
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 616.13-089+606.61

**ПРИМЕНЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ АУТОЛОГИЧНОГО
ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ФАСЦИАЛЬНОГО ЛОСКУТА
ПРИ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЯХ НА АРТЕРИЯХ***А. Н. Лызиков¹, С. А. Гуреев¹, Д. Р. Петренёв²,
Д. Н. Зиновкин³, А. М. Устемчук⁴*¹Гомельский государственный медицинский университет²Институт радиобиологии НАН Республики Беларусь, г. Гомель³Республиканский научно-практический центр

радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

⁴Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

В данной работе описывается методика выделения и получения аутогенного децеллюляризованного фасциального лоскута. Приводятся результаты его применения в эксперименте на лабораторных животных при реконструктивных операциях на бедренных артериях с последующей морфологической оценкой.

Ключевые слова: аутологичный фасциальный лоскут, децеллюляризация, реконструктивно-пластическая операция на артериях, световая микроскопия.

**THE EXPERIMENTAL APPLICATION OF AUTOLOGOUS
DECELLULARIZED FASCIA FLAP IN RECONSTRUCTIVE SURGERY ON ARTERIES***A. N. Lyzikov¹, S. A. Gureyev¹, D. N. Zinovkin³,
D. R. Petrenyov², A. M. Ustemchuk⁴*¹Gomel State Medical University, Gomel²Institute of Radiobiology NAS of Belarus, Gomel³Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel⁴Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk

This paper describes the method of allocating and receiving decellularized autologous fascial flap and presents the results of its experimental application in reconstructive surgery on the femoral arteries, followed by morphological assessment in laboratory animals.

Key words: autologous fascia flap, decellularization, reconstructive and plastic surgery on the arteries, light microscope.

Введение

Одной из проблем реконструктивных операций в сосудистой хирургии остается выбор сосудистого трансплантата, отвечающего ряду требований и подходящего для конкретной клинической ситуации. Многочисленные наблюдения показывают, что использование синтетических сосудистых протезов в ряде случаев осложняется тромбозами, отторжением сосудистого трансплантата, формированием ложных аневризм в области анастомозов и инфекционными осложнениями [1].

Развитие современной клеточной и тканевой инженерии позволяет получать *in vitro* трансплантаты из аутологичных клеток. Основными видами таких трансплантатов являются следующие: 1) сосудистый трансплантат с применением синтетических каркасных основ в комбинации с аутологичными клетками; 2) сосудистый транс-

плантат без синтетического каркаса с использованием только аутологичных клеток [2].

Для создания аутоотрансплантатов с использованием синтетического каркаса чаще используется полипропиленовая сетка или уже готовый сосудистый синтетический протез, на которые наращивается слой аутологичных клеток. Однако перспективным направлением биоинженерии аутоотрансплантатов сосудов — это создание его полностью из тканей пациента без применения синтетических материалов [4].

Аутоотрансплантат без применения синтетической основы имеет наряду с преимуществами один значительный недостаток: тонкостенность и слабость его стенки, из-за чего он не способен выдерживать артериальное давление что значительно ограничивает его применение в практике.

В связи с этим нами предложен материал для каркаса сосудистого трансплантата в виде фасции. Однако при применении ее в качестве нативного материала для реконструкции сосудов возможен риск тромбирования, что связано с активацией тканевых факторов свертываемости. Для уменьшения содержания тканевых факторов, а следовательно, повышения ее тромборезистентности применили метод децеллюляризации [5]. В результате децеллюляризации из биологического материала остается только белковый матрикс с сохраненной архитектоникой ткани. Полученный таким методом фасциальный материал может являться оптимальным для реконструкции сосудов, так как не содержит тканевых факторов свертываемости и сохраняет высокую прочность [3].

Однако, несмотря на положительные коагуляционные и механические характеристики децеллюляризованного материала, остается вопрос о его дальнейшем ремоделировании и приживлении в организме.

Цель

Оценить применение аутологичного децеллюляризованного фасциального лоскута при реконструктивных операциях на артериях в эксперименте.

