



¹Г. А. ПОПЕЛЬ, ¹И. А. МОИСЕЕНКО, ¹Р. Р. ЖМАЙЛИК, ²И. П. ЖАВОРОНОК

ВЛИЯНИЕ ИМПЛАНТАЦИИ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ХАРАКТЕР ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У КРЫС

¹РНПЦ «Кардиология», Минск, Беларусь

²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Цель исследования. Изучить изменение гематологических показателей крови и характер воспалительного ответа на имплантацию биологического и синтетического сосудистых протезов.

Материал и методы. Исследование проведено на самцах лабораторных крыс линии Wistar ($n = 75$). Животные были распределены на 3 группы: 1-я группа — ложнооперированные (25 особей), 2-я группа — с имплантацией фрагмента биологического сосудистого протеза, изготовленного из бычьего ксеноперикарда (25 особей), 3-я группа — с имплантацией фрагмента синтетического сосудистого протеза из дакрона (25 особей). Забор образцов крови проводили на 3, 7, 14, 21 и 30-е сутки после операции. В крови определяли общее число лейкоцитов, относительное количество нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов, количество эритроцитов, тромбоцитов, концентрацию гемоглобина и С-реактивного белка.

Результаты. В послеоперационном периоде на 3-и сутки выявлена статистически значимая разница в количестве лейкоцитов между 1-й и 2-й ($p = 0,042$), 2-й и 3-й группами животных ($p = 0,024$). На 7-е сутки исследования статистически и клинически значимых различий в исследуемых показателях крови между группами животных не обнаружили. На 14-е сутки между 2-й и 3-й группами животных были выявлены статистически значимые различия в показателях концентрации гемоглобина ($p = 0,023$) и количества эритроцитов ($p = 0,043$). На 21-е и 30-е сутки статистически и клинически значимых различий между группами животных не зарегистрировано.

Заключение. Изменений, выходящих за границы референтного диапазона в количестве эритроцитов и тромбоцитов, концентрации гемоглобина, количестве лейкоцитов, а также лейкоцитарной формулы и концентрации С-реактивного белка как маркеров воспалительного ответа на имплантацию фрагментов синтетического и биологического сосудистых протезов по отношению к контрольной группе животных не зарегистрировано.

Ключевые слова: биологический сосудистый протез, синтетический сосудистый протез, крыса, аорта, ксеноперикард, воспаление, гематотоксичность.

Objective. To investigate changes in hematologic parameters and inflammatory response after implantation of biological and synthetic vascular grafts.

Materials and methods. The study was performed on male Wistar laboratory rats ($n = 75$). The animals were divided into three groups: group 1 — false-operated (25 animals); group 2 — implantation of fragment of biological vascular graft (25 animals); group 3 — implantation of fragment of synthetic vascular graft (25 animals). Blood was collected from the animals on days 3, 7, 14, 21 and 30 after surgery. The numbers of white blood cells, neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils, red blood cells, platelet count, hemoglobin concentration and C-reactive protein were measured in the blood.

Results. On the 3rd day after operation, statistically significant differences were found in white blood cell counts between groups 1 and 2 ($p = 0,042$) and between groups 2 and 3 ($p = 0,024$). On the 7th day after operation, there were no statistically or clinically significant differences between the animal groups. On the 14th day statistically significant differences were found between groups 2 and 3 in hemoglobin concentration ($p = 0,023$) and red blood cells count ($p = 0,043$); on the 21st and 30th days, no statistically or clinically significant differences were found between the animal groups.

Conclusion. There were no clinically significant changes in red blood cells count, platelet count, hemoglobin concentration, white blood cells count or C-reactive protein concentration compared to animals in the control group.

Key words: biological vascular graft, synthetic vascular graft, rat, aorta, xenopericardium, inflammation, hematotoxicity.

HEALTHCARE. 2024; 3: 46—51.

HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND THE NATURE OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN THE BODY OF RATS AFTER IMPLANTATION OF VASCULAR GRAFTS

H. A. Popel, I. A. Maiseyenko, R. R. Zhmailik, I. P. Zhavarana

По мнению некоторых исследователей и аналитиков, к 2030 г. прогнозируется заметный рост как числа пациентов с заболеваниями аорты и периферических артерий, так и количества реконструктивно-восстановительных хирургических вмешательств, что в свою очередь приведет к возрастанию потребности в качественных и доступных сосудистых протезах [1].

Определение изменений гематологических показателей крови, оценка характера воспалительной реакции, возникающей в ответ на применение разработанных образцов сосудистых протезов, являются чрезвычайно важными моментами на доклиническом и клиническом этапах экспериментального исследования [2, 3].

Цель исследования — изучить изменение гематологических показателей крови и характер воспалительного ответа на имплантацию биологического и синтетического сосудистых протезов.

Материал и методы

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ГНУ «Институт физиологии НАН Беларусь» (протокол № 20 от 12.11.2020 г. и протокол № 1 от 22.01.2021 г.). Программа и методика исследования разработаны в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

Расчет необходимого размера выборки выполнен с помощью программы G*Power (версия 3.1.9.7) с учетом следующих параметров: 3 группы исследования, однофакторный дисперсионный анализ, величина ошибки I рода 5 %, величина ошибки II рода 15 %, размер эффекта $\eta^2 = 0,14$ [4]; Cohen's $f = 0,4$. В результате минимально требуемый размер выборки составил 72 особи.

Исследование проводили на базе вивария ГНУ «Институт физиологии НАН Беларусь» на самцах лабораторных крыс линии *Wistar* ($n = 75$). Крысы были разделены на 3 группы (рис. 1):

— 1-я группа ($n = 25$) — ложнооперированные (ЛО) животные (контроль);

— 2-я группа ($n = 25$) — животные с имплантацией фрагмента биологического сосудистого протеза (БП), изготовленного из бычьего ксенонеприкарда;

— 3-я группа ($n = 25$) — животные с имплантацией фрагмента синтетического сосудистого протеза (СП), импрегнированного модифицированным желатином — Gelsoft Vascutek Terumo (Terumo Corporation, Токио, Япония).

После удаления шерстного покрова в области операционного поля животных укладывали на термостабилизированный столик. После обработки операционного поля 5%-ым спиртовым раствором йода выполняли срединную лапаротомию. По задней стенке живота справа

