

СРАВНЕНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ВЕНОЗНОЙ СТЕНКИ ПРИ МЕХАНО-ХИМИЧЕСКОЙ И ЦИАНОАКРИЛАТНОЙ ОБЛИТЕРАЦИИ ВЕН В ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Агаларов Р.М.*^{1,2}, Мазайшвили К.В.^{1,2}, Маркин С.М.^{1,3},
Киреев Р.Р.¹, Юхневич К.С.¹

¹ БУ ВО «Сургутский государственный университет», Сургут

² Флебологический центр «Антирефлюкс», Сургут

³ ФГБУЗ Санкт-Петербургская клиническая больница РАН,
Санкт-Петербург.

DOI: 10.25881/BPNMSC.2020.15.94.006

Резюме. Нетермальные нетумесцентные методы лечения варикозной болезни позиционируются как альтернатива эндовенозной лазерной облитерации. При этом отсутствует полное понимание процессов, происходящих в стенке вены в разные сроки после ее облитерации. Также нет данных о прямом сравнении механо-химической и цианоакрилатной облитерации вен. Цель: изучить морфологию изменений в венозной стенке, вызванных механо-химической и цианоакрилатной облитерацией. Материалы и методы: на подкожных венах 15 овец выполнены механо-химическая облитерация системой «Flebogrif» и цианоакрилатная облитерация системой «Venaseal». Через 5 часов из эксперимента выведено 3 животных, вены изучены гистологически и методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Результаты: выполнено 23 успешных вмешательства: 12 механо-химических облитераций и 11 цианоакрилатных облитераций. Во всех случаях общая структура вены сохранена, наблюдается мукоидное набухание и выраженная диффузная сегментоядерная инфильтрация ее стенки, эндотелий и мышечный слой повреждены частично. Значимых отличий между группами не выявлено. Денатурация коллагена венозной стенки при нетермальных нетумесцентных методах колеблется в широком диапазоне с медианой 72,5%. Статистических отличий между группами также не выявлено. Выводы: нетермальные нетумесцентные методы вызывают неполное, неравномерное повреждение венозной стенки и выраженную лейкоцитарную инфильтрацию медиа в раннем послеоперационном периоде.

Ключевые слова: механо-химическая облитерация, Flebogrif, цианоакрилатная облитерация, Venaseal.

Введение

Эндовенозная лазерная облитерация (ЭВЛО) является «золотым стандартом» в лечении варикозной болезни нижних конечностей в большинстве развитых стран [1; 2]. Но прогресс не стоит на месте, появились нетермальные нетумесцентные методы (НТНТ) устранения рефлюксов, позиционирующиеся как «подрывные» технологии. Их основными преимуществами называются отсутствие необходимости выполнения тумесцентной анестезии и ношения компрессионного трикотажа. На сегодняшний день уже нельзя не считаться с тем, что ЭВЛО появилась альтернатива в виде НТНТ. Однако, до сих пор недостаточно морфологических данных, объясняющих механизмы облитерации вены при НТНТ и описывающих процессы, происходящие в стенке вены при этом процессе. Мы не нашли работ, прямо сравнивающих

COMPARISON OF DAMAGE TO THE VENOUS WALL DURING MECHANOCHEMICAL AND CYANOACRYLATE OBLITERATION OF VEINS IN AN ACUTE ANIMAL EXPERIMENT

Агаларов Р.М.*^{1,2}, Mazajshvili K.V.^{1,2}, Markin S.M.^{1,3}, Kireev R.R.¹, YUhnovich K.S.¹