Материал и методы исследования

Исследование проводилось экспериментально на 7 лабораторных животных (беспородные собаки весом $19 \pm 4,5$ кг). Имплантация децеллюляризованного аутофасциального лоскута проводилась в бедренные артерии в виде заплаты.

Экспериментальная часть выполнялась на базе патофизиологической группы НИЛ Бел-

МАПО, в стандартных условиях вивария. При работе с животными руководствовались методическими рекомендациями «Правила работы с использованием экспериментальных животных» (утв. 16.06.2004 г. ректором ГУО «Белорусская медицинская академия постдипломного образования»). До начала эксперимента животные находились под карантинным наблюдением в течение двух недель в виварии.

Подготовка и обработка фасциального лоскута, а также его децеллюляризация проводилась в условиях лаборатории эндокринологии и биохимии ГНУ «Институт радиобиологии НАН Республики Беларусь».

Хирургические вмешательства по забору фасциального лоскута и по проведению реконструктивных вмешательств на бедренных артериях проводились под комбинированной анестезией: 5 % раствор кетамина 6 мг/кг, тиопентал натрия 50 мг/кг, 0,005 % фентанил и 0,25 % дроперидол в соотношении 1:2. При проведении экспериментальных исследований руководствовались правилами гуманного обращения с животными. С целью профилактики тромбоза внутривенное введение гепарин 50 ЕД/кг.

Для забора фасциального лоскута с передних конечностей животное укладывалось на спину и фиксировалось. После подготовки операционного поля осуществлялся забор фасции с двух сторон. Область взятия материала обрабатывалась 5% спиртовым раствором йода. Производился разрез кожи с дальнейшим выделением фасции и выкраиванием свободного лоскута размером 2×3 см.

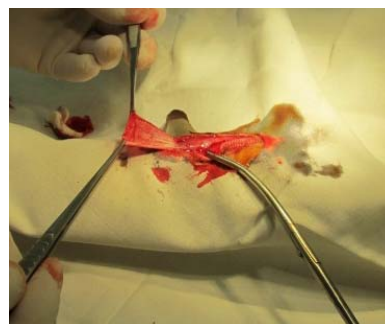


Рисунок 1 — Забор фасциального лоскута с передней конечности

Полученные фасциальные образцы отмывали в PBS+ гепарин 20 ЕД/мл и хранили при -80 °C (24 ч) до проведения эксперимента. Дальнейшие манипуляции с фасциальными лоскутами осуществлялись в стерильных условиях. После разморозки при комнатной температуре образцы переносили в гипотонический буфер (Tris-HCl (10 mM, pH 8.0), 0,1 % ЭДТА (pH 8.0), 10 КIU/мл апротинин (Гордокс), 100 Ед/мл пе-

нициллин, 100 мг/мл стрептомицин, 0,25 мкг/мл амфотерицин В, гепарин 20 ЕД/мл) и инкубировали в темноте при $+4$ °C 24 ч.

Далее образцы переносили в индивидуальные полипропиленовые пробирки, содержащие гипотонический буфер с детергентом (Tris-HCl (10 mM, pH 8.0), 0,1 % ЭДТА (pH 8.0), 10 КIU/мл апротинин (Гордокс), 100 Ед/мл пенициллин, 100 мг/мл стрептомицин, 0,25 мкг/мл

амфотерицин В, 2 % Тритон X-100 (Roth)) и инкубировали в темноте при +4 °С в течение 2 суток при постоянном перемешивании. Заменяли буфер каждые 24 ч. В дальнейшем проводили обработку образцов свободного фасциального лоскута ДНКазой I (0,2 мг/мл) 3 ч при +37 °С. Затем отмывали в течение 2 суток (ежедневная замена раствора) в деионизированной во-

де. На заключительном этапе образцы обработанного свободного фасциального лоскута помещали в PBS со 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 0,25 мкг/мл амфотерицина В, гепарина 20 ЕД/мл. Транспортировка образцов осуществлялась в холодильнике, при температуре +4 °С. Цикл децеллюляризации составлял 8 суток.



