

Девитализация ксеноартерий: новый подход к снижению иммуногенности#

UDC 615.361.13:612.017

D.V. BYZOV*, N.A. CHIZH, I.P. MIKHAYLOVA, O.P. SYNCHIKOVA, B.P. SANDOMIRSKY

Devitalization of Xenoarteries: New Approach to Decrease Immunogeneity#

Сердечно-сосудистые заболевания и, прежде всего, атеросклеротическое поражение артерий, являются ведущими причинами смертности и инвалидизации населения в мире. Наиболее распространенным, а часто и единственно возможным, хирургическим методом лечения окклюзионных поражений магистральных сосудов является замена участка поврежденной артерии сосудистым графтом. Сосудистое протезирование широко используется и в качестве вспомогательного хирургического метода в комплексе лечения не-сосудистой патологии: обеспечение гемодиализного сосудистого доступа, при острых травмах, радикальных онкологических и пластических операциях, органных трансплантациях. «Золотым стандартом» сосудистого протезирования артерий малого диаметра (~6 мм) считаются аутогенные артерии и вены. Однако существуют факторы, в значительной степени ограничивающие их повсеместное применение. Перспективным считается разработка биологических сосудистых протезов на основе девитализированных ксеногенных тканей. Недостатки химических методов девитализации и децеллюларизации обусловили поиск альтернативных методов обработки [2].

Цель исследования – экспериментальная оценка эффективности использования низких температур в комбинации с ионизирующим облучением для девитализации артерий малого диаметра, разработка метода получения сосудистых ксеноскаффолдов.

Предметом исследования были внутренние грудные артерии половозрелых свиней. Внутренний диаметр скелетированных артерий варьировал от 2,5 до 3,5 мм, длина – от 5 до 20 см.

Сосуды помещали в стерильные криоконтейнеры и погружали в жидкий азот. После отогрева на водяной бане пробирки подвергали дискретному облучению потоком электронов в дозе 25КГр при помощи линейного ускорителя электронов на базе ННЦ ХФТИ.

Для оценки влияния указанных физических факторов на артерии изучали морфологическую структуру

Cardiovascular diseases and first of all the sclerotic injuries of arteries are the causes of mortality and disability in world human population. The most common and often the only possible method for surgical treatment of occlusive diseases of great vessels is the change of damaged artery section by vascular graft. Vascular prosthesis is widely used also as a secondary surgical method in complex treatment of non-vessel pathology: providing of hemodialysis vascular access, at acute injuries, radical oncological and plastic surgeries, organ transplantations. ‘Gold standard’ in vascular prosthesis of arteries of small diameter (~6 mm) is the using of autogenic arteries and veins, however, there are some restrictions for their widespread application. The development of biological vascular prostheses on the base of devitalized xenogeneic tissues is considered to be prospective. The disadvantages of chemical methods of devitalization and decellularization stipulated the search of alternative methods for prostheses treatment [2].

The research aim was to experimentally assess the efficiency of using low temperatures combined with ionizing irradiation for devitalization of arteries of small diameter, development of method for obtaining the vascular xenoscaffolds.

The research objects were the internal thoracic arteries of mature pigs. Internal diameter of skeletonized arteries varied from 2.5 to 3.5mm, length was from 5 to 20 cm.

The vessels were placed into sterile cryocontainers and plunged into liquid nitrogen. After thawing in water bath the flasks were exposed to discrete irradiation of 25 kGy dose with electron beam in linear electron accelerator at the National Science Center Kharkov Institute of Physics and Technology.

To assess the effect of the mentioned physical factors on arteries we studied morphological structure of arterial wall, measured biomechanical properties of arteries, determined biocompatibility and degree of immunogeneity *in vivo* after transplantation of arterial sections under

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Данное исследование было представлено на мини-симпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 22 мая 2012 года в г. Харькове.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; e-mail: cryo@online.kharkov.ua

This reseach was presented at minisimposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22nd of May, 2012.

артериальной стенки, измеряли биомеханические свойства артерий, изучали биосовместимость и степень иммуногенности *in vivo* при имплантации участков артерий под кожу крысам линии Wistar, а также функциональность и тромбогенность *in vivo* при трансплантации в системный кровоток.