¹ Surgut State University, Surgut

² Vein Center «Antireflux», Surgut

³ Clinical Hospital RAS, Saint-Petersburg

Abstract. Non-thermal non-tumescent treatment of varicose veins are positioned as an alternative to endovenous laser obliteration. However, there is no complete understanding of the processes occurring in the wall of the vein at different times after its obliteration. There is also no data on a direct comparison of mechanochemical and cyanoacrylate venous obliteration. Purpose: to study the morphology of changes in the venous wall caused by mechanochemical and cyanoacrylate obliteration. Methods: mechanochemical obliteration with the Flebogrif system and cyanoacrylate obliteration with the Venaseal system were performed on the saphenous veins of 15 sheep. After 5 hours, 3 animals were removed from the experiment, veins were studied histologically and by differential scanning calorimetry. Results: 23 successful interventions were performed: 12 mechanochemical obliterations and 11 cyanoacrylate obliterations. In all cases, the general structure of the vein is preserved, mucoid swelling is observed and marked diffuse segmented infiltration of its wall, endothelium and muscle layer are partially damaged. Significant differences between the groups were not identified. Denaturation of the collagen of the venous wall with non-thermal non-tumescent methods varies in a wide range with a median of 72.5%. Statistical differences between the groups were also not revealed. Conclusions: non-thermal non-tumescent methods cause incomplete, uneven damage to the venous wall and marked leukocyte infiltration of the media in the early postoperative period.

Keywords: mechanochemical obliteration, Flebogrif, cyanoacrylate vein obliteration, Venaseal.

механо-химическую и цианоакрилатную облитерации вен в экспериментальных исследованиях. Для изучения данного вопроса было проведено экспериментальное исследование на животных.

Цель: провести сравнительное изучение морфологических изменений в венозной стенке, вызванных механо-химической и цианоакрилатной облитерацией.

Материалы и методы

Проведение экспериментального исследования одобрено комитетом по этике Сургутского государственного университета, протокол № 12 от 06.07.2018. Работа проведена на базе Филиала БУ ХМАО-Югры «Ветеринарный центр» в городе Сургуте. В качестве экспериментальной модели был выбран малый рогатый скот (овцы) по причине сопоставимости размеров магистральных подкожных

* e-mail: rmagalarov@mail.ru

ных вен у этих животных и человека. Объем выборки составил 15 голов. Средний возраст животных составлял $11 \pm 1,7$ месяцев. Средняя масса тела – $32 \pm 3,3$ кг. Средний диаметр подкожной вены, запланированной под облитерацию, колебался около $4 \pm 0,5$ мм. За сутки до проведения эксперимента животные были осмотрены ветеринарным врачом, взята кровь на общий анализ и бруцеллез. Все животные признаны соматически здоровыми. Каждому животному присвоен идентификационный номер методом биркования.

Каждому животному выполнено 2 варианта НТНТ: механо-химическая облитерация системой Flebogrif, цианоакрилатная облитерация системой Venaseal. Процедуры были проведены в строгом соответствии с инструкцией производителя. Рандомизация конечности под конкретную методику проводилась методом конвертов. Все процедуры проводились под общей анестезией, для этого использовалось внутримышечное введение ксилазина гидрохлорида. Расчет дозировки выполнялся по массе тела животного. В качестве премедикации за 30 минут до процедуры подкожно вводили атропина сульфат и метоклопрамид. Целевыми венами являлись подкожные вены предплечья и голени. Доступ к вене осуществлялся через разрез кожи длиной до 20 мм в дистальной области предплечья и голени.

Через 5 часов после вмешательства 3 животных были выведены из эксперимента. После этого участки вен, на которых выполнялись процедуры, были забраны для дальнейшего исследования. Каждый образец разделялся на 2 фрагмента: один помещался в буферизированный формалин для дальнейшего приготовления микротомных срезов и гистологического исследования, другой – лиофилизировался для проведения исследования степени денатурации коллагена венозной стенки методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Препараты для гистологического исследования окрашивались гематоксилином-эозином. Оценивались глубина повреждения венозной стенки и ранний воспалительный ответ. Исследование проводилось на базе патологоанатомического отделения государственной окружной клинической больницы (г. Сургут) при помощи световой микроскопии при увеличении $\times 100$.

Для оценки сохранности эндотелия вена делилась на 8 равных сегментов (Рис. 1А). Определяли наличие или отсутствие эндотелия в каждом сегменте. Далее изучалось, есть ли отличия в распространенности повреждения эндотелия при описанных четырех методах.