Рисунок 2 — Полученные образцы свободного фасциального лоскута в условиях клеточной лаборатории на этапах децеллюляризации:
а) первые сутки после забора фасциального лоскута;
б) восьмые сутки после проведенной децеллюляризации

Для имплантации в бедренные артерии полученного децеллюляризованного аутофасциального лоскута экспериментальные животные фиксировались на операционном столе в положении «на спине». Затем операционные поля на внутренних поверхностях бедер выбривались и обрабатывались 5 % спиртовым раствором йода. После вы-

деления бедренной артерии проводилось внутривенное введение гепарина (50 ЕД/кг). Экспериментальный образец фасции имплантировался в артериальное русло в виде заплаты при пластике бедренной артерии. Затем - запуск магистрального кровотока, обеспечение гемостаза, послойный шов раны. Время ишемии конечности — 40 ± 12 мин.

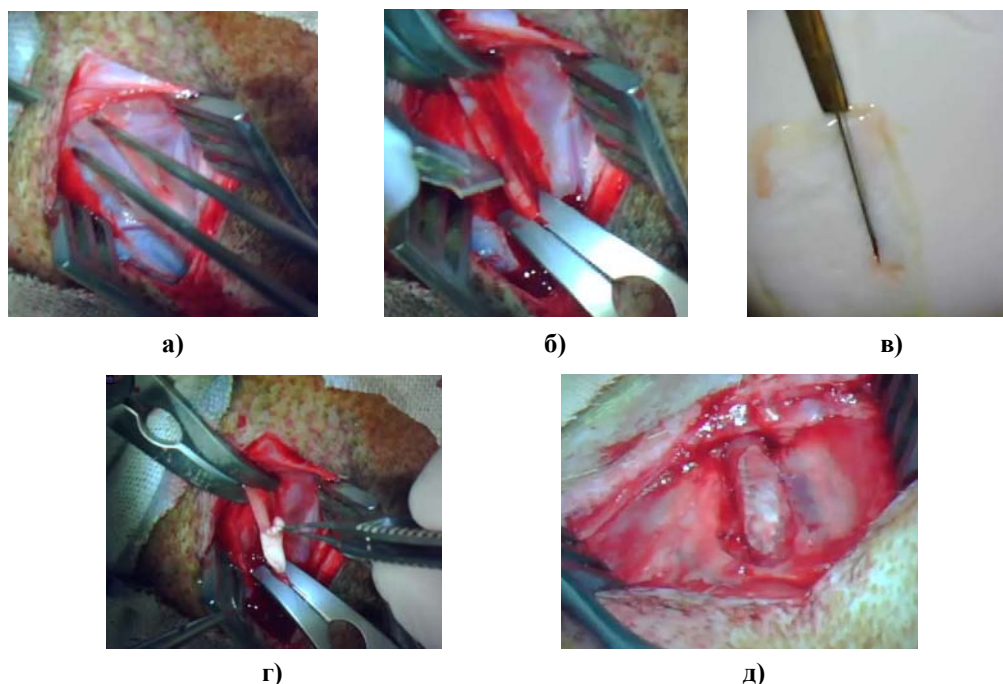


Рисунок 3 — Этапы бедренной ангиопластики заплатой из децеллюляризованного аутологичного фасциального лоскута (увеличение × 3,5):
а) выделение бедренной артерии; б) продольная артериотомия; в) формирование фасциальной заплаты;
г) ангиопластика бедренной артерии децеллюляризованной аутофасциальной заплатой;
д) состояние бедренной артерии поле ангиопластики

В послеоперационном периоде для профилактики гнойно-септических осложнений животным вводили ципрофлоксацин 20 мг/кг/сут и кеторолак 1 мг/кг/сут в течение 5 дней.

Полученный экспериментальный материал фиксировали в 10 % растворе забуференного формалина в течение 24–36 ч. Затем производилась гистологическая вырезка патологоанатомических препаратов, которые помещались в гистологические кассеты. Проводка полученного материала производилась на тканевом процессоре Microm STP-120 (Thermo Scientific, Германия). Проведенный материал заливали в парафиновые блоки. На ротормном микротоме Microm HM 304 E (Thermo Scientific, Германия) изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм, которые затем монтировались на предметные несиланизированные стекла (Минимед, РФ). В дальнейшем проводилась окраска гематоксилином и эозином по стандартной методике. Полученные гистологические препараты заключали под покровные стекла с использованием монтирующей среды Biomount (Bio optica, Испания).