Было установлено, что замораживание-отогрев приводит к формированию обширных областей эндотелизации, чередующихся с участками сохранившейся эндотелиальной выстилки [1]. В гладкомышечных клетках (ГМК) было выявлено изменение формы и ультраструктуры ядер, что проявлялось в отсутствии инвагинаций кариолеммы и разрыхлении гетерохроматина. Соединительно-тканые волокна артерий после замораживания имели сниженную извитость и компактное расположение. При этом их целостность, также как и целостность внутренней эластической мембраны (ВЭМ), не нарушалась.

Ионизирующее облучение приводило к полной десквамации эндотелия. Сосудистая медиа характеризовалась несколько разволокненными мышечными пучками при наличии сегментированных и деформированных ядер ГМК, что указывает на интерфазную гибель клеток. Внутренняя эластическая мембрана не имела грубых структурных изменений, сохраняла целостность и непрерывность [4]. Соединительно-тканые волокна были уплотнены и компактно расположены.

Комбинирование замораживания-отогрева и последующего ионизирующего облучения позволило добиться не только долгосрочного хранения артерий, но и максимального повреждающего воздействия на клеточные элементы сосудистой стенки. Эндотелиальная выстилка отсутствовала на всем протяжении артерий. Средняя оболочка состояла из деформированных мышечных волокон, на протяжении которых определялись микроразрывы. Гладкомышечные клетки подвергались значительной деструкции и в основном выявлялись в виде полостей с фрагментами клеточных мембран. Структура ВЭМ и соединительно-тканых волокон преимущественно сохранялась. Волокна были уплотнены и располагались компактно за счет заполнения пространства разрушенных гладкомышечных клеток [4].

Кривые зависимости напряжение-деформация нативных артерий и артерий на этапах девитализации имели характерную для соединительно-тканых структур S-образную форму. Начальные участки кривых обработанных сосудов, соответствующие области физиологических нагрузок, находились в пределах границ variability нативных сосудов. Продолжительность областей упругой деформации всех групп обработанных артерий в значительной степени превышала данный показатель в нативных артериях, т. е. приложенная нагрузка, вызывающая начальное разрушение отдельных соединительно-тканых фибрилл в группе нативных артерий, приводила лишь к допол-

skin of Wistar rats as well as functionality and thrombogenicity *in vivo* after transplantation of prostheses into system blood circulation.

We have established that during freeze-thawing there were formed extensive areas of endothelialization with the regions of preserved endothelial lining [1]. In smooth-muscle cells (SMCs) we have found the change of nuclei form and ultrastructure revealed in the absence of karyolemma invagination and heterochromatin loosening. Connective-tissue arterial fibers after freeze-thawing had a decreased tortuosity and compact location. Their integrity as well as the one of internal elastic membrane (IEM) were preserved.

Ionizing irradiation induced a complete desquamation of endothelium. Vascular media was characterized by slightly dissociated muscle bundles with segmented and deformed nuclei of SMCs, that pointed to interphase cell death. Internal elastic membrane had no gross structural changes, it preserved the integrity and continuity [4]. Connective-tissue fibers were compressed and compactly located.

Combining freeze-thawing with the following ionizing irradiation enabled to achieve not only long-term storage of arteries but also maximal damaging effect on cell elements of vascular wall. Endothelial lining was absent throughout the arteries. Middle coat consisted of deformed muscle fibers along which the microruptures were noted. Smooth-muscle cells were exposed to a significant destruction and mainly were appeared as the cavities with the fragments of cell membranes. Structure of IEM and connective-tissue fibers was mostly preserved. The fibers were compressed and compactly located due to the filling of damaged SMCs space [4].

The tension-deformation curve of native arteries and the arteries at the devitalization stages had S-like shape specific for connective-tissue structures. Initial sections of the curves of treated vessels corresponded to the areas of physical loading were within the limits of variability of native vessels. Length of elastic deformation areas of all the treated arteries in a great extent exceeded the index of native arteries, *i. e.* imposed load causing an initial damage of connective-tissue fibrils in the group of native arteries led only to their additional lengthening after exposure of the studied physical factors.

We have revealed freeze-thawing as significantly increasing the strength of arteries in longitudinal direction that could be explained by a partial dehydration of vascular wall and formation of cross-links between separate connective-tissue fibrils. When irradiating with electron beams the strength characteristics of arteries increased that was associated with formation of additional cross-linking between fibrils under effect of ionizing irradiation. Preliminary freeze-thawing decreased irradiation effect by increase in strength that was probably associated with radioprotective impact of freeze-thawing reducing the number of the formed cross-links.

нительному их удлинению после воздействия изучаемых физических факторов.

