

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.137.83-005.7-021.6-092.9

Оценка безопасности и эффективности ацетата целлюлозы при моделировании эмболизации бедренной артерии кролика

О.А. Легонькова¹✉, В.В. Стаффорд^{1, 2}, А.С. Оганнисян¹, А.В. Панов^{3, 5}, Е.С. Жаворонок^{3, 5}, С.А. Кедик^{3, 5}, С.В. Позябин⁴, А.В. Чупин¹, С.В. Сапелкин¹, Б.Г. Алесян¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН», Москва, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», Москва, Российская Федерация

⁵ АО «Институт фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация

✉ **Легонькова Ольга Александровна**, д-р техн. наук, заведующая отделом перевязочных, шовных и полимерных материалов в хирургии; orcid.org/0000-0002-2100-6896, e-mail: oalegonkovapb@mail.ru

Стаффорд Виктория Васильевна, канд. биол. наук, науч. сотр.; orcid.org/0000-0001-8725-2320

Оганнисян Арпине Сиракановна, науч. сотр.; orcid.org/0000-0002-6990-9939

Панов Алексей Валерьевич, канд. хим. наук, доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации

Жаворонок Елена Сергеевна, д-р хим. наук, доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации

Кедик Станислав Анатольевич, д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии и промышленной фармации, генеральный директор ИФТ

Позябин Сергей Владимирович, д-р вет. наук, профессор, ректор

Чупин Андрей Валерьевич, д-р мед. наук, заведующий отделением сосудистой хирургии

Сапелкин Сергей Викторович, д-р мед. наук, вед. науч. сотр.

Алесян Баграт Гегамович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, руководитель Центра рентгенэндоваскулярной хирургии; orcid.org/0000-0001-6509-566X

Резюме

Цель исследования – проведение сравнительной оценки эффективности эмболизации и безопасности применения разрабатываемого жидкого полимерного компаунда на основе ацетата целлюлозы с различными концентрациями по полимеру и препарату сравнения Опух™ в условиях *in vivo*.

Материал и методы. В эксперименте были сравнены две базовые полимерные композиции разрабатываемого эмболизирующего состава на основе ацетата целлюлозы (АЦ), различающиеся содержанием АЦ – 3 и 6 масс. %. В качестве рентгеноконтрастных агентов были использованы препараты – молекулярный йод (4 масс. %) и Липиодол® Ультра-Флюид (10 масс. %) в растворе диметилсульфоксида (ДМСО). В качестве препаратов сравнения были использованы: Опух™, 4% раствор йода, 10% раствор липиодола в ДМСО, отдельно ДМСО.

Эмболизацию осуществляли у 28 лабораторных животных (кролики породы шиншилла в возрасте 1 года с массой тела 4–6 кг) на бедренной артерии согласно инструкции по применению препарата Опух™. Объем вводимых препаратов, как контрольных, так и исследуемых, составлял 0,5 мл.

Проводили рентгенографические, гистологические и гематологические исследования, исследования поверхности и сколов извлеченных эмболов.

Результаты. При введении липиодола, являющегося составной частью разрабатываемых композиций, гистологических изменений, относящихся к токсическим, атрофическим повреждениям и жировой эмболии, не было обнаружено, что может свидетельствовать о возможности его применения интраартериально.

В результате проведенной работы было выявлено, что образующиеся эмболы полностью перекрывают кровоток независимо от концентрации полимерной составляющей. Структура эмболов в период наблюдения оставалась гибкой и неизменной в данном месте расположения по сосуду. Лимфоидная реакция в окружающих тканях не отличается от таковой при применении Опух™. «Негативная» реакция окружающих эмбол тканей определяется действием растворителя – ДМСО. Полимерная составляющая эмболизирующих композиций – сополимер этиленвинилового спирта (Опух™) или ацетат целлюлозы (разрабатываемый препарат) – демонстрирует интактные свойства, не влияет на проявление токсичности в окружающих тканях.

Заключение. По своим эксплуатационным характеристикам, медико-биологическим свойствам композиции на основе ацетата целлюлозы демонстрируют аналогичное поведение в сравнении с известным препаратом Опух™, а сам полимер является инертным по отношению к окружающим тканям, не токсичным и безопасным для применения в составе эмболизирующих средств.

Ключевые слова: эмболизация, ацетат целлюлозы, поливиниловый спирт, гистология, лимфоидная реакция

Для цитирования: Легонькова О.А., Стаффорд В.В., Оганнисян А.С., Панов А.В., Жаворонок Е.С., Кедик С.А., Позыбин С.В., Чупин А.В., Сапелкин С.В., Алекян Б.Г. Оценка безопасности и эффективности ацетата целлюлозы при моделировании эмболизации бедренной артерии кролика. *Эндоваскулярная хирургия*. 2021; 8 (4): 398–411. DOI: 10.24183/2409-4080-2021-8-4-398-411

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. За помощь в проведении исследований методом сканирующей электронной микроскопии выражаем благодарность в. н. с. Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН к. х. н. И.Н. Сенчихину. Часть экспериментальной работы была выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования физическими методами анализа ИФХЭ РАН.