Результаты и обсуждение

В послеоперационном периоде гнойно-септических осложнений, а также летальности не было. Достоверных изменений в общем анализе крови в период эксперимента не выявлено.

С целью морфологического контроля методики децеллюляризации на всех этапах проводился забор участка фасциального лоскута.

После первых суток децеллюляризации фасциальный лоскут представлен двумя слоями плотной регулярно соединительнотканной ткани с хорошо определяемыми ядрами в симпластах клеток. Пучки коллагеновых волокон плотно прилегают друг к другу и располагаются в направлении растяжения. Аморфного вещества мало, и присутствуют только фибробласты, перемешанные с эластическими волокнами. Волокна в слоях располагаются перпендикулярно друг другу. Данные слои покрыты рыхлой соединительнотканью с идущими в них кровеносными сосудами и нервными терминалями. В просвете единичных сосудов определялось полнокровие и сладж-феномен. По краям лоскута определялись участки компрессии с очагами кровоизлияний.

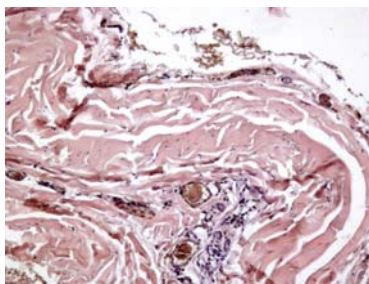


Рисунок 4 — Участок фасциального лоскута после первых суток этапа децеллюляризации (Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$)

На вторые сутки децеллюляризации в фасциальном лоскуте определялись сосуды и рыхлая соединительная ткань без ядер, цитоплазма клеток данных тканей была гомогенной эозино-

фильной, выявлялись очаги мукоидного и фибриноидного набухания слоя плотных регулярных соединительнотканых волокон. При этом в данном слое ядра в клетках сохранялись.

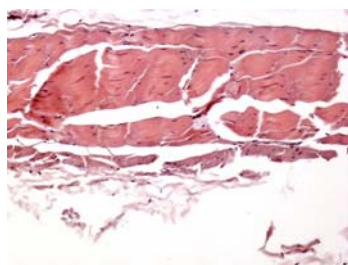


Рисунок 5 — Участок фасциального лоскута после двух суток этапа децеллюляризации (Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$)

Начиная с третьих суток и до конца цикла децеллюляризации изменений в структуре образцов не наблюдалось, фасциальный лоскут был представлен гиалинизированными соединительнотканными волокнами. Стенки гиалинизированных мел-

ких артерий и артериол утолщены за счет накопления в них гомогенных эозинофильных масс, просвет их значительно сужен или полностью закрыт. Соединительнотканые волокна содержат эозинофильные массы, ядра во всех волокнах отсутствуют.

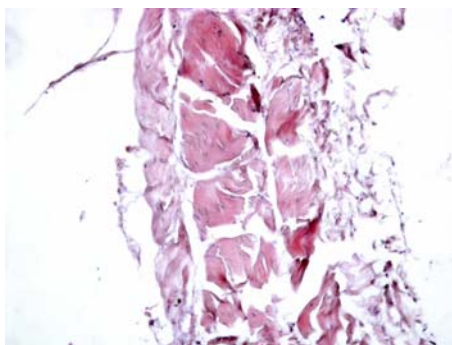


Рисунок 6 — Участок фасциального лоскута на восьмые сутки этапа децеллюляризации (Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$)

Для морфологической оценки имплантированных экспериментальных децеллюляризованных аутофасциальных лоскутов были выбраны участки бедренных артерий в местах ангиопластики через 6 месяцев после операции.

Через 6 месяцев стенка артерии в месте имплантации незначительно утолщена за счет гипертрофии интимы. Аутотрансплантат децеллюляризованной фасции по периферии представлен фрагментом гиалинизированной соединительной ткани с очагами бесклеточных некр-

розов. На данном фрагменте трансплантированной фасции располагается широкий слой эластических соединительнотканых волокон, которые формируют часть стенки сосуда и врастают по краям наложения имплантации во внутреннюю эластическую мембрану и мышечные волокна интимы бедренной артерии. Между фасциальным лоскутом и слоем эластических соединительнотканых волокон определяются *vasa vasorum*. Со стороны просвета слой эластических волокон покрыт эндотелием.

