

© А.В.Янушко, 2003.

А.В.Янушко

НОВЫЙ МЕТОД ОБРАБОТКИ ВЕНОЗНЫХ ГРАФТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕРОЦИАНИНА 540

РНПЦ "Кардиология"
Минск, Беларусь.

Аннотация: Существующие в настоящее время методы обработки венозных графтов не всегда обеспечивают продолжительное функционирование аутовенозного материала в артериальных позициях. Целью исследования явилась разработка нового альтернативного метода обработки венозных графтов, в основе которого лежит фотодинамическая инактивация в присутствии мероцианина 540 (Мц 540) активно пролиферирующих клеток средней и наружной оболочек вены. Исследование проведено на 30 образцах яремных и бедренных вен собак. Изолированные сосуды с лигированными боковыми ветвями помещали в забуференный фосфатами физиологический раствор, содержащий Мц 540 (10^{-4} - 10^{-7} М), освещали светом слайд-проектора. Изменение структуры стенки вены изучали при микроскопии гистологических препаратов сосудов, окрашенных гематоксилином, эозином и по методу ШИК. Определены условия облучения венозных графтов и концентрации сенсibilизатора, необходимые для избирательной фотооксидации гладкомышечных и соединительнотканых клеток без регистрируемого повреждения эндотелиального слоя вен. Полученные данные свидетельствуют о перспективности метода, основанного на фотосенсибилизиром Мц 540 ремоделировании структуры венозных графтов с целью увеличения продолжительности их функционирования в артериальных позициях.

Ключевые слова: венозный графт, мероцианин 540, фотооксидация.

Использование большой подкожной вены (БПВ) в качестве шунта на операциях аортокоронарного шунтирования (АКШ) - общепринятый стандарт кардиохирургов всего мира. Однако, длительность эффективного функционирования венозных графтов в артериальных позициях ограничивается двумя факторами: образованием вторичной неоинтимы и «прогрессированием атеросклероза». Результатом этих процессов является то, что к 10 годам функционирования только 60% вен сохраняют свою проходимость и лишь 30% остаются полностью интактными. Учитывая то, что в настоящий момент в мире выполнено около 600 000 операций АКШ, поражение венозных шунтов и вызванные в связи с этим рестеноз-зависимые осложнения, являются одной из наиболее актуальных и значимых из нерешенных проблем кардиологии и кардиохирургии в мире.

Образование вторичной неоинтимы происходит за счет дедифференциации сосудистых гладкомышечных клеток, приводящей к их миграции, пролиферации с последующим развитием значительного утолщения стенки графта. Различные способы обработки вен, к сожалению, не принесли результатов, позволяющих увеличить продолжительность эффективного функционирования последних в артериальных позициях. Ингибиторный эффект фотооксидации на пролиферативную активность сосудистых гладкомышечных клеток и фибробластов адвентиции препарированной вены *in vitro* был

изучен Chanada и соавторами в 1998 г. Использование экзогенных фотосенсибилизаторов (0,01% метиленового синего) для катализации данного процесса и экспериментальная оценка на венах кролика *in vivo* впервые показана Ke-Xiang Liu и соавт. в 1999 году.

Мы исследовали индуцированную мероцианином 540 (Мц 540) фотооксидацию венозных графтов собак с последующей их имплантацией в артериальное русло животных на 3 месяца. Мц 540 – флуоресцентный зонд, обладает амфифильными свойствами и имеет отрицательно заряженную группу (рис. 1).

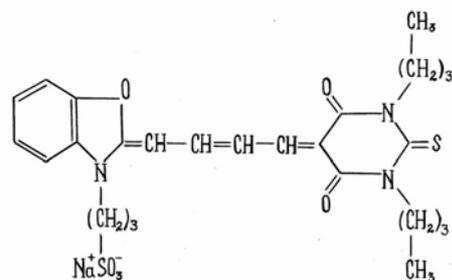


Рис.1

Мц 540 не проникает внутрь клетки и встраивается преимущественно в гидрофобные области клеточной мембраны, в присутствии сыворотки крови избирательно связывается с незрелыми дедифференцированными и трансформированными клетками.

При сенсibiliзировавшем Мц 540 фотодинамическом воздействии удар приходится на плазматическую мембрану, что подтверждается фотоинактивацией мембраносвязанных ферментов и фотоокислением мембранных липидов. Сенсibiliзировавшее Мц 540 фотоповреждение плазматических мембран показано также на клетках глиобластомы: при освещении клеток в присутствии красителя резко возрастало перекисное окисление липидов, уменьшалось количество SH-групп и наблюдалось перекрестное сшивание белков.

Нашей задачей было определить режим воздействия Мц 540 на стенку вены, при котором бы произошло фотоиндуцированное повреждение активно пролиферирующих клеток без изменений эндотелиального слоя.