Поступила 18.10.2021
Принята к печати 15.11.2021

Safety and efficacy assessment of cellulose acetate in modeling of rabbit femoral artery embolization

O.A. Legon'kova¹✉, V.V. Stafford^{1, 2}, A.S. Ogannisyan¹, A.V. Panov^{3, 5}, E.S. Zhavoronok^{3, 5}, S.A. Kedik^{3, 5}, S.V. Pozyabin⁴, A.V. Chupin¹, S.V. Sapelkin¹, B.G. Alekyan¹

¹ National Medical Research Center of Surgery named after A.V. Vishnevsky, Moscow, Russian Federation

² Federal Scientific Center – All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Ya.R. Kovalenko, Moscow, Russian Federation

³ MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russian Federation

⁴ Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation

⁵ Institute of Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation

✉ **Ol'ga A. Legon'kova**, Dr. Tech. Sci., Head of Department of Dressings, Suture and Polymeric Materials in Surgery; orcid.org/0000-0002-2100-6896, e-mail: oalegonkovapb@mail.ru

Viktoriya V. Stafford, Cand. Biol. Sci., Researcher; orcid.org/0000-0001-8725-2320

Arpine S. Ogannisyan, Researcher; orcid.org/0000-0002-6990-9939

Aleksey V. Panov, Cand. Chem. Sci., Associate Professor of Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy

Elena S. Zhavoronok, Dr. Chem. Sci., Associate Professor of Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy

Stanislav A. Kedik, Dr. Tech. Sci., Professor, Head of Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, General Manager of IPT

Sergey V. Pozyabin, Dr. Vet. Sci., Professor, Rector

Andrey V. Chupin, Dr. Med. Sci., Head of Department of Vascular Surgery

Sergey V. Sapelkin, Dr. Med. Sci., Leading Researcher

Bagrat G. Alekyan, Dr. Med. Sci., Professor, Academician of RAS, Head of Endovascular Surgery Center; orcid.org/0000-0001-6509-566X

Abstract

Objective. To carry out comparative *in vivo* assessment of efficacy and the safety of new developed liquid polymer compound based on cellulose acetate with various polymer concentrations and the embolic agent Onyx™.

Material and methods. Two basic polymer compositions were investigated including cellulose acetate in concentration of 3 and 6%. Molecular iodine (4%) and Lipiodol (10%) were taken as X-ray contrast agents in dimethyl sulfoxide solution (DMSO).

Onyx™, iodine solution (4%), Lipiodol (10%) in DMSO, and separately DMSO were investigated as comparative preparations.

Embolization was conducted on 28 laboratory animals (chinchilla rabbits at the age of 1 year and with mass of 4–6 kg) on femoral artery in accordance with the instruction on Onyx™ use. Volume of the induced preparations was 0,5 ml.

Histological, X-ray, hematological investigations were carried out together with investigation of surface and chipped surfaces.

Results. With the introduction of Lipiodol, which is an integral part of the developed compositions, histological changes related to toxic, atrophic lesions and fat embolism were not revealed, which may indicate the possibility of using Lipiodol intraarterially.

It was revealed that the formed emboli completely overlap the blood flow, regardless of the concentration of the polymer component. The structure of emboli during the observation period remains flexible and unchanged at a given location along the vessel. The lymphoid response in the surrounding tissues does not differ from that with Onyx™. The "negative" reaction of the tissues surrounding the emboli is determined by the impact of DMSO. The polymer component of the embolizing compositions, be it an ethylene-vinyl alcohol copolymer (Onyx™) or cellulose acetate, exhibits intact properties and does not affect the manifestation of toxicity in the surrounding tissues.

Conclusion. According to the revealed exploitation and medical and biological characteristics, the compositions based on cellulose acetate and Onyx™ are the same. The polymer (cellulose acetate) is inert to the environmental tissues, not toxic and biosafe for usage as embolizing agent.

Keywords: embolization, cellulose acetate, polyvinyl alcohol, histology, lymphoid reaction

For citation: Legon'kova O.A., Stafford V.V., Ogannisyan A.S., Panov A.V., Zhavoronok E.S., Kedik S.A., Pozyabin S.V., Chupin A.V., Sapelkin S.V., Alekhan B.G. Safety and efficacy assessment of cellulose acetate in modeling of rabbit femoral artery embolization. *Russian Journal of Endovascular Surgery*. 2021; 8 (4): 398–411 (in Russ.). DOI: 10.24183/2409-4080-2021-8-4-398-411

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. Let us say gratitude to I.N. Senchikhin, candidate of science, the leading science employee in the Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry Russian Academy of Sciences for help in research via electron microscopy. Part of the experimental work was done with the use of the equipment, located in the above mentioned Institute.

Received October 18, 2021
Accepted November 15, 2021

Введение

Искусственная эмболизация — это намеренная избирательная окклюзия кровеносных сосудов в терапевтических целях. Она активно внедряется в клиническую практику рентгенэндоваскулярных хирургов при лечении онкологических, сосудистых заболеваний: аневризм, артериовенозных мальформаций, кровотечений различной локализации, а также для предоперационной подготовки пациентов [1–6]. Различные цели применения требуют и различных медицинских изделий: имеются эмболизирующие препараты как в форме гранул, так и в виде растворов полимеров. Среди зарегистрированных и активно используемых в России препаратов в жидкой форме следует отметить следующие [7]:

— Onyx™ (регистрационное удостоверение от 07.07.2015 № РЗН 2015/2741), полимерная основа — сополимер этилена и винилового спирта (EVOH), растворитель — диметилсульфоксид, рентгеноконтрастный агент — микронизированный порошок тяжелого металла тантала;

— RHIL™ (регистрационное удостоверение от 03.03.2016 № РЗН 2016/3774), полимерная основа — продукт полимеризации сополимера полилактида и гликолида с гидроксиэтилметакрилатом, растворитель — диметилсульфоксид, рентгеноконтрастный агент — 2,4,6-трийодфенол, ковалентно связанный с полимером;

— Squid (регистрационное удостоверение от 09.11.2017 № РЗН 2017/6472), полимерная основа — сополимер этилена и винилового спирта, растворитель — диметилсульфоксид, рентгеноконтрастный агент — микронизированный порошок тантала с меньшей степенью дисперсности, чем в случае Onyx™.

Однако, несмотря на востребованность известных эмболизирующих агентов, в настоящее время на отечественном рынке отсутствуют собственные продукты.

В связи с этим целью данного исследования явилось проведение сравнительной оценки эффективности эмболизации и безопасности применения совместно разрабатываемого НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского и Институтом фармацевтических технологий жидкого полимерного компаунда [8] и препарата Onyx™-18 в условиях *in vivo*.