Было выявлено, что замораживание-отогрев достоверно повышает прочность артерий в продольном направлении, что объясняется частичной дегидратацией сосудистой стенки и формированием кросс-линк-связей между отдельными соединительно-тканными фибриллами. Облучение потоками электронов также приводило к повышению прочностных характеристик артерий, что также связано с формированием дополнительных поперечных сшивок между фибриллами под влиянием ионизирующего облучения. Предварительное замораживание-отогрев снижало эффект облучения по повышению прочности, что, по-видимому, связано с радиопротекторным действием процесса замораживания-отогрева, снижающего количество сформированных кросслинк-связей.

Прочность артерий в радиальном направлении достоверно повышалась во всех группах облученных артерий. Процесс замораживания-отогрева не влиял на этот показатель, что связано с минимальным воздействием на эластические волокна, поскольку именно они определяют предельную прочность при биаксиальной нагрузке.

Результаты ксеноимплантации продемонстрировали наличие острой реакции отторжения переходящей в хронический воспалительный процесс в группе нативных артерий. На ранних сроках наблюдения артерии после замораживания имели менее выраженную клеточную реакцию с последующими фиброзно-склеротическими изменениями сосудистой стенки. Реакции воспаления и отторжения в группе артерий после замораживания и последующего облучения отсутствовали, при этом к 8-й неделе наблюдения отмечалось заселение сосудистой стенки макрофагами и клетками фибробластического ряда, свидетельствующее о ремоделировании имплантата.

Было выполнено 10 операций сосудистого протезирования с использованием в качестве графтов девитализированных ксеноартерий. Антикоагулянтные и антиагрегантные препараты в послеоперационном периоде не применялись. Максимальная длительность наблюдения составила 14 месяцев. Острые тромбозы, обусловленные свойствами протеза, отсутствовали [3].

Гистологическое исследование девитализированных протезов подтвердило отсутствие реакций отторжения и иммуногенного воспаления на всех сроках наблюдения. К 7-м суткам наблюдения макроскопически люминальная поверхность графта не отличалась от аорты. Соединительно-тканная структура протеза была представлена упорядоченно расположенными, непрерывными волокнами без признаков биодegradации и деструктивно-некротических изменений. Клеточные фрагменты не визуализировались. В околоанастоматических зонах определялись отдельные группы эндотелиоцитов. К 15-м суткам послеоперационного периода были выявлены формирование

Arterial strength in radial direction significantly raised in all the groups of irradiated arteries. Freeze-thawing did not influence this index that could be associated with a minimal impairment of elastic fibers which exactly determine an ultimate strength at biaxial load.

The results of xenoinplantation have demonstrated the presence of acute host reaction becoming a chronic inflammatory process in the group of native arteries. During early observation terms the frozen-thawed arteries had less expressed cell response with further fibro-sclerotic changes of vascular wall. Reactions of inflammation and rejection in the group of arteries after freezing and the following irradiation did not occur, moreover to the 8th week of observation we noted the colonization of vascular wall by macrophages and cells of fibroblast series that attested the implant remodeling.

We have performed 10 surgeries of vascular prosthesis using the devitalized xenoarteries as the grafts. Anticoagulant and antiplatelet preparations were not used during postoperative period. Maximal duration of observation was 14 months. Acute thromboses stipulated by properties of prosthesis were absent [3].

Histological analysis of devitalized prostheses showed the absence of the reactions of rejection and immunogenic inflammation at all investigation stages. To the 7th day of observation the gross appearance of graft luminal surface did not differ from an aorta one. Connective-tissue structure of prosthesis was presented by ordered, continuous fibers without signs of biodegradation and destructive-necrotic changes. No cell fragments were visible. Several endotheliocytic groups were found in perianastomotic zones. To the 15th day post surgery we have revealed the formation of numerous endothelization foci along the entire length of prosthesis luminal surface, colonization of vascular media by single macrophages and initiation of *vasa vasorum* formation in adventitial layer [3, 5]. To the 9th month post surgery the destructive-degenerative changes in bioprosthesis were absent, in vascular media there were single macrophages, fibroblasts and SMCs with preserved full-value connective-tissue structure of prosthesis wall. Maximal colonization of graft wall by recipient cells was found in the 9–12th month post transplantation. To the 12th month of observation we noted a significant decrease in cell number, predominantly fibroblasts, in vascular media and the integrity and order in connective-tissue structure of devitalized vessel was preserved. There were no destructive-necrotic changes along the whole graft length [6].

