л. БУЛАТОВ^{1,2}, О.И. ЦАРЕВ¹,
С.М. ХМЕЛЬНИКЕР³, Д.А. РОСУХОВСКИЙ¹

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ ХРАНЕНИИ СЕГМЕНТОВ ВЕН В ПЕРФТОРАНЕ И ДРУГИХ СРЕДАХ КОНСЕРВАЦИИ

ФГБУ «НИИ Экспериментальной Медицины» СЗО РАМН¹,

г. Санкт-Петербург,

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН²,

МБУ «Городская клиническая больница № 14»³, г. Екатеринбург,

Российская Федерация

Цель. Сравнить показатели жизнеспособности эндотелия при кратковременной консервации венозных сегментов *in vitro* в «Перфторане», физиологическом растворе, венозной и артериальной крови пациента.

Материал и методы. Исследованы фрагменты большой подкожной вены, взятые интраоперационно в ходе аортокоронарного шунтирования у 58 пациентов с ишемической болезнью сердца. Исследуемые участки помещались в пробирки равными объемами по 10 мл. В качестве консервантов применялись 0,9% раствор NaCl, гепаринизированная аутоартериальная и аутовенозная кровь, перфторан. Контрольная браш-биопсия интимы проводилась тотчас после взятия операционного материала, последующие – на 15 и 30 минутах консервации. Изучено 522 пленчатых препарата эндотелия. Из них – 58 контрольных препаратов, 232 – на 15 минуте консервации и 232 – на 30 минуте консервации в исследуемых средах. Проведен количественный подсчет доли эндотелиоцитов с признаками некробиоза в 5 полях зрения каждого пленчатого препарата.

Результаты. На контрольных пленчатых препаратах медиана доли эндотелиоцитов с признаками некроза 10%, интерквартильный размах 8-13%. На 15 минуте консервации отмечена наименьшая доля клеток с необратимыми изменениями эндотелия в пробе с «Перфтораном», медиана 18%, интерквартильный размах 16-20%. На 30 минуте консервации во всех препаратах отмечается значительная доля некроза, минимальная в пробе с перфтораном, медиана 29%, интерквартильный размах 26-32%, максимальные – в аутовенозной крови и физиологическом растворе.

Заключение. Решающий фактор сохранности эндотелия венозного трансплантата – время. Минимальная деградация эндотелия венозного сегмента наблюдается непосредственно после изъятия из кровотока венозного трансплантата. При хранении венозного сегмента до 15 минут в качестве среды консервации рекомендуется использовать «Перфторан». Консервация более 15 минут нежелательна из-за высоких показателей некроза эндотелия во всех исследованных средах.

Ключевые слова: перфторан, венозный клапан, пересадка, транспозиция, эндотелий, среда консервации, посттромботическая болезнь

Objectives. To compare the indicators of endothelium viability at short-term conservation of vein segments in Perftoran, physiological solution, venous, arterial blood of a patient *in vitro*.

Methods. Fragments of the great saphenous vein taken intraoperatively during the coronary artery bypass surgery in 58 patients with the ischemic heart disease have been examined. The examined fragments were placed in the test tubes with the equal volume of 10 ml each. 0.9% NaCl solution, heparinized auto-arterial and auto-venous blood and perftoran were used as preservatives. The control brush biopsy of intima was performed immediately after the surgery material taking. The following ones were performed on the 15th and 30th minutes of conservation. 522 membranous specimens of endothelium were examined. They included 58 control specimens, 232 specimens were taken on the 15th minute and 232 – on the 30th minute of conservation in the test media. A quantitative calculation of the proportion of endotheliocytes with the signs of necrobiosis was carried out in 5 fields of vision of each membranous specimen.

Results. On the control membranous specimens the median of the proportion of endotheliocytes with signs of necrosis made up 10%, the interquartile range (IQR) – 8-13%. On the 15th minute of conservation the minimum proportion of cells with irreversible endothelium changes was observed in the sample with Perftoran: median – 18%, interquartile range – 16-20%. On the 30th minute of conservation a considerable proportion of necrosis was observed in all specimens, the minimum one was in the sample with Perftoran: median – 29%, interquartile range – 26-32%; the maximum ones were in auto-venous blood and in physiological solution.