Цель исследования достигалась решением следующих задач: оценка действия рентгеноконтрастных препаратов; гистологическое исследование локальных и системных эффектов применения эмболизирующего компаунда в различных вариантах исполнения и на разных сроках эмболизации по сравнению с индивидуальным введением молекулярного йода, липиодола, диметилсульфоксида (ДМСО); исследование структуры экспериментальных образцов эмболов до и после применения *in vivo* методом сканирующей электронной микроскопии; исследование биохимического состава сыворотки крови животных, изучение общих показателей крови.

Материал и методы

В эксперименте проведено сравнение двух базовых полимерных композиций разрабатываемого эмболизирующего состава (ЭС) на основе ацетата целлюлозы (АЦ), различающихся содержанием АЦ — 3 и 6 масс. %. В качестве рентгеноконтрастных агентов были использованы препараты: молекулярный йод (4 масс. %) и Липиодол® Ультра-Флюид (10 масс. %) в растворе ДМСО.

В качестве препаратов сравнения были использованы: Onyx™, 4% раствор йода, 10% раствор липиодола в ДМСО, отдельно ДМСО.

Выбор указанных концентраций АЦ в эксперименте неслучаен и объясняется следующим: эквивалентный аналог разрабатываемого ЭС — Onyx™, согласно инструкции по применению, состоит из 6% раствора сополимера этиленви-

нилового спирта в ДМСО и характеризуется кинематической вязкостью 18 сСт при 40 °С. Процесс образования твердого эмбола базируется на известном в физикохимии полимеров явлении, называемом «фазовым расслоением». В сравниваемом препарате используется тот же принцип. Для того, чтобы можно было провести параллели между характеристиками разрабатываемого ЭС и Онух™ по двум аспектам — с точки зрения аналогии вязкости и количественного содержания АЦ в растворе, были предварительно подобраны 3% (аналогия по вязкости) и 6% (аналогия по количественному содержанию полимера) растворы АЦ в ДМСО.

Эмболизацию осуществляли у 28 лабораторных животных (кролики породы шиншилла в возрасте 1 года с массой тела 4–6 кг) на бедренной артерии (медиальная поверхность бедра в верхней трети) согласно инструкции по применению препарата Онух™. Объем вводимых препаратов, как контрольных, так и исследуемых, составлял 0,5 мл.

После проведения оперативного вмешательства и перед выводом животных из эксперимента выполняли рентгенографическое исследование на аппарате Orange-2040HF с целью определения сохранности рентгеноконтрастных свойств. Послеоперационные снимки выполняли у животных, находящихся в состоянии общей анестезии, последующие контрольные снимки выполняли без седации, в латеромедиальной проекции, при использовании DR-панели в формате DICOM. Доза облучения животного при проведении одной рентгенограммы не превышала 0,005 мЭВ.

Гематологические исследования крови осуществляли на гематологическом анализаторе Mindray BC-2800 Vet full-auto hematology analyzer. Исследование биохимического состава сыворотки крови проводили на автоматических биохимических анализаторах Beckman coulter AU480 и Furuno CA-180. Перед началом эксперимента у кроликов отбирали венозную кровь для определения показателей в интактных условиях для данной группы животных.

Патологический материал отбирали в ходе эксперимента для определения макро- и микрорисунка на разных сроках эмболизации. Взятый материал помещали в 10% забуференный раствор формалина, в плотно укупленную химически стойкую тару. Фиксировали материал при комнатной температуре не менее

48 ч. Далее рассекали материал на поперечные и продольные образцы, помещали в гистологические кассеты, обрабатывали в автоматическом оборудовании карусельного типа фирмы Thermo Scientific (Германия), заливали горячим парафином, формировали парафиновые блоки при температуре –10 °С, на микротоме нарезали серийные срезы, расправляли на водяной бане, наносили на предметные стёкла, предварительно обработанные глицериновым альбумином по Mallogy, срезы просушивали, окрашивали гематоксилином и эозином. Оценку гистологической картины выполняли при помощи светового микроскопа Axio A1.0 (Carl ZeiZZ), фотосъёмку вели с использованием фотоаппарата и программы AxioVision, с увеличением в 100 раз.

Исследование поверхности и сколов извлеченных эмболов проводили при помощи растрового электронного микроскопа с полемым катодом Quanta 650 FEG (FEI, Нидерланды), оснащенный энергодисперсионным датчиком рентгеновского излучения (EDS, EDX) Octane Elect Plus (EDAX, США), в режиме ESEM (environmental SEM — режим «естественной среды») при давлении 4 Торр и режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 30 кВ. Анализ спектров проводили с использованием программного обеспечения EDAX Genesis.

Отбор проб и вывод животных из эксперимента осуществляли на 3-й, 7-й, 14-й дни.

С целью изучения локальных и системных эффектов отбирали паренхиматозные органы и образцы кровеносных сосудов с окружающими тканями из областей: бедра (место введения), коленной, подколенной, голени, плюсны, пальцев.

Экспериментальное исследование выполняли в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, регламентированными документами: «Guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, international»; Приказ № 724 от 1984 г. Министерства высшего образования СССР «Правила проведения работ с экспериментальными животными»; Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к лабораторным животным (2000 г.), директива Европейского сообщества (86/609 ЕС) и Правила лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Минздрава России № 267 от 19.06.2003 г.).

Результаты

Рентгенологическое исследование

Исследование рентгенографических снимков показало, что в случае применения препаратов Онух™ и ЭС на основе АЦ независимо от класса полимерной основы, концентрации АЦ образующиеся эмболы полностью перекрывали кровотоки, было заметно расхождение эмболов по коллатералям магистральной артерии. Однако рентгеноконтрастность эмболов была различной (см. таблицу).

Не столь длительная рентгеноконтрастность эмболов на основе АЦ объясняется быстрой диффузией липиодола в окружающие ткани и подтверждает тот факт, что разрабатываемый компаунд представляет собой дисперсную систему с химически не связанными компонентами, где основное эмболизирующее свойство остается за полимерной составляющей композиции.

Применение молекулярного йода в качестве рентгеноконтрастного агента в исследуемых эмболизирующих составах вообще не целесообразно.