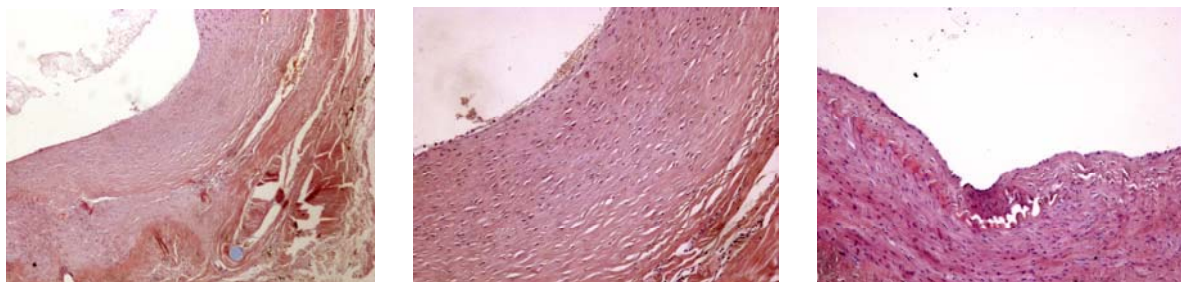


Рисунок 7 — Участок аутологичного децеллюляризованного фасциального лоскута через 6 месяцев после имплантации в бедренную артерию (Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение: А $\times 100$; В, С $\times 200$)

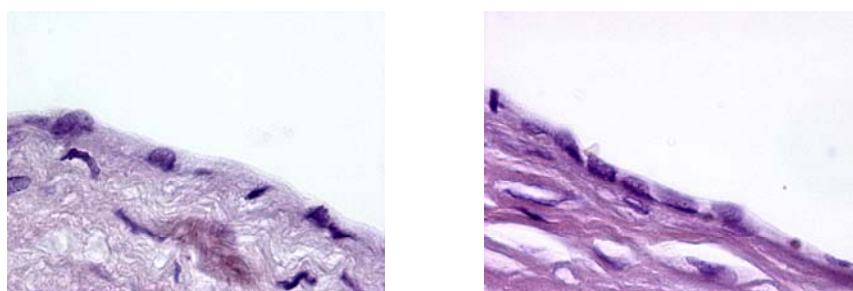


Рисунок 8 — Монослой эндотелия, выстилающий внутреннюю поверхность имплантированного децеллюляризованного аутофасциального лоскута при ангиопластике через 6 месяцев (Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение $\times 1000$)

Заключение

В ходе эксперимента при промежуточном сроке наблюдения через 6 месяцев после имплантации экспериментального образца просвет сосуда проходим, внутренняя стенка выстлана эндотелием, а также отсутствуют признаки перифокального вос-

паления по линии швов, что свидетельствует о его приживлении. Данные результаты позволяют сделать предварительный вывод о возможности использования децеллюляризованного фасциального лоскута в качестве пластического материала при реконструктивных операциях на артериях.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Покровский, А. В. Экстренная хирургия сосудов / А. В. Покровский, Ю. Д. Москаленко, Ю. Л. Грозовский. — М., 1975.
2. Leng, L. Mosaic Hydrogels: One-Step Formation of Multiscale Soft Materials / L. Leng // *Adv. Mater.* — 2012. — Vol. 24. — P. 3650–3658.
3. Decellularized musculofascial extracellular matrix for tissue engineering / A. Joshua [et al.] // *Biomaterials.* — 2013. — № 34(11). — P. 2641–2654.
4. Tissue-Engineered Lungs for in Vivo Implantation / T. H. Peterson [et al.] // *Science* — Vol. 329(5991). — P. 538–541.
5. Flynn, L. E. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose derived stem cells / L. E. Flynn // *Biomaterials.* — 2010.