Conclusions. The determinant factor for preservation of vein graft endothelium is considered to be time. The minimum degradation of the venous segment with endothelium was observed immediately after taking a vein graft from the blood flow. If a vein segment is kept for less than 15 minutes Perftoran is recommended to be used as a conservation medium. Conservation for more than 15 minutes is undesirable due to many indicators of endothelium necrosis in all test media.

Keywords: perforan, venous valve, transplantation, transposition, endothelium, media of conservation, post-thrombotic syndrome

Novosti Khirurgii. 2013 Sep-Oct; Vol 21 (5): 40-44

Viability of endothelium at short-term storage of vein segments in Perforan and in other conservation media

E.V. Shaidakov, V.L Bulatov, O.I. Tsarev, S.M. Hmelniker, D.A. Rosuhovsky

Введение

Перспективным направлением реконструктивной хирургии глубоких вен нижних конечностей в лечении посттромботической болезни (ПТБ) является транспозиция клапаносодержащих сегментов вен [1, 2, 3]. Одной из нерешенных проблем при этом продолжает оставаться тромбоз глубоких вен (ТГВ), подвергнутых реконструкции. Несмотря на профилактику тромботических осложнений, согласно отечественным и зарубежным рекомендациям [4, 5], частота проксимального ТГВ у данной категории пациентов варьирует в диапазоне 4-6% в ближайшие 6 недель после операции [6, 7]. Это определяет необходимость дальнейшего поиска дополнительных способов предотвращения данного осложнения.

Повреждение венозной стенки как составляющая триады Вирхова – неминуемое событие при пересадке венозного сегмента – увеличивает риск послеоперационного тромбоза. По данным экспериментального исследования на животных, полная реэндотелизация венозного трансплантата происходит на сроке до 4 мес. [8]. При этом доказано, что чувствительность пересаживаемых тканей к гипоксии имеет первостепенное значение и даже кратковременная ишемия приводит к той или иной степени повреждения, вплоть до некробиотических изменений. Так, ишемизированный венозный сегмент является наиболее уязвимым местом для тромбообразования в ранние сроки после вмешательства [9, 10].

Традиционно в качестве среды временной интраоперационной консервации венозных сегментов используется физиологический раствор [11]. Использование среды-переносчика кислорода гипотетически снизит интраоперационную ишемию трансплантата и повысит его жизнеспособность. В связи с этим, представляется актуальным сравнение кровезаменителя «Перфторан», гепаринизированной аутовенозной и артериальной крови [12, 13] в качестве сред кратковременной консервации венозных сегментов в ходе операций по пересадке аутовенозных сегментов.

Цель исследования: сравнить динамику жизнеспособности эндотелия при кратковременной консервации венозных сегментов *in vitro* в «Перфторане», физиологическом раство-

ре, венозной и артериальной крови пациента.

Материал и методы

Исследование выполнено на базах трех учреждений: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, г. Санкт-Петербург; 1 клиника хирургии усовершенствования врачей Федерального государственного казенного военного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург; Муниципальное бюджетное учреждение «Городская клиническая больница № 14», г. Екатеринбург.

Набор материала и цитологическое исследование проведено в сроки с декабря 2010 г. по декабрь 2012 г. Исследованы фрагменты большой подкожной вены длиной 5 см, взятые интраоперационно в ходе аортокоронарного шунтирования у 58 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). **Критерий исключения:** варикозное расширение вен в бассейне большой подкожной вены (БПВ).

Целевая вена выделялась операционным доступом по Маделунгу. Исследуемый участок БПВ разобщался скальпелем № 21 на 5 фрагментов длиной по 1 см. С одного тотчас производилась браш-биопсия интимы с последующим приготовлением пленчатого препарата эндотелия. Оставшиеся 4 венозных фрагмента помещались в 4 пробирки с исследуемыми средами. Равными объемами по 10 мл в качестве консервантов применялись 0,9% раствор NaCl, гепаринизированная аутоартериальная и аутовенозная кровь, «Перфторан». Последующие биопсии проводились на 15 и 30 минутах консервации.