Препарат Онух™ в связи с наличием в своем составе танталовой стружки обладал постоянной контрастностью на протяжении всего эксперимента.

Таким образом, среди разрабатываемых составов и рентгеноконтрастных агентов эффективность контрастирования обеспечивает липиодол в концентрациях не меньше 10%. При этом в составе 6% раствора АЦ в ДМСО липиодол обеспечивает более длительный эффект (до 3 дней), чем в составе 3% раствора АЦ в ДМСО, что объясняется увеличением вязкости 6% раствора АЦ в 2 раза.

Макрокартина тканей

после введения исследуемых композиций

При исследовании патолого-анатомической картины тазовых конечностей после введения

составляющих компонентов разрабатываемого компаунда (ДМСО, 4% раствор йода в ДМСО, 10% раствор липиодола в ДМСО, Онух™-18) было выявлено, что наиболее сильные токсические повреждения тканей были вызваны введением 4% раствора йода в ДМСО и самим ДМСО. Токсическое действие на стенку сосуда и окружающие ткани ДМСО усиливается 4% йодом: резкий отек подкожной клетчатки, изменение цвета мышц, некротические изменения в глубоких слоях мышечной ткани, увеличение порозности кровеносных сосудов, нарушение кровообращения в области применения, развитие обширных геморрагических очагов.

При исследовании тканей после введения 10% липиодола в ДМСО и Онух™ подобных изменений в окружающих тканях выявлено не было, а реакция тканей аналогична в обоих случаях — кровоизлияний нет. То есть раствор липиодола при отсутствии АЦ в его составе и Онух™ оказывают меньшее токсическое действие на окружающие ткани, чем раствор йода и ДМСО.

Макрокартина в случаях применения композиций, содержащих 3% и 6% АЦ, была схожа с Онух™ и не отличалась одна от другой в зависимости от концентрации полимера.

Гематология

Показатели биохимического и общего анализов крови в ходе эксперимента находились в пределах референтных значений для данного вида животного. Стоит лишь отметить, что внутри референтного диапазона показателей крови наблюдалось их незначительное повышение к 7-му дню эксперимента у всех испытуемых животных и снижение до первоначальных значений к 14-м суткам. Подобные изменения могут быть связаны с оперативным вмешательством и внутриартериальным введением инородного вещества (в данном случае — вводимые препараты), что является адекватной реакцией

Результаты рентгенографических исследований образцов, использованных в эксперименте

Состав композиции	Сроки наблюдения, сут			
	после операции	3-и	7-е	14-е
3% АЦ, 10% липиодола	Контрастен	Слабоконтрастен	Слабоконтрастен	Нет контрастности
6% АЦ, 10% липиодола	Контрастен	Слабоконтрастен	Слабоконтрастен	Слабоконтрастен
3% АЦ, 4% йода	Контрастен	Нет контрастности	Нет контрастности	Нет контрастности
6% АЦ, 4% йода	Контрастен	Нет контрастности	Нет контрастности	Нет контрастности
Онух™	Контрастен	Контрастен	Контрастен	Контрастен

организма на такое вмешательство. Восстановление показателей до первоначального уровня подтверждает наши выводы о том, что вводимые препараты не оказывают токсического и фатального действия на организм в целом.

Данные общего анализа крови согласуются с тем, что гемопоэз находится на нормальном уровне, токсические эффекты отсутствуют. Количественные показатели уровня клеточного иммунитета также свидетельствуют о нормальном функционировании иммунной системы организма и отсутствии критических воспалительных реакций, которые могли бы вызвать негативный ответ на вводимые вещества. Показатели гемопоэза находятся в пределах референтных значений, что может говорить о нормальной работе кроветворных органов и костного мозга.

Гистологические исследования

После исследования образцов тканей от интактных животных, убедившись в отсутствии патологических изменений, характерных для интоксикации и нарушения кровообращения, животных разделили на группы и начали эксперимент согласно дизайну исследования, описанному выше.

Через 3-е суток после введения 4% раствора йода в ДМСО было выявлено, что стенка сосуда, коллатерали сосуда и окружающие ткани находились в состоянии некроза и лизиса, о чем свидетельствует наличие восковидных компонентов на месте предполагаемых тканей. Так, стенка артерии, особенно мелкого калибра, выглядела как однородная оксифильная полоса, в ее просвете была видна масса, неоднородно окрашенная в слабо-розовый цвет, структурные элементы клеток тканей не дифференцировались, границы клеток отсутствовали. Наиболее сохранившиеся структуры наблюдали лишь в области бедра, где заметна стенка артерии в состоянии резкого отека, в ее просвете выявлен тромб, состоящий из массы клеток, интима сосуда некротизирована, окружающие сосуд ткани в состоянии воспаления. Такая картина связана с резким токсическим действием йода и ДМСО на ткани артерии, что вызывает порозность ее стенки с последующим некрозом. Сохранность структур сосуда в области бедра связана с тем, что применяемый раствор прошел дистальнее по кровеносному руслу, не задерживаясь надолго в области бедра. Некротический процесс, выявленный в дистальных участках

конечности, по нашему мнению, связан с задержкой там раствора, что и вызвало необратимые процессы омертвления тканей. На 7-е сутки эксперимента наблюдали сухой некроз дистальных участков конечности. В гистологических препаратах наблюдали некротические участки разной степени развития и размера. Стенка сосуда сливалась с окружающей тканью, в просвете сосудов были видны тромбы, состоящие из клеток периферической крови и фибрина, в мышечной ткани — также участки инфаркта и некроза.

Таким образом, введение 4% раствора йода в ДМСО вызывает необратимые некротические изменения на клеточном уровне как в стенке сосуда, так и в окружающих тканях, начиная с места введения препарата и до пальцев.

При введении 10% раствора липидола в ДМСО на 3-и сутки в сосудах в области колена был выявлен тромбоз, в стенке сосуда определялся некроз мышечной ткани в области тромбоза, в сосудах дистальнее колена структура тканей стенки сосуда была сохранена. Во всей тазовой конечности периваскулярно наблюдали воспаление в тканях. На 7-е сутки структура тканей была сохранена в области от бедра до плюсны. В области пальцев наблюдали спавшиеся сосуды, образование соединительнотканых волокон, в мышечной ткани наблюдали инфаркты. Стенка сосудов была значительно утолщена.