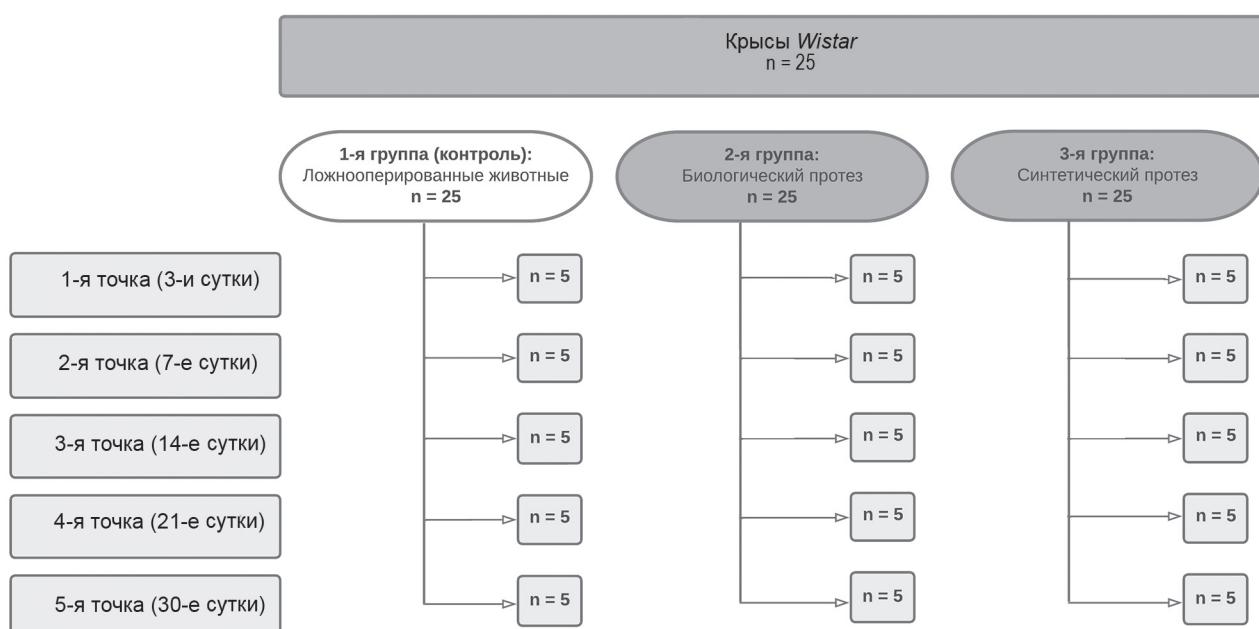


Рис. 1. Схема исследования

формировали карман, в который помещали фрагмент исследуемого сосудистого протеза площадью 1 см². Карман и лапаротомную рану ушивали. У крыс из 1-й группы также формировали карман. На протяжении 3 сут после операции животным вводили подкожно энрофлоксацин в дозе 12,5 мг/кг/сут.

Забор образцов крови осуществляли на 3, 7, 14, 21 и 30-е сутки после операции из латеральной вены хвоста. Общий анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе NihonMEK 6450K (Nihon Kohden Corporation, Япония). Определяли общее число лейкоцитов, относительное количество нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов. Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) в плазме крови определяли на биохимическом анализаторе Mindray BS-200 (Mindray Medical International Limited, Китай).

Контрольные значения концентрации С-реактивного белка были определены у интактных крыс, не участвовавших в экспериментальном исследовании. Референтный интервал рассчитывали в соответствии с Государственным стандартом (ГОСТ) Р 53022.3-2008 и рекомендациями Международной федерации клинической химии [5, 6]. Пределы референтного интервала представлены вместе с точностью интервальной оценки [±Д] для 90 %-го доверительного интервала (табл. 1).

Полученные в ходе исследования данные представлены в виде медианы (Ме), верхнего и нижнего квартилей [Q₁—Q₃]. Для сравнения медиан исследуемых групп использовали односторонний дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса. Для уточнения характера различий проводили post-hoc-анализ с помощью теста Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. α -уровень ста-

Таблица 1

Референтные интервалы исследуемых параметров [7]

Показатель	Границы референтного интервала
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,3—14,3
Гемоглобин, г/л	134—160
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,73—8,73
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	788—1241
Нейтрофилы, %	6—20
Лимфоциты, %	70—90
Эозинофилы, %	0—2
Моноциты, %	1—7
СРБ, мг/л	1,13 [±0,51] — 1,89 [±0,51]

тистической значимости равен 5 %. Статистический анализ выполняли с применением языка программирования R (версия 4.2.1 для ОС Windows).

Результаты и обсуждение

Значение ошибки II рода составило 14,65 %, Cohen's $f = 0,392$. На 3-и сутки выявлена статистически значимая разница в количестве лейкоцитов между 1-й и 2-й ($p = 0,042$), 2-й и 3-й группами животных ($p = 0,024$). Также статистически значимыми были различия между группой ЛО и группой БП в концентрации гемоглобина ($p = 0,043$) и количестве эритроцитов ($p = 0,024$). На 7-е сутки исследования статистически и клинически значимых различий в исследуемых показателях крови между группами животных не обнаружили. На 14-е сутки между 2-й и 3-й группами животных были обнаружены статистически значимые различия в показателях концентрации гемоглобина (2-я группа — 144 [143—144] г/л, 3-я группа — 123 [123—130] г/л, $p = 0,023$) и количестве эритроцитов (во 2-й группе — 8,05 [7,98—8,12] 10¹²/л, в 3-й группе — 6,18 [4,67—7,35] 10¹²/л, $p = 0,043$) (табл. 2).