Для оценки глубины некроза окрашенных гистологических препаратов использовался поперечный срез вены. Окружность вены условно делилась на 4 равных сегмента, в каждом из которых определялась максимальная глубина некроза по направлению от интимы к адвентиции (Рис. 1Б). В зависимости от глубины, каждому сегменту присваивались баллы: 1 балл – некроз $< 25\%$ глубины вены, 2 балла – $25-50\%$, 3 балла – $50-75\%$, 4 балла – $> 75\%$. Достижение глубины некроза в 3 балла и более считалось

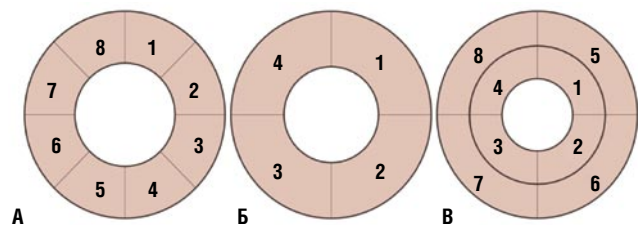


Рис. 1. Сегментирование поперечного среза вен для оценки: А – сохранности эндотелия; Б – глубины некроза ее стенки; В – лейкоцитарной инфильтрации.

надежным повреждением венозной стенки и являлось контрольной точкой для сравнения образцов.

Для оценки лейкоцитарной инфильтрации вена (медиа) условно делилась на 8 сегментов: четыре внутренних и четыре наружных (Рис. 1В). в каждом из которых определялось наличие или отсутствие лейкоцитарной инфильтрации.

Изучение полноты денатурации коллагена венозной стенки проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на базе МГУ им. М.В. Ломоносова. Это исследование позволяет интегрально оценить полноту повреждения коллагена – основного структурного белка венозной стенки. Показано, что от полноты его денатурации зависит исчезновение трубчатой структуры венозной стенки и, соответственно, «невосстановимость» просвета обработанной вены [3]. Контрольной точкой в процентных значениях денатурации коллагена венозной стенки считали 95%. При разрушении такой доли коллагена в стенке вены шансы на ее восстановления становятся крайне низки. Изучали, есть ли различия в методах воздействия на вену между образцами, где денатурация коллагена составила 95% и выше.

Статистическая обработка проводилась путем подсчета количества сегментов венозной стенки с наличием и отсутствием изучаемого признака. Для оценки повреждения эндотелия, глубины поражения и выраженности лейкоцитарной инфильтрации вычислялась доля, которую занимали сегменты с наличием изучаемого признака к общему числу просмотренных сегментов. Статистическую значимость различий в долях сегментов стенки вены с повреждения эндотелия, лейкоцитарной инфильтрацией, и денатурацией коллагена оценивали с помощью критерия χ^2 .

Результаты

Всего выполнено 27 вмешательства. В 3 случаях отмечена техническая неудача при выполнении доступа к вене (диаметр вены менее 2 мм). В одном случае при механо-химической облитерации отмечено повреждение вены (при секции были обнаружены только мелкие фрагменты, непригодные для анализа). Успех достигнут в 23 случаях: 12 механо-химических облитераций системой «Flebogrif», 11 цианоакрилатных облитераций системой «Venaseal».

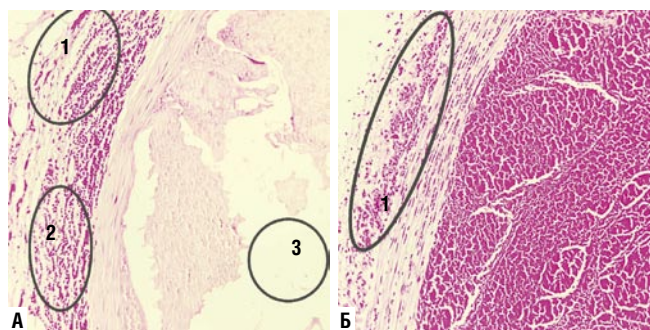


Рис. 2. Стенка вены после: А – «Venaseal»; Б – «Flebogrif» (окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 100$).

На первые сутки из эксперимента было выведено 3 животных. Было получено 12 вен: по 3 образца вен для каждого метода. Было проведено гистологическое исследование полученных образцов венозной стенки.