Использование 10% раствора липидола в ДМСО сопровождалось лучшей сохранностью тканей, чем использование 4% йода с ДМСО. Несмотря на наличие некротических изменений в стенке артерии и атрофии после тромбоза, можно сделать вывод, что процесс обратим, так как на 7-е сутки эксперимента структура тканей на клеточном уровне хорошо визуализируется и имеет очерченные границы, воспалительная реакция выражена слабо.

После внутриартериального введения ДМСО через 3-е суток наблюдали выраженное воспаление в окружающих тканях, обширные участки кровоизлияния. На всём протяжении сосуда и его коллатералей, от места введения и дистальнее его, до пальцев, наблюдали некротические изменения в стенке сосуда, тромбоз его просвета. Мышечная ткань находилась в состоянии деструкции и высокой порозности. Через 7 сут мышечная ткань тазовой конечности приобрела цвет вареного мяса. В области пальца наблюдали резкое сужение просвета сосуда,

вплоть до его полного закрытия, в проксимальных отделах конечности отмечали утолщение стенки сосуда, что характеризовалось развитием отёка и образованием соединительнотканых структур. Периваскулярные ткани также находились в состоянии отёка с пролиферацией лимфоидных клеток.

При введении только липиодола гистологических изменений, относящихся к токсическим, атрофическим повреждениям и жировой эмболии, не было выявлено. Структура тканей была сохранена на протяжении всех дней на-

блюдения. Таким образом, липиодол способствует уменьшению воспалительной реакции при его введении совместно с ДМСО и йодом.

Анализируя гистологические данные, полученные после применения образца Опух™-18 (рис. 1), было установлено: при введении Опух™ (сополимера этиленвинилового спирта) в окружающих тканях видна диффузная инфильтрация клетками лейкоцитарного типа. Периваскулярно заметно наличие белкового компонента, что может свидетельствовать о выходе жидкой части крови (плазмы) из сосуда в ре-

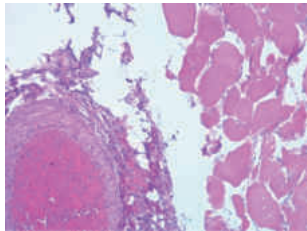
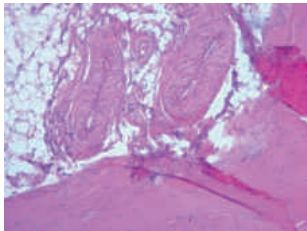
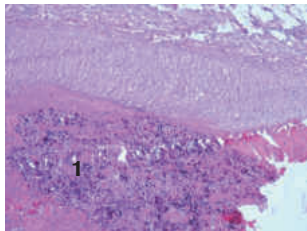
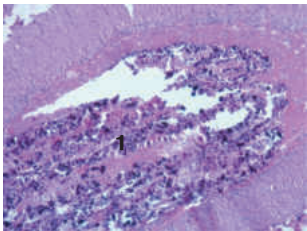
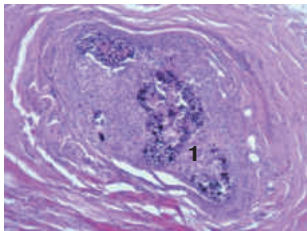
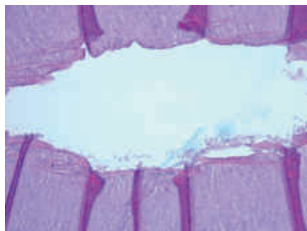
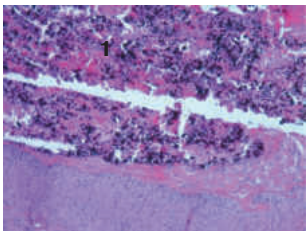
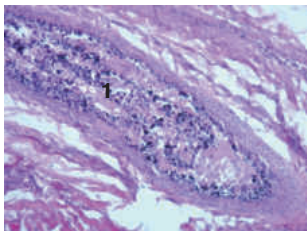
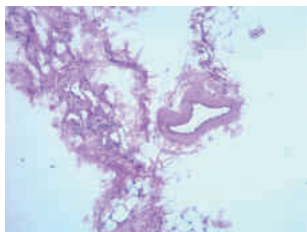
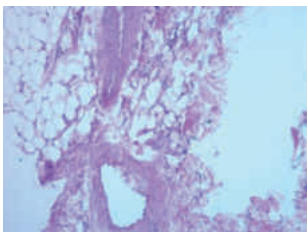
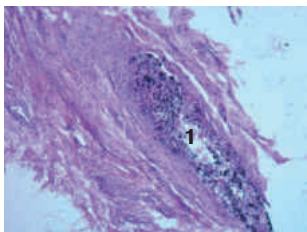
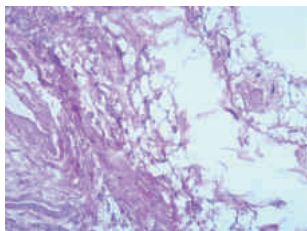
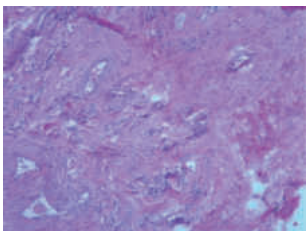
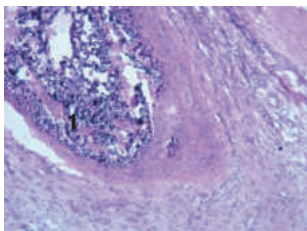
Место взятия материала	Срок наблюдения, сут		
	3-и	7-е	14-е
Место введения		—	
Колено			
Голень			
Плюсна			
Палец			

Рис. 1. Гистологическая картина после введения Опух™-18. Окраска гематоксилином и эозином, × 100.