На 21-е и 30-е сутки статистически и клинически значимых различий между группами животных не зарегистрировано. Результаты анализа крови крыс на 21-е и 30-е сутки после операции представлены в табл. 3.

На протяжении всего периода экспериментального исследования статистически значимых различий в динамике количества лейкоцитов и концентрации С-реактивного белка не получено. Динамика общего количества лейкоцитов, лейкоцитарной формулы и концентрации С-реактивного белка в ходе проведенного эксперимента представлена на рис. 2 и 3.

Одной из причин различий в характере и интенсивности воспалительной реакции после имплантации синтетических сосудистых протезов, по мнению многих исследователей, является иммунный ответ организма на материал сосудистого протеза и компоненты, входящие в состав его покрытия [8].

Вместе с тем ряд авторов считают, что в течение раннего послеоперационного периода при имплантации синтетического сосудистого протеза наблюдается заметное увеличение общего количества лейкоцитов

Таблица 2

Результаты анализа крови крыс на 3, 7 и 14-е сутки эксперимента

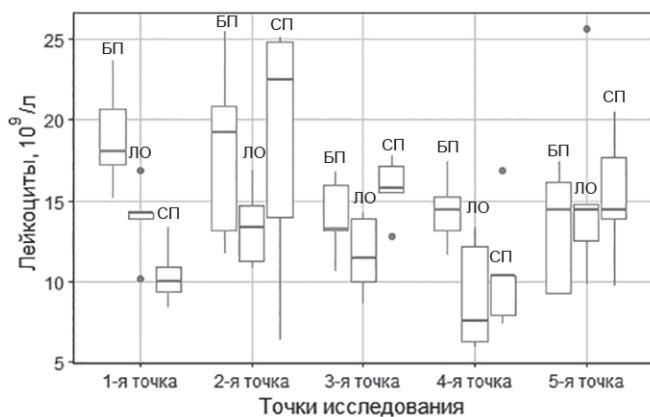
Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа	Ра*	Pb	Pc
1-я точка исследования (3-и сутки)						
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	14,2 [13,9—14,2]	18,0 [17,2—20,7]	10,0 [9,3—10,9]	0,042	0,071	0,024
Гемоглобин, г/л	129 [114—130]	150 [140—152]	139 [133—142]	0,043	0,178	0,364
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	6,7 [6,2—7,2]	7,7 [7,6—7,9]	7,2 [6,8—7,5]	0,024	0,260	0,307
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	700 [658—821]	736 [669—766]	672 [670—851]	0,994	0,947	0,860
СРБ, мг/л	0,45 [0,42—1,24]	0,47 [0,39—2,27]	1,74 [0,55—1,76]	0,994	0,860	0,994
2-я точка исследования (7-е сутки)						
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	13,3 [11,2—14,7]	19,2 [13,1—20,9]	22,5 [14,0—24,9]	0,364	0,484	0,947
Гемоглобин, г/л	134 [133—135]	126 [125—136]	148 [146—150]	0,805	0,055	0,260
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	7,5 [7,1—7,6]	7,1 [6,7—7,8]	7,9 [7,7—8,2]	0,860	0,178	0,260
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	909 [875—910]	884 [811—1000]	1169 [1019—1259]	0,994	0,072	0,116
СРБ, мг/л	1,22 [0,00—5,47]	1,81 [0,83—5,42]	4,37 [0,85—5,52]	0,946	0,740	0,976
3-я точка исследования (14-е сутки)						
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	11,4 [10—13,9]	13,2 [13,1—16]	15,8 [15,5—17,1]	0,484	0,072	0,615
Гемоглобин, г/л	125 [122—127]	144 [143—144]	123 [123—130]	0,024	0,994	0,023
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	6,57 [6,15—6,87]	8,05 [7,98—8,12]	6,18 [4,67—7,35]	0,024	0,947	0,043
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	666 [560—690]	922 [728—945]	685 [663—693]	0,364	0,994	0,260
СРБ, мг/л	4,89 [4,88—5,04]	2,32 [2,20—5,19]	4,82 [4,54—4,89]	0,745	0,420	0,860

Здесь и в табл. 3. *Ра — сравнение 1-й и 2-й групп; Pb — сравнение 1-й и 3-й групп; Pc — сравнение 2-й и 3-й групп.