Методика приготовления пленчатых препаратов. Браш-биопсия интимы проводилась между клапанами цитологической щеткой-скарификатором диаметром 1 мм. Биоптат помещался на предметное стекло. С целью направления пленчатого препарата добавлялась капля 0,9% раствора NaCl, после чего лишнюю жидкость удаляли с поверхности предметного стекла с помощью фильтровальной бумаги.

Фиксация смесью спирт-эфир в соотношении 1:1, окраска гематоксилином и эозином.

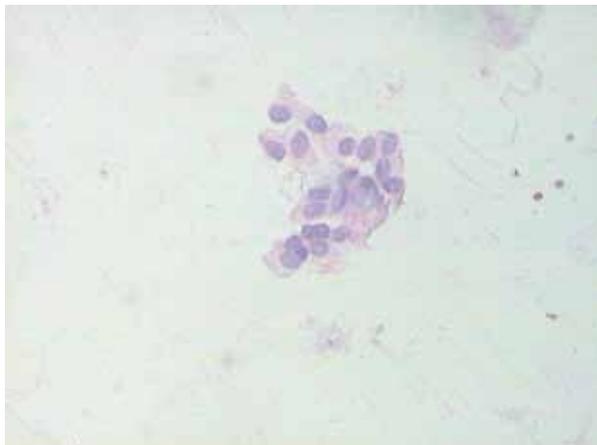
Оценка результата. Всего исследовано 522 пленчатых препарата эндотелия: из них – 58 контрольных препаратов, приготовленных из контрольной биопсии интимы, 232 – на 15 минуте консервации и 232 – на 30 минуте консервации в исследуемых средах. Проведен количественный подсчет доли эндотелиоцитов с признаками некробиоза в 5 полях зрения каждого пленчатого препарата. Использован световой бинокулярный микроскоп при увеличении $\times 400$. В цитологическом анализе учитывались следующие признаки дегенерации и некроза эндотелия: кариолизис, кариорексис, кариопикноз, разрыв кариолемы, нарушение целостности цитолемы, набухание ядер с образованием оптической полости, выраженная метахромазия клетки. На рис. 1 представлен один из контрольных пленчатых препаратов – морфологически сохраненные эндотелиоциты, на рис. 2 – клетки с явными признаками некроза.

Статистический анализ. Для расчетов использована платформа для анализа данных KNIME (The Konstanz Information Miner), KNIME Desktop, версия 2.6.2 [14, 15]. Проверка гипотезы о нормальности распределения в контрольной и исследуемых группах проведена на основании критерия Шапиро-Уилка, с применением возможностей языка R [16]. При сравнительном анализе применен метод непараметрической статистики: парный тест, критерий Вилкоксона.

Результаты

Исследованные выборки не подчинялись закону нормального распределения. На контрольных пленчатых препаратах медиана (Me) доли эндотелиоцитов, имеющих признаки

Рис. 1. Контрольный пленчатый препарат эндотелия. Большинство клеток морфологически сохранены. Ув. $\times 400$



некробиоза – 10%, интерквартильный размах (ИР) 8-13%. На 15 минуте консервации в исследуемых средах межгрупповые различия долей клеток с признаками некробиоза были достоверны на уровне $p < 0,05$, исключение – пара аутовенозная кровь – физиологический раствор ($p = 0,96$). Наименьшая доля клеток с необратимыми изменениями эндотелия была в пробе с «Перфтораном» Me – 18%, ИР 16-20% (рис. 3).