1 — эмбол

зультате развития застоя крови. Очертание стенки сосуда заметно, однако форма и границы размытые, структура слоёв артерии нарушена. Структура эмбола неравномерная и характеризуется наличием клеточного состава крови в пустотах между неравномерно распределенной по эмболу стружкой тантала. Выражена отёчность окружающих тканей, степень которой сравнима с таковой при применении разрабатываемых композиций (рис. 2, 3. Здесь и далее в рисунках, где не отмечено наличие эмбола, иллюстрации представлены для широты гистологической картины подлежащих к эмболу тканей).

Следует отметить, что в ходе всего эксперимента наблюдали неравномерность структуры эмбола, которая характеризовалась наличием клеточного состава крови в пустотах между стружкой тантала. Процесс эпителизации просвета сосуда, наблюдаемый на 14-е сутки, можно связать с тем, что танталовая стружка оказывает сильное повреждающее действие на интиму сосуда, а та, в свою очередь, обладая высокой регенеративной способностью, пытается восстановиться.

После введения композиции, состоящей из 3% раствора АЦ и 10% раствора липиодола в ДМСО, на 3-й сутки в периваскулярной ткани определялась умеренная воспалительная реакция, связанная с обтурацией просвета сосуда. Стенка артерии была сохранена, однако интима сосуда находилась в состоянии отёка (см. рис. 2).

В просвете артерии хорошо визуализировалось неоднородное скопление клеток периферической крови и вводимого препарата. На 7-е сутки, несмотря на процессы, связанные с атрофией тканей, их структура сохранена, различима, в стенке артерии определяется обширный некроз, воспалительный процесс выявляется в периваскулярных тканях, непосредственно прилегающих к стенке сосуда.

В просвете сосуда эмбол имеет рыхлую, пористую структуру, его поры более крупные по сравнению с эмболом, полученным при введении композиции, состоящей из 6% раствора АЦ и 10% раствора липиодола в ДМСО (см. рис. 3). Эмболизирующий состав хорошо прилегает к внутренней поверхности сосуда, что свидетельствует о его адгезивных качествах. Лимфоидные

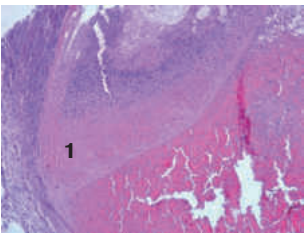
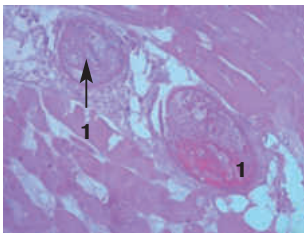
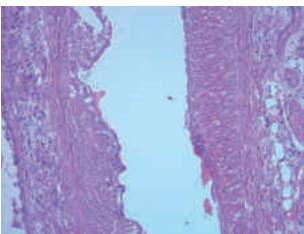
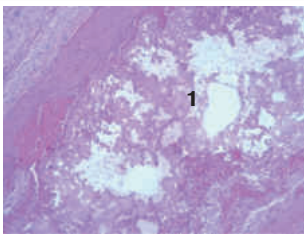
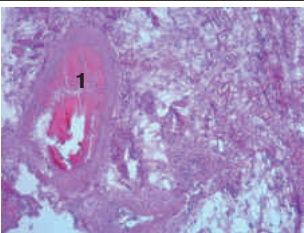
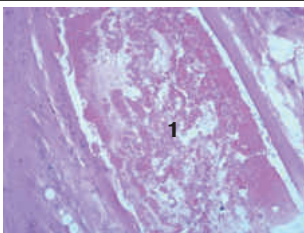
Место взятия материала	Срок наблюдения, сут	
	3-и	7-е
Место введения		
Голень		
Плюсна		

Рис. 2. Гистологическая картина при введении композиции, состоящей из 3% раствора АЦ и 10% раствора липиодола в ДМСО. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

1 – эмбол

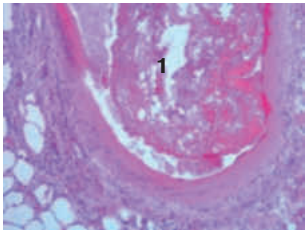
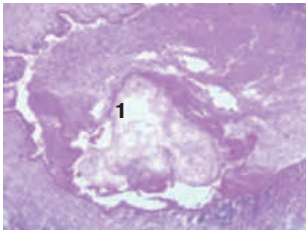
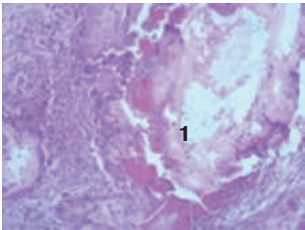
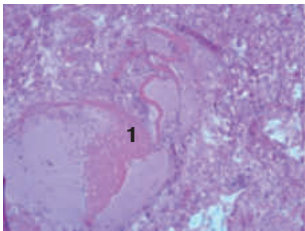
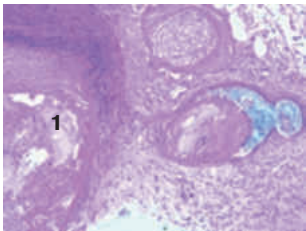
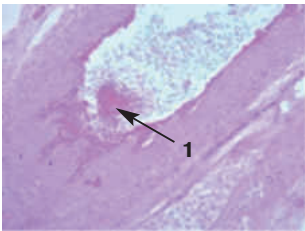
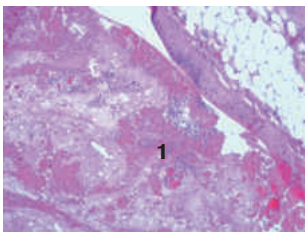
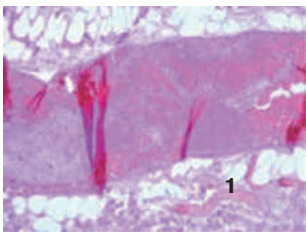
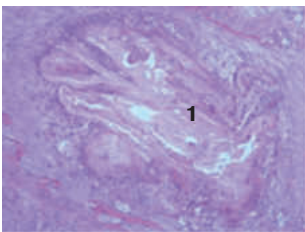
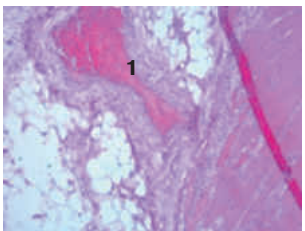
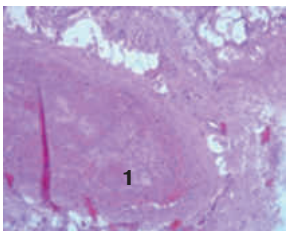
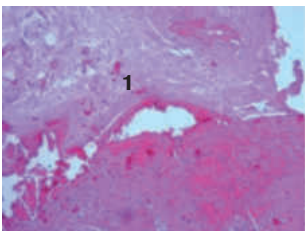
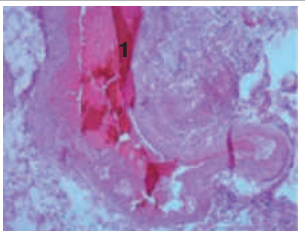
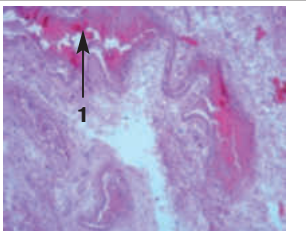
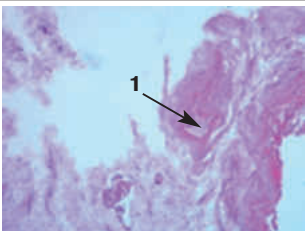
Место взятия материала	Срок наблюдения, сут		
	3-и	7-е	14-е
Место введения			
Колено			
Голень			
Плюсна			
Палец			