Работа проведена на 30 образцах яремных и бедренных вен собак, массой более 20 кг. После предварительной гепаринизации (гепарин 1,5 мг/кг массы тела) выделялись яремные и бедренные вены собак, боковые ветви лигировались. Сосуды, заполненные аутокровью, помещались на 10 минут в забуференный фосфатный физиологический раствор (ЗФР) с содержанием мероцианина 540 (Мц 540) в концентрациях от 5×10^{-7} до 5×10^{-5} моль/л. Равномерное освещение образца проводили светом слайд-проектора "Пеленг 500 К" (лампа КГМ, 150 Вт), расположенного на расстоянии 35 см в дозах от 4,5 до 44,6 кДж/м² при интенсивности светового потока 74,4 Вт/м². Для исключения разогрева образцов между ними и проектором помещали водяной фильтр. Для контрольной группы использованы вены, обработанные Мц 540, не подвергшиеся воздействию света. Фотосенсibiliзируемое Мц 540 повреждение клеток венозного сосуда оценивали с помощью цитоморфологического теста по изменению структуры стенки вены, а также на окрашенных различными методами (гематоксилином и эозином, на эластические и коллагеновые волокна, методом ШИК и серебрения) препаратах сосуда в разные сроки после фотоокислации. Морфометрия проводилась с помощью вычислительной системы обработки и анализа изображения ("Leica", Германия) на увеличении $\times 400$ в 5 полях зрения по всему периметру каждого венозного графта (в каждом поле зрения по 10 измерений, $p < 0,05$).

Морфологическая структура полученных образцов вен в зависимости от режима воздействия изменялась от интактной (рис.2) до полной гибели всех слоев стенки (рис.3). Определены условия облучения венозных графтов (25 кДж/м²) и концентрации сенсibiliзатора (5×10^{-6} М), необходимые для избирательной фотоокислации гладкомышечных и соедини-

тельных клеток без регистрируемого повреждения эндотелиального слоя вен (рис. 4).

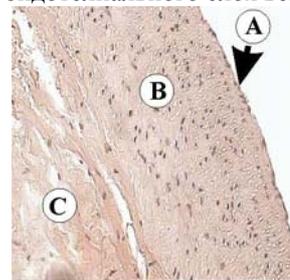


Рис. 2.

А. Интима очень тонкая (нитевидная). Эндотелиоциты преимущественно округлые, отдельные уплощенные; расположены относительно густо и равномерно.

В. Средняя оболочка составляет более половины всей толщи вены, густоклеточная. Клетки по большей части округлые, реже вытянутые. Межклеточное вещество гомогенное.

С. Адвентиция представлена толстыми коллагеновыми волокнами и их пучками, а также немногочисленными диффузно распределенными вытянутыми клетками (фибробласты).

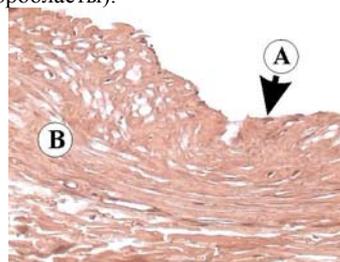


Рис. 3

А. Эндотелиоциты по большей части отсутствуют. Сохранившиеся клетки круглые, гиперхромные или пикнотизированные.

В. Значительная часть клеток медики отсутствует. Определяются лишь единичные пикнотические ядра и апоптотические тельца (очагово).

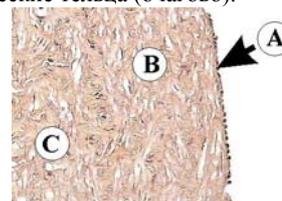


Рис. 4

А. Эндотелиоциты сохранены, преимущественно округлые, расположены густо и равномерно.

В. Средняя оболочка в основном бесклеточная. Очагово выявляются скопления гиперхромных клеток с широкой зоной перичеселлюлярного просветления, очагово с явлениями кариорексиса. Вследствие выпадения клеток в медики сформировано множество щелевидных полостей.

С. Адвентиция представлена толстыми гомогенными коллагеновыми волокнами. Клетки единичные, мелкие, гиперхромные.

В результате исследования выявлена способность клеток наружной и средней оболочек

вен к связыванию фотосенсибилизатора, что позволило использовать данный хромофор для фотоиндуцированного изменения структуры стенки вены путем повреждения активно пролиферирующих гладкомышечных клеток меди и фибробластов наружной и средней оболочек.

Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности метода, основанного на ремоделировании структуры стенки венозного шунта под действием света в присутствии Мц 540. Возможно, данный феномен приведет к увеличению сроков функционирования венозных графтов в артериальных позициях.

Yanushko A. V.

**A NEW METHOD OF THE VEIN GRAFT
TREATMENT USING MEROCYANINE-540**

Center of Cardiology

The purpose of the research was a working out of a new method of the vein grafts treatment, which

Correspondence: ajanushko@rambler.ru

had in the basis a photodynamic inactivation of smooth muscle cells of a medial and an external membrane of a vein in Merocyanine-540 (Mc 540) presence.

The research had been conducted on 30 dogs samples of jugular and femoralis veins. The vessels were placed into a physiological solution, containing Mc 540 (10⁻⁴-10⁻⁷ M) and were exposed to the light of slide projector.

It has been determined optimum conditions of vein grafts irradiation and sensibilizator concentration necessary for choosing photooxidation of smooth muscle cells and adventitious fibroblasts without affecting the viability of endothelial cells.

The received data indicate the prospects of a new method of the treatment aimed at increasing in duration of vein grafts functioning in arterial positions.