Поступила 09.11.2015

УДК 612.36:612.336.3:613.26

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ В РАЦИОН ПИТАНИЯ ЦИТРУСОВОГО ПЕКТИНА

Е. В. Марцинкевич¹, С. Б. Кондрашова¹, В. А. Седякова², Т. М. Лукашенко¹¹Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск²Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

Цель: изучить функциональное состояние толстого кишечника крыс при введении в пищевой рацион цитрусового пектина.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на самцах белых крыс (n = 45) в соответствии с правилами гуманного отношения к лабораторным животным. В исследовании использовали рекомендуемую дозу пищевых волокон, утвержденную Комитетом по гигиене РФ (2002 г.), исходя из физиологической нормы их потребления, которая составляла 1,25 г/животное/сутки, и дозу, увеличенную на 50 % — 1,875 г/животное/сутки. Микробиологические и биохимические исследования проводились по общепринятым методикам.

Результаты. Установлено, что длительное (в течение 1 месяца) употребление цитрусового пектина в дозе 1,25 г/животное/сутки не сопровождается изменением титра положительной микрофлоры, однако вызывает появление бактерий *p. Citrobacter*. Введение в рацион повышенного содержания добавки (1,875 г/животное/сутки) приводит к снижению удельной концентрации пробиотических микроорганизмов (лакто- и бифидобактерий), росту пула энтеробактерий и потенциально-патогенных грибов. В материале верифицируются бактерии *p. Citrobacter* и грибы *p. Candida*.

При применении обеих доз цитрусового пектина зафиксировано возрастание концентрации уксусной и масляной кислот, отмечена кислая реакция содержимого кишечника, о чем свидетельствует снижение значений pH фекалий животных.

Заключение. Экспериментальные данные позволяют констатировать, что при нормальном физиологическом состоянии регулярное длительное потребление цитрусового пектина в допустимой дозе (1,25 г/животное/сутки) не вызывает изменений пробиотической микрофлоры кишечника, но создает предпосылки для усиления колонизации условно-патогенными представителями. Превышение дозы исследуемой добавки приводит к значительному снижению значений pH содержимого кишечника и к усиленной пролиферации потенциально-патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: пищевые волокна, цитрусовый пектин, толстый кишечник, короткоцепочечные жирные кислоты.

THE EFFECT OF CITRUS PECTIN ON THE FUNCTIONAL STATUS OF RATS' COLON

E. V. Martsynkevich¹, S. B. Kondrasheva¹, V.A. Sedakova², T. M. Lukashenko¹¹Institute of Physiology of NAS of Belarus, Minsk²Mogilev State University named after A. A. Kuleshov

Objective: to study the effect of citrus pectin on the functional status of rats' colon.

Material and methods. The experiments have been performed on male rats (n = 45) in accordance with the rules of the humane treatment of experimental animals. The doses of dietary fiber have been calculated by the physiological norm of human consumption, approved by the Committee on Health of the Russian Federation (2002) and accounted for 1.25 and 1.875 g/animal/day. Microbiological and biochemical studies have been carried out according to the conventional techniques.

Results. It has been ascertained that long-term use (for 1 month) of citrus pectin at a dose of 1.25 g/animal/day leads to changes of the titer the positive microflora, but causes emergence of *Citrobacter*. The increase of pectin to 1.875 g/animal/day leads to a decrease in the concentration of specific probiotic microorganisms (*Lactobacillus* ssp. and *Bifidobacterium* ssp.), an increase in the pool of Enterobacteriaceae and potentially pathogenic Fungi. The material verified *Citrobacter* and *Candida*, which were not found in control animals.

Applying both the doses of citrus pectin we noted an increase in the concentrations of acetic and butyric acids, acidification of the intestinal contents, as evidenced by the decrease in the pH of the animals' faeces.

Conclusion. The experimental data make it possible to state that regular long-term consumption of citrus pectin at the permissible dose (1.25 g/animal/day) in the normal physiological state does not cause any changes in the probiotic intestinal flora but creates preconditions for enhancing colonization by opportunistic agents. The excess dose of the studied additive results in a significant decrease of pH values of the intestinal contents and enhanced proliferation of potentially pathogenic microorganisms.

Key words: dietary fibers, citrus pectin, colon, short chain fatty acids.