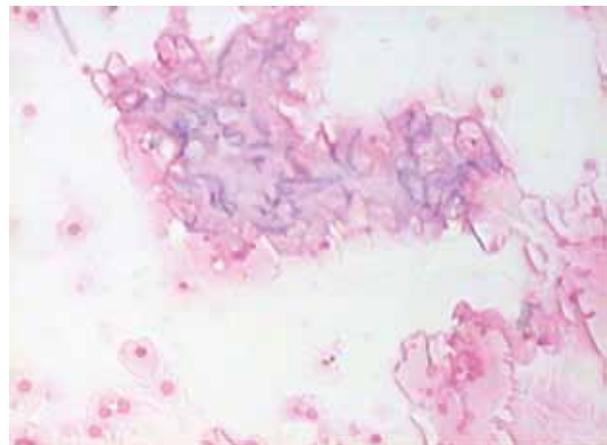
На 30 минуте консервации отсутствовали достоверные различия в парах сравнения – аутоартериальная кровь – физраствор ($p = 0,02$) и аутоартериальная кровь-аутовенозная кровь ($p = 0,1$). Минимальные значения доли эндотелиоцитов с признаками дегенерации в пробе с перфтораном – Me – 29%, ИР – 26%-32%. Максимальные в аутовенозной крови и физиологическом растворе (рис. 4).

При внутригрупповом анализе во всех исследуемых средах отмечалась динамика прогрессирующего увеличения доли эндотелиоцитов с признаками дегенерации во времени. Различия исследуемого показателя некробиоза были достоверны на уровне $p < 0,05$ в парах контроль – 15 мин и 15-30 мин.

Обсуждение

Выполненное исследование подтверждает гипотезу необратимой дегенерации части эндотелиальных клеток во времени, начиная от изъятия трансплантата. Похожие данные получены в эксперименте S. Raju et al. на собаках [8]. В работе автор указывает на тяжелое повреждение эндотелия уже через 20 мин после пересадки сегментов аутовен. Кроме того, дегенерация эндотелия продолжается и после операции. Через 28 дней регистрируется полная десквамация

Рис. 2. Пленочный препарат эндотелия. Тотальный некроз эндотелия. Ув. $\times 400$



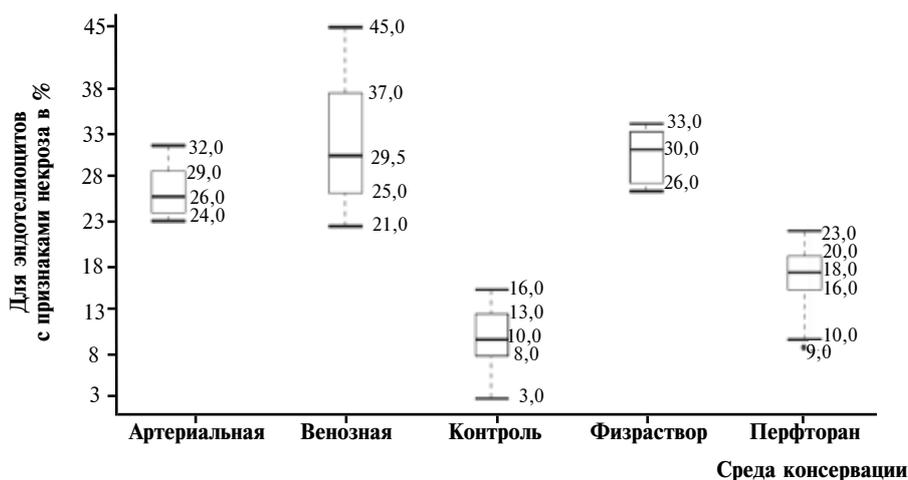


Рис. 3. Диаграмма размаха доли эндотелиоцитов с признаками некробиоза в пленчатых препаратах, приготовленных из соскоба интимы. Время консервации в исследуемых средах – 15 минут