Рис. 3. Гистологическая картина при введении композиции, состоящей из 6% раствора АЦ и 10% раствора липиодола в ДМСО. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

1 – эмбол

клетки более плотно располагаются в тканях в области сосуда.

После введения композиции, состоящей из 6% раствора АЦ и 10% раствора липиодола в ДМСО на 3-й день эксперимента наблюдалось сохранение структур сосудистого русла и окружающих тканей (см. рис. 3). Воспалительная реакция была более выраженной вокруг стенки сосуда. В просвете артерии наблюдали эмбол, хорошо прикреплённый к интима сосуда. Эмбол сохранял свою пористую структуру с мелки-

ми порами, повторял форму просвета артерии. Седьмые сутки эксперимента ничем не отличались по гистоархитектонике эмбола и тканей от 3-х суток. На 14-е сутки выявлены некротические изменения в тканях, такие как трудная дифференцировка структур стенок сосуда и окружающих тканей.

Таким образом, при введении композиции, состоящей из 6% раствора АЦ и 10% раствора липиодола в ДМСО, хорошо заметно распределение эмболизирующего состава в сосудах и его

коллатералях по всей длине от бедра до фаланг пальцев. Гистоструктура тканей хорошо дифференцировалась, отмечались участки периваскулярного воспаления и пропитывание стенки артерии лимфоцитами. Выявлены атрофические изменения в стенке сосуда, в его просвете визуализируется эмбол с пористой структурой, эластичный, о чем свидетельствует наличие клеток в углах изгиба эмбола; адгезия к стенке сосуда сохранена.

При введении композиции, состоящей из 3% раствора АЦ и 4% раствора йода в ДМСО, в периваскулярной ткани была выявлена инфильтрация лимфоидными клетками (лимфоцитами) в виде демаркационного вала. Стенка сосуда также была пропитана лимфоцитами, мышечные волокна находились в состоянии резкого отёка, в некоторых местах, со стороны интимы

сосуда, наблюдали участки некроза тканей стенки. В просвете сосуда визуализируется комплаунд в виде однородной массы с примесью клеток крови (рис. 4). На 7-е сутки применения, по сравнению с 3-ми сутками, выявлен некроз мышечной стенки артерии и ее интимы, экстравазатное воспаление сохранялось.

В результате использования композиции, состоящей из 3% раствора АЦ и 4% раствора йода в ДМСО, отмечалось наличие некрозов, отеков и воспалительной реакции. Характер эмбола в сосуде неоднородный, часто в виде отдельных частей с примесью клеток крови. Ярко выражена воспалительная реакция в окружающих тканях.

При введении композиции, состоящей из 6% раствора АЦ и 4% раствора йода в ДМСО, гистологическая картина тканей артерии и периваскулярных структур ничем не отличалась

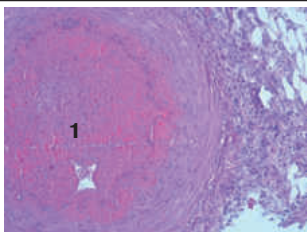
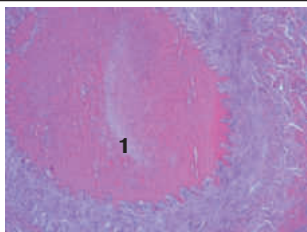
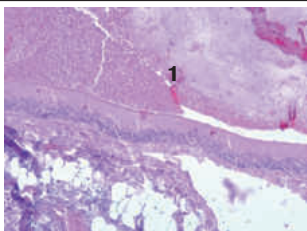
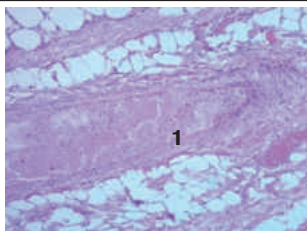
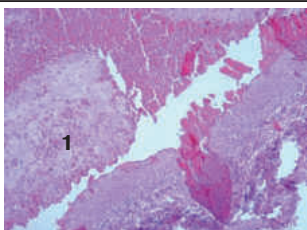
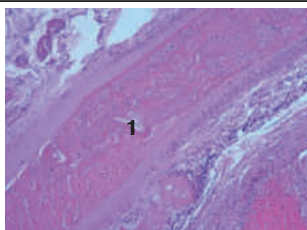
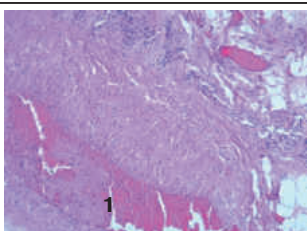
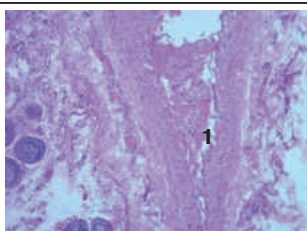
Место взятия материала	Срок наблюдения, сут	
	3-и	7-е
Место введения		
Голень		
Плюсна		
Палец		