В обоих образцах НТНТ общая структура стенки вены сохранена, однако интима практически отсутствует. В образце «Venaseal» обращает на себя внимание мукоидное набухание меди (1) и выраженная диффузная сегментоядерная инфильтрация меди и адвентициальной оболочки (2). В просвете вены – клей (3). В образце механо-химической облитерации интима также отсутствует, а диффузная сегментоядерная инфильтрация всех слоев стенки вены (1), почти такая же, как и в сравниваемом образце.

Как показано в таблице 1, после НТНТ происходит неполное (частичное) повреждение эндотелиальной выстилки. Статистически значимого отличия между группами не выявлено.

Глубина повреждения венозной стенки при НТНТ ограничена в основном эндотелием с незначительным вовлечением в процесс меди. Обращает на себя внимание неоднородность глубины поражения стенки вены. Отличия между «Venaseal» и «Flebogrif» статистически незначимы (таблица 2).

Спустя 5 часов после воздействия на стенку вены НТНТ выявлена выраженная инфильтрация меди лейкоцитами. Причем она распространяется до половины сегментов (прилегающих к интима) венозной стенки. Значимых отличий между «Flebogrif» и «Venaseal» не выявлено.

Медиана денатурации составила только 72,5% (min 48, max 95). При этом 75 процентов денатурации коллагена включили в себя 93,5% от объема коллагена венозной стенки. Значимых отличий между группами НТНТ не выявлено.

Обсуждение

В настоящее время мы наблюдаем рост числа инноваций в лечении варикозной болезни вен нижних конечностей. Они позиционируются в качестве альтернативных технологий по отношению к ЭВЛО. Их основными

Табл. 1. Повреждение эндотелия венозной стенки

	«Flebogrif»	«Venaseal»	p-value
Доля сегментов венозной стенки без эндотелия	0,83	0,96	>0,05

Табл. 2. Глубина повреждения венозной стенки

	n	Mean	Median	Mode	Min	Max	St. Dev	p-value
«Flebogrif»	12	1,3	1.0	1.0	1,0	2,0	0,5	>0,05
«Venaseal»	12	1,2	1.0	1.0	1,0	2,0	0,4	

Табл. 3. Лейкоцитарная инфильтрация венозной стенки

	«Flebogrif»	«Venaseal»	p-value
Доля сегментов венозной стенки с лейкоцитарной инфильтрацией	0,42	0,5	>0,05

преимуществами называют отсутствие необходимости в тумесцентной анестезии и ношении компрессионного трикотажа. И хоть эти преимущества и являются дискуссионными, все же нельзя не считаться с тем, что более современные и перспективные методики составляют значимую конкуренцию лазерному воздействию.

Но, если ЭВЛО изучена уже весьма досконально, в том числе и в эксперименте, то к НТНТ методам остаются вопросы. Скепсис связан в том числе с недостатком полноценных фундаментальных исследований, изучающих механизм воздействия этих методов на венозную стенку.

В изученных нами морфологических работах, посвященных эндовазальным методам лечения варикозной болезни, мало освещен вопрос о лейкоцитарной инфильтрации венозной стенки, которая может возникнуть в некоторых ситуациях. С нашей точки зрения лейкоцитарной инфильтрации препятствует облитерация vasa vasorum при ЭВЛО, которая неизбежно возникает при термическом повреждении меди и адвентиции. После цианакрилатной облитерации лейкоцитарная воспалительная реакция весьма характерна [6]. Вероятно, именно сохранением функционирующих vasa vasorum объясняется воспалительная реакция после цианакрилатной облитерации, о чем периодически сообщается [7]. Robert J Min et al. (2012) в эксперименте на superficial epigastric veins свиней показали, что после цианакрилатной облитерации имеет место лейкоцитарная инфильтрация [8] на 30 сутки после вмешательства. Работ, которые продемонстрировали бы возникновение лейкоцитарной инфильтрации в первые часы после цианакрилатной облитерации мы не обнаружили.

D. Boersma et al. (2017) изучали реакцию подкожных вен на механохимическую облитерацию с помощью ClariVein OC Device. Они обнаружили выраженное поражение интимы в 82% случаев и отсутствие выраженного поражения других слоев [9]. При этом взятие материала

для гистологического исследования они проводили через 45 минут после вмешательства. Вероятно, за это время лейкоцитарная инфильтрация не успевала возникнуть в достаточном масштабе, иначе авторы, несомненно обратили бы на это внимание.