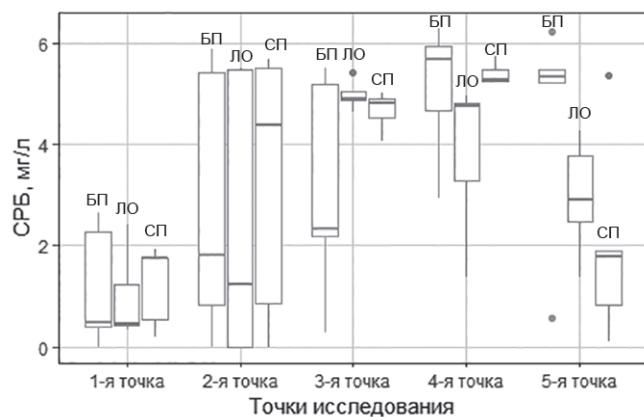
Таблица 3

Результаты анализа крови крыс на 21-е и 30-е сутки эксперимента

Показатель	1-я группа	2-я группа	3-я группа	Ра*	Pb	Pc
4-я точка исследования (21-е сутки)						
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	7,5 [6,2—12,1]	14,4 [13,1—15,2]	10,3 [7,9—10,3]	0,116	0,744	0,176
Гемоглобин, г/л	146 [145—153]	149 [149—151]	151 [145—152]	0,678	0,976	1,000
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	7,87 [7,74—8,39]	7,98 [7,85—8,06]	8,36 [7,82—8,69]	0,994	0,860	0,745
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	698 [658—730]	710 [698—816]	806 [778—861]	0,805	0,364	0,860
СРБ, мг/л	4,76 [3,30—4,81]	5,68 [4,68—5,95]	5,27 [5,24—5,49]	0,484	0,024	0,947
5-я точка исследования (30-е сутки)						
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	14,4 [12,5—14,8]	14,4 [9,2—16,1]	14,4 [13,9—17,7]	0,907	1,000	0,678
Гемоглобин, г/л	151 [149—152]	150 [149—153]	147 [145—148]	0,947	0,420	0,260
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	7,9 [7,9—7,95]	8,23 [8,12—8,53]	8,15 [7,82—8,67]	0,115	0,744	0,994
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	916 [858—965]	764 [707—982]	848 [721—978]	0,745	0,947	0,994
СРБ, мг/л	2,92 [2,48—3,77]	5,35 [5,21—5,49]	1,79 [0,82—1,89]	0,260	0,484	0,364



а



б

Рис. 2. Динамика значений общего количества лейкоцитов (а) и концентрации С-реактивного белка (б) в крови крыс: БП — биологический протез; ЛО — ложнооперированные; СП — синтетический протез