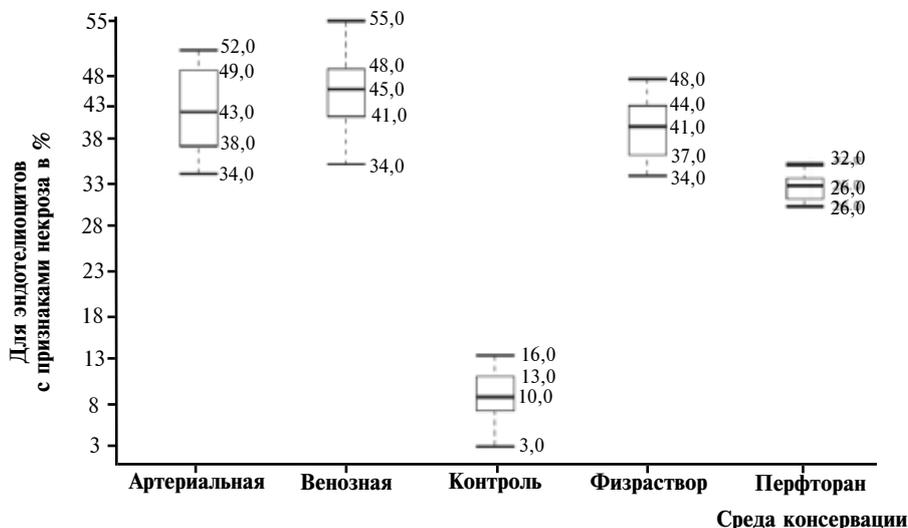
эндотелия и оголение базальной мембраны.

Следует учесть, что количественные показатели некроза эндотелия в настоящем исследовании нельзя экстраполировать на послеоперационный результат. В эксперименте цифры могут быть завышены, поскольку во время приготовления пленчатого препарата до фиксации эндотелий также травмируется. Это наглядно видно на контрольных препаратах, где медиана доли клеток с признаками некробиоза уже составляет 10%, ИР – 8-13%.

При консервации в сроки 15 и 30 мин во всех пробах наблюдалась прогрессирующая деградация эндотелия. Вызывает интерес тот факт, что в исследуемых средах динамика деградации эндотелия диссоциирует с распределением теоретической кислородной емкости консерванта, то есть не подчиняется закону: больше кисло-

родная емкость – меньше деградации. Теоретически можно было бы ожидать распределение в следующем порядке: лучшие результаты в артериальной крови, где кислородная емкость ~ 21 об.%, затем в венозной крови ~ 12 об.%, «Перфторане» ~ 7 об.% и физиологическом растворе ~ 2,4 об.%. На практике лучшие результаты консервации получены в пробе с «Перфтораном». Возможной причиной такого результата может быть специфика поверхности газообмена. «Перфторан» является химически инертным соединением, не подвергающимся метаболическим превращениям. При этом суммарная поверхность частичек (в 10 об.%) субмикронной эмульсии в 100 мл препарата равна 847 м², что более чем в 12 раз превышает суммарную поверхность эритроцитов, содержащихся в таком же объеме крови – 70 м² [12, 13, 17].

Рис. 4. Диаграмма размаха долей эндотелиоцитов с признаками некробиоза в пленчатых препаратах, приготовленных из соскоба интимы. Время консервации в исследуемых средах – 30 минут



Заключение

Решающий фактор сохранности эндотелия венозного трансплантата — время. Минимальная деградация эндотелия венозного сегмента наблюдается непосредственно после изъятия из кровотока венозного трансплантата. При планировании краткосрочного хранения венозного сегмента (до 15 минут) в качестве среды консервации рекомендуется использовать «Перфторан». Если консервация предполагается в течение более 15 минут, следует учесть высокие показатели некроза эндотелия.