Коллаген – это белок, который формирует каркас вены и обеспечивает его опорно-механическую функцию [10]. Необратимое повреждение вены может наступить лишь вследствие денатурации коллагена с последующей потерей его трубчатой структуры. Для определения степени денатурации нами был использован метод ДСК. Показано, что этот метод является интегральным в определении процента денатурированного коллагена во время ЭВЛО [11]. Наше исследование показало, что разрушение коллагена венозной стенки при НТНТ происходит в большом диапазоне значений, что, вероятно, свидетельствует о неравномерном повреждении венозной стенки. Это важно, так как понимание механизмов, происходящих с коллагеном стенки вены при НТНТ, может указать путь усовершенствования данных методов.

Выводы

1. Повреждения венозной стенки при НТНТ ограничены интимой и медией и носят частичный характер
2. В раннем послеоперационном периоде наблюдается выраженная лейкоцитарная инфильтрация медики венозной стенки при НТНТ.
3. Денатурация коллагена венозной стенки при НТНТ колеблется в широком диапазоне с медианой 72,5%.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. The Japanese Society for Vascular Surgery Database Management Committee Member, NVSDAT. Vascular surgery in Japan: 2012 Annual Report by the Japanese Society for Vascular Surgery. *Ann Vasc Dis.* 2019;12(2):260–279. doi: 10.3400/avd.ar.19-00030.
2. Malskat WS, Engels LK, Hollestein LM, et al. Commonly used endovenous laser ablation (EVLA) parameters do not influence efficacy: results of a systematic review and meta-analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2019;58(2):230–242. doi: 10.1016/j.ejvs.2018.10.036.
3. Ignatieva NYu, Zakharkina OL, Mazayshvili CV, et al. Effect of optical fiber type and absorption medium on the endovenous laser ablation mechanism. *Laser Phys Lett.* 2017;14(10):105602. doi: 10.1088/1612-202X/aa86e5.
4. Massaki AB, Kiripolsky MG, Detwiler SP, Goldman MP. Endoluminal laser delivery mode and wavelength effects on varicose veins in an ex vivo model. *Lasers Surg Med.* 2013;45(2):123–129. doi: 10.1002/lsm.22069.
5. Yamamoto T, Sakata M. Morphological comparison of blood vessels that were heated with a radiofrequency device or a 1470-nm laser and a radial 2 ring fiber. *Ann Vasc Dis.* 2016;9(4):272–276. doi: 10.3400/avd.oa.16-00120.
6. Jones AD, Boyle EM, Woltjer R, et al. Persistent type IV hypersensitivity after cyanoacrylate closure of the great saphenous vein. *J Vasc Surg Cases Innov Tech.* 2019;5(3):372–374. doi: 10.1016/j.jvscit.2019.05.004.
7. Hwang JH, Park SW, Kim KH, et al. Regression of varicose veins after cyanoacrylate closure of incompetent great saphenous veins without a localized concomitant procedure. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2019;7(3):375–381. doi: 10.1016/j.jvsv.2018.10.016.
8. Min RJ, Almeida JI, Mclean DJ, et al. Novel vein closure procedure using a proprietary cyanoacrylate adhesive: 30-day swine model results. *Phleb J Venous Dis.* 2012;27(8):398–403. doi: 10.1258/phleb.2011.011084.
9. Boersma D, van Haelst ST, van Eekeren RR, et al. Macroscopic and histologic analysis of vessel wall reaction after mechanochemical endovenous ablation using the Clarivein OC device in an animal model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2017;53(2):290–298. doi: 10.1016/j.ejvs.2016.11.024.
10. Barallobre-Barreiro J, Oklu R, Lynch M, et al. Extracellular matrix remodelling in response to venous hypertension: proteomics of human varicose veins. *Cardiovasc Res.* 2016;110(3):419–430. doi: 10.1093/cvr/cvw075.
11. Ignatieva NY, Zakharkina OL, Masayshvili CV, et al. The role of laser power and pullback velocity in the endovenous laser ablation efficacy: an experimental study. *Lasers Med Sci.* 2017;32(5):1105–1110. doi: 10.1007/s10103-017-2214-x.