Therefore a maximal observation term after transplantation made 14 months. Experimental animals remained entirely physically active. During the whole postoperative period the devitalized xenografts functioned properly providing a sufficient blood supply, the signs of rejections, immunogenic inflammations, stenoses and aneurysmal dilatations were absent.

множественных очагов эндотелизации на всем протяжении люминальной поверхности протеза, заселение сосудистой медики единичными макрофагами и начало формирования сети *vasa vasorum* в адвентициальном слое [3, 5]. К 9-му месяцу послеоперационного периода деструктивно-дегенеративные изменения со стороны биопротеза отсутствовали, в сосудистой медики обнаруживались единичные макрофаги, фибробласты и ГМК при сохранении полноценной соединительно-тканной структуры стенки протеза. Максимальное заселение стенки графта клетками реципиента было выявлено на 9–12 месяцев после трансплантации. Так, к 12-му месяцу наблюдения отмечалось значительное увеличение количества клеток, преимущественно фибробластов, в сосудистой медики при сохранении целостности и упорядоченности соединительно-тканной структуры девитализированного сосуда. Деструктивно-некротические изменения отсутствовали на всем протяжении графта [6].

Таким образом, максимальный срок наблюдения после трансплантации составил 14 мес. Экспериментальные животные сохраняли физиологическую активность в полном объеме. В течение всего послеоперационного периода девитализированные ксенографты адекватно функционировали, обеспечивая достаточное кровоснабжение, признаки отторжений, иммунных воспалений, стенозов и аневризматических дилатаций отсутствовали.

Полученные положительные результаты обуславливают целесообразность дальнейших исследований и возможность внедрения девитализированных ксеноартерий в клинику.

The obtained positive results enable the advisability of further research and possibility to implement devitalized xenoarteries in clinical practice.

References

1. *Byzov D.V., Synchikova O.P., Mikhaylova I.P., Sandomirsky B.P.* Using of low temperatures for creation of xenogeneic vascular scaffolds // *Biotechnologiya*. – 2010. – Vol. 3, N1. – P. 41–45.
2. *Byzov D.V., Synchikova O.P., Pushkova E.N. et al.* Biotechnological aspects of creation of vascular transplants // *Biotechnology*. – 2010. – Vol.3, N3. – P.21–30.
3. *Byzov D.V., Chizh N.A., Mikhaylova I.P. et al.* Devitalized vascular prostheses: in vivo study // *Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov*. – 2011. – Vol. 12, N4. – P. 81–90.
4. *Byzov D.V., Repin N.V., Marchenko L.N. et al.* Ultrastructure of arteries after devitalization by low temperatures and ionizing irradiation // *Problems of Cryobiology*. – 2011. – Vol. 21, N2. – P. 137–146.
5. *Byzov D.V., Sandomirsky B.P.* Creation of devitalized vascular prostheses of small diameter // *Int. J. Artif. Org.* – 2011. – Vol. 34, №8. – P. 708.
6. *Byzov D., Mikhaylova I., Chizh N. et al.* Development of biological small diameter vascular grafts // *Cardiovasc. Res.* – 2012. – Vol. 93, Suppl. 1. – P. 39.

Accepted 01.06.2012

Литература

1. *Бызов Д. В., Сынчикова О.П., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П.* Применение низких температур для создания ксеногенных сосудистых скаффолдов // *Биотехнология*. – 2010. – Т. 3, № 1. – С. 41–45.
2. *Бызов Д.В., Сынчикова О.П., Пушкова Е.Н. и др.* Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий // *Биотехнология*. – 2010. – Т. 3, №3. – С. 21–30.
3. *Бызов Д.В., Чиж Н.А., Михайлова И.П. и др.* Девитализированные сосудистые протезы, исследование *in vivo* // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2011. – Т. 12, №4. – С. 81–90.
4. *Бызов Д.В., Репин Н.В., Марченко Л.Н. и др.* Ультраструктура артерий после девитализации низкими температурами и ионизирующим облучением // *Проблемы криобиологии*. – 2011. – Т. 21, №2. – С. 137–146.
5. *Byzov D.V., Sandomirsky B.P.* Creation of devitalized vascular prostheses of small diameter // *Int. J. Artif. Org.* – 2011. – Vol. 34, №8. – P. 708.
6. *Byzov D., Mikhaylova I., Chizh N. et al.* Development of biological small diameter vascular grafts // *Cardiovasc. Res.* – 2012. – Vol. 93, Suppl. 1. – P. 39.

Поступила 01.06.2012