Конфликт интересов отсутствует

Благодарности. Коллектив авторов выражает благодарность М.И. Гальченко (кафедра электротехники, электроснабжения, автоматики и информационных технологий Государственного Аграрного Университета, г. Санкт-Петербург) за помощь в математико-статистическом анализе данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Веденский А. Н. Свободная пересадка венозных клапанов при посттромботической болезни / А. Н. Веденский, В. В. Сабельников, И. М. Игнатьев // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. — 1988. — Т. 141, N 11. — С. 40–45.
2. Способ образования микроанастомоза при свободной пересадке венозных клапанов : пат. РФ МПК 6 А61В17/11 / И. М. Игнатьев ; заявитель : Казан. гос. мед. ун-т ; заявл. 28.05.1997 ; опубли. : 20.05.1999.
3. Vein valve transplantation / S. A. Taheri [et al.] // Am J Surg. — 1985 Aug. — 150, N 2. — P. 201–202.
4. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозомболических осложнений // Флебология. — 2010. — Т. 4, № 2. — Вып. 2.
5. Executive summary: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed. / G. H. Guyatt [et al.] // Chest. — 2012 Feb. — Vol. 141, N 2. — Suppl. — P. 7S–47S.
6. Axillary vein transfer in trabeculated postthrombotic

- veins / S. Raju [et al.] // J Vasc Surg. — 1999 Jun. — Vol. 29, N 6. — P. 1050–62.
7. Raju S. Technical options in venous valve reconstruction / S. Raju, J. D. Hardy // Am J Surg. — 1997 Apr. — Vol. 173, N 4. — P. 301–307.
8. Raju S. The response of venous valvular endothelium to autotransplantation and in vitro preservation / S. Raju, J. T. Perry // Surgery. — 1983 Nov. — Vol. 94, N 5. — P. 770–75.
9. Agutter P. S. Experimental Validation of Methods for Prophylaxis against Deep Venous Thrombosis: A Review and Proposal / P. S. Agutter, P. C. Malone, I A. Silver // Thrombosis [Electronic resource]. — 2012 Jan. — Mode of access : <http://dx.doi.org>.
10. Malone PC. The aetiology of deep venous thrombosis / P. C. Malone, P. S. Agutter // QJM. — 2006 Sep. — Vol. 99, N 9. — P. 581–93.
11. Seshadri R. Surgical repair of deep vein valve incompetence / R. Seshadri // Handbook of venous disorders. Guidelines of the American Venous Forum / Ed. P. Gloviczki. — 3rd ed. — London, 2009. — P. 85–101.
12. Иваницкий Г. Р. Кровезаменитель «Перфторан» / Г. Р. Иваницкий, С. И. Воробьев // Вестн. Рос. акад. наук. — 1997. — Т. 67, № 11. — С. 998–1013.
13. Софронов Г. А. Перфторуглеродные соединения в экспериментальной и клинической медицине. Библиографический указатель. — СПб., 2004. — 268 с.
14. KNIME: Konstanz Information Miner // [Electronic resource]. — Mode of access : <http://www.knime.org>.
15. KNIME: The Konstanz Information Miner. Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization / M. R. Berthold [et al.]. — Berlin : Springer, 2007. — P. 319–26.
16. Язык R. Project for Statistical Computing // [Electronic resource]. — Mode of access : <http://www.r-project.org>.
17. Культивирование животных клеток на жидких перфторуглеродах / Г. Р. Иваницкий [и др.] // (ДАН) Дан. акад. наук. — 1981. — Т. 28, № 1. — С. 225–28.

Адрес для корреспонденции

197376, Российская Федерация,
г. Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12,
ФГБУ «НИИ Экспериментальной Медицины»
СЗО РАМН,
тел.моб.: +7(921) 885-72-01,
e-mail: bulatovvas@gmail.com,
Булатов Василий Леонидович

Сведения об авторах

Шайдаков Е.В., д.м.н., профессор, заместитель директора ФГБУ «НИИ Экспериментальной Медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.
Булатов В.Л., сосудистый хирург клиники ФГБУ «НИИ Экспериментальной Медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург, научный сотрудник лаборатории биogerонтологии Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.
Царев О.И., к.м.н., сосудистый хирург клиники ФГБУ

«НИИ Экспериментальной Медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.
Хмельникер С.М., к.м.н., исполняющий обязанности главного врача МБУ «Городская клиническая больница № 14», г. Екатеринбург.
Росуховский Д.А., к.м.н., заведующий отделением сосудистой хирургии клиники ФГБУ «НИИ Экспериментальной Медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.

Поступила 20.06.2013 г.