Рис. 4. Гистологическая картина при введении композиции, состоящей из 3% раствора АЦ и 4% раствора йода в ДМСО. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

1 – эмбол

от результатов, полученных при введении композиции, состоящей из 3% раствора АЦ и 4% раствора йода в ДМСО (см. рис. 4), структура артерии и окружающих тканей сохранена, в них наблюдаются признаки воспаления, однако клеточные элементы дифференцируемы. В связи с обтурацией сосуда наблюдаемые изменения можно характеризовать как атрофию. Эмбол в сосуде компактный, мелкопористый, в венозном русле выражен застой крови с выпадением фибрина. То есть увеличение концентрации ацетата целлюлозы и, как следствие, увеличение вязкости эмболизирующего препарата не снижает выход йода в окружающие ткани.

Таким образом, оценивая результаты патолого-анатомического и гистологического исследований, можно сделать общий вывод о том, что реакция тканей в случае использования составов: липиодол + ДМСО; ацетат целлюлозы + липиодол + ДМСО, а также Onyx™ в целом эквивалентна, что позволяет сделать вывод об отсутствии токсичности ацетата целлюлозы и липиодола.

Наиболее оптимальной для разработки компаунда является композиция, состоящая из 6% раствора АЦ и 10% раствора липиодола. Такой состав позволяет в условиях *in vivo* получить более компактный и равномерный эмбол, который обладает лучшими адгезивными свойствами и устойчив в течение всего периода наблюдения (14 дней) по сравнению с 3% концентрацией АЦ.

Результаты сканирующей электронной микроскопии объясняют рентгенологические и патоморфологические данные, приведенные выше, показывая схожее поведение ЭС и Onyx™.

Были исследованы поверхности образцов эмбола на основе Onyx™ и эмбола, полученного

из композиции, состоящей из 6% раствора АЦ и 10% раствора липиодола в ДМСО, а также сколы (поверхности, образующиеся при перпендикулярных срезах).

На рисунке 5 показано, что эмбол визуализируется как спиралевидный объект с диспергированной стружкой тантала. Из-за присутствия в системе стружки металла и его неравномерного распределения структура поверхности и внутренняя структура эмбола рыхлая, неоднородная, внутри эмбола обнаружены ярко выраженные «пустоты». Это объясняется тем, что в ходе движения по кровеносному руслу препарат «захватывает» элементы крови, которые при выдержке в физиологическом растворе во время фиксации отобранного экспериментального материала образуют полости.

На рисунке 6 приведены электронные микрофотографии сколов образцов эмбола, полученного при введении композиции, состоящей из 6% раствора АЦ и 10% раствора липиодола в ДМСО, выделенных из области бедра, голени, ахиллова сухожилия. Видно, что образовавшийся эмбол представляет собой плотный, эластичный, гладкий объект в виде штрэнги (пряжи) (см. рис. 6, б), повторяющий поверхность и форму сосуда, обладающий сплошностью (см. рис. 6, а).

В зависимости от участка эмболизированного сосуда поперечная поверхность скола эмбола отличается. Так, в районе места введения поверхность эмбола характеризуется рыхлой, пористой структурой, а ниже места введения, в районе голени, структура скола становится более плотной и гладкой (см. рис. 6, в, д).

Увеличенная внутренняя пористость эмболов в районе места введения связана в крупных сосудах с большой объемной скоростью крово-

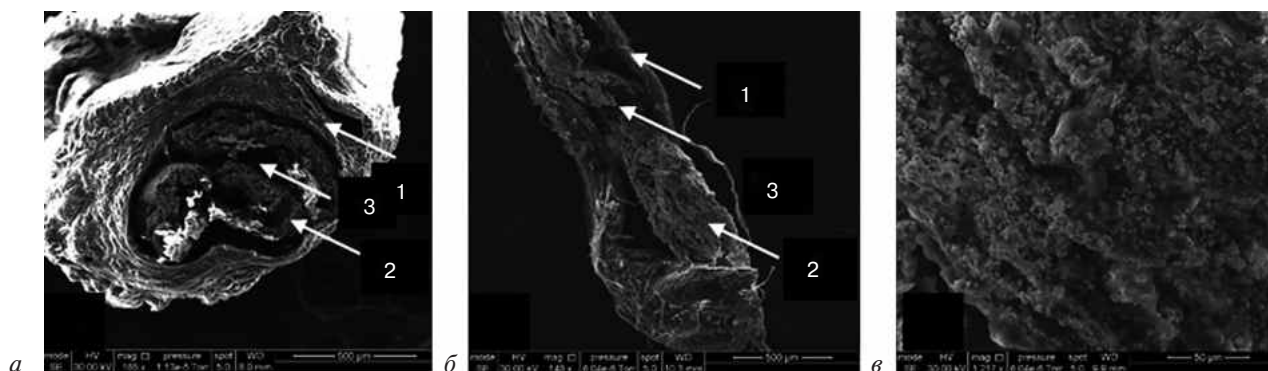


Рис. 5. Электронные микрофотографии эмбола, полученного при введении Onyx™-18 в область голени:

а — поперечный срез эмболизированного сосуда, × 185; б — продольный срез эмболизированного сосуда, × 148; в — структура поверхности эмбола, × 1217; 1 — стенка сосуда; 2 — эмбол в сосуде; 3 — «пустоты» в структуре эмбола