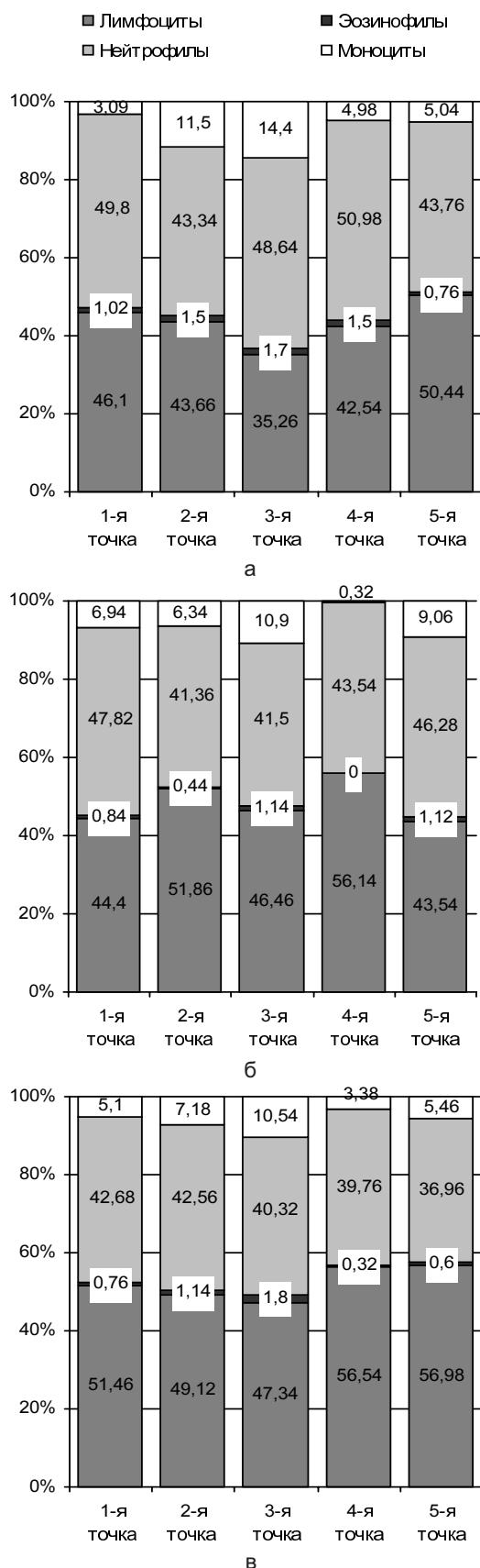


Рис. 3. Динамика изменений в лейкоцитарной формуле у ложнооперированных животных (а), животных с имплантированными фрагментами синтетического (б) и биологического (в) сосудистых протезов

и концентрации С-реактивного белка. Аналогичные изменения наблюдались и в нашем исследовании. Вероятно, этот факт обусловлен высокой скоростью биодеградации желатинового покрытия. Общеизвестно, что желатиновое покрытие сосудистого протеза в организме человека разрушается в течение первых двух недель. Морфологически подтверждено, что у крыс биодеградация значительной части желатина происходит быстрее. Уже к 5-м суткам после имплантации сосудистого протеза толщина слоя покрытия уменьшается на 85—90 %, а к 7-м суткам исчезает полностью [9]. В проведенных ранее исследованиях, где применяли дакроновые сосудистые протезы с покрытием и без покрытия, было установлено, что с полным исчезновением желатина интенсивность воспалительной реакции постепенно снижается и становится сопоставимой с группой животных, которым имплантировали протез без покрытия [10].

Следует также отметить, что, по мнению некоторых исследователей и на взгляд авторов настоящего исследования, изолированное отклонение определенных исследуемых показателей воспалительного ответа от референтного интервала значений обусловлено также индивидуальной реакцией организма животных на операционную травму [11].

Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о том, что выраженной воспалительной реакции в организме животных с имплантированным фрагментом биологического сосудистого протеза из бычьего ксеноперикарда не наблюдается, сдвиги значений маркеров воспаления носят временный характер и схожи с таковыми у животных с имплантированным фрагментом синтетического протеза из дакрона, покрытого модифицированным желатином.

Контактная информация:

Попель Геннадий Адольфович — к. м. н., доцент, зав. лабораторией хирургии сосудов.
Республиканский научно-практический центр «Кардиология». Ул. Р. Люксембург, 110 Б, 220036, г. Минск.
Сл. тел.: +375 17 201-28-08.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: Г. А. П.
Сбор информации и обработка материала: Г. А. П., И. А. М., Р. Р. Ж., И. П. Ж.
Написание текста: Г. А. П., И. А. М.
Редактирование: Г. А. П., И. А. М.
Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990—2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet.* 2020; 396 (10258): 1204—22.
2. Latorre M., Szafron J. M., Ramachandra A. B. et al. *In vivo development of tissue engineered vascular grafts: a fluid-solid-growth model.* *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2022; 21 (3): 827—48.
3. Zhang Q., Duncan S., Szulc D. A. et al. *Development of a universal, oriented antibody immobilization method to functionalize vascular prostheses for enhanced endothelialization for potential clinical application.* *J. Biol. Eng.* 2023; 17 (1): 37.
4. Faul F., Erdfelder E., Buchner A. et al. *Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses.* *Behav. Res. Methods.* 2009; 41 (4): 1149—60.
5. ГОСТ Р 53022.3-2008: Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований: Ч. 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. М.: Стандартинформ, 2009. 22 с.
6. Ozarda Y., Sikaris K., Streichert T., Macri J. *Distinguishing reference intervals and clinical decision limits — A review by the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits.* *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2018; 55 (6): 420—31.
7. Wolford S. T., Schroer R. A., Gohs F. X. et al. *Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals.* *J. Toxicol. Environ. Health.* 1986; 18 (2): 161—88.
8. Kohler R., Pohl C., Walschus U. et al. *Association of systemic antibody response against polyethylene terephthalate with inflammatory serum cytokine profile following implantation of differently coated vascular prostheses in a rat animal model.* *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2022; 110(1): 52—63.
9. Drury J. K., Ashton T. R., Cunningham J. D. et al. *Experimental and clinical experience with a gelatin impregnated Dacron prosthesis.* *Ann. Vasc. Surg.* 1987; 1 (5): 542—7.
10. Chiba Y., Muraoka R., Ihaya A. et al. *Postoperative inflammatory reactions of impregnated Dacron grafts.* *Surg. Today.* 1999; 29 (11): 1225—8.
11. Wang Z., Wang S., Marois Y. et al. *Evaluation of biodegradable synthetic scaffold coated on arterial prostheses implanted in rat subcutaneous tissue.* *Biomaterials.* 2005; 26 (35): 7387—401.

REFERENCES

1. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990—2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet.* 2020; 396 (10258): 1204—22.
2. Latorre M., Szafron J. M., Ramachandra A. B. et al. *In vivo development of tissue engineered vascular grafts: a fluid-solid-growth model.* *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2022; 21 (3): 827—48.
3. Zhang Q., Duncan S., Szulc D. A. et al. *Development of a universal, oriented antibody immobilization method to functionalize vascular prostheses for enhanced endothelialization for potential clinical application.* *J. Biol. Eng.* 2023; 17 (1): 37.
4. Faul F., Erdfelder E., Buchner A. et al. *Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses.* *Behav. Res. Methods.* 2009; 41 (4): 1149—60.
5. State Standard 53022.3-2008: *Laboratory clinical technologies. Requirements for the quality of clinical laboratory research: Part. 3. Rules for assessing the clinical informativeness of laboratory tests.* Moscow: Standartinform Publ.; 2013. (in Russian).
6. Ozarda Y., Sikaris K., Streichert T., Macri J. *Distinguishing reference intervals and clinical decision limits — A review by the IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits.* *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2018; 55 (6): 420—31.
7. Wolford S. T., Schroer R. A., Gohs F. X. et al. *Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals.* *J. Toxicol. Environ. Health.* 1986; 18 (2): 161—88.
8. Kohler R., Pohl C., Walschus U. et al. *Association of systemic antibody response against polyethylene terephthalate with inflammatory serum cytokine profile following implantation of differently coated vascular prostheses in a rat animal model.* *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2022; 110(1): 52—63.
9. Drury J. K., Ashton T. R., Cunningham J. D. et al. *Experimental and clinical experience with a gelatin impregnated Dacron prosthesis.* *Ann. Vasc. Surg.* 1987; 1 (5): 542—7.
10. Chiba Y., Muraoka R., Ihaya A. et al. *Postoperative inflammatory reactions of impregnated Dacron grafts.* *Surg. Today.* 1999; 29 (11): 1225—8.
11. Wang Z., Wang S., Marois Y. et al. *Evaluation of biodegradable synthetic scaffold coated on arterial prostheses implanted in rat subcutaneous tissue.* *Biomaterials.* 2005; 26 (35): 7387—401.

Поступила 05.10.2023.

Принята к печати 22.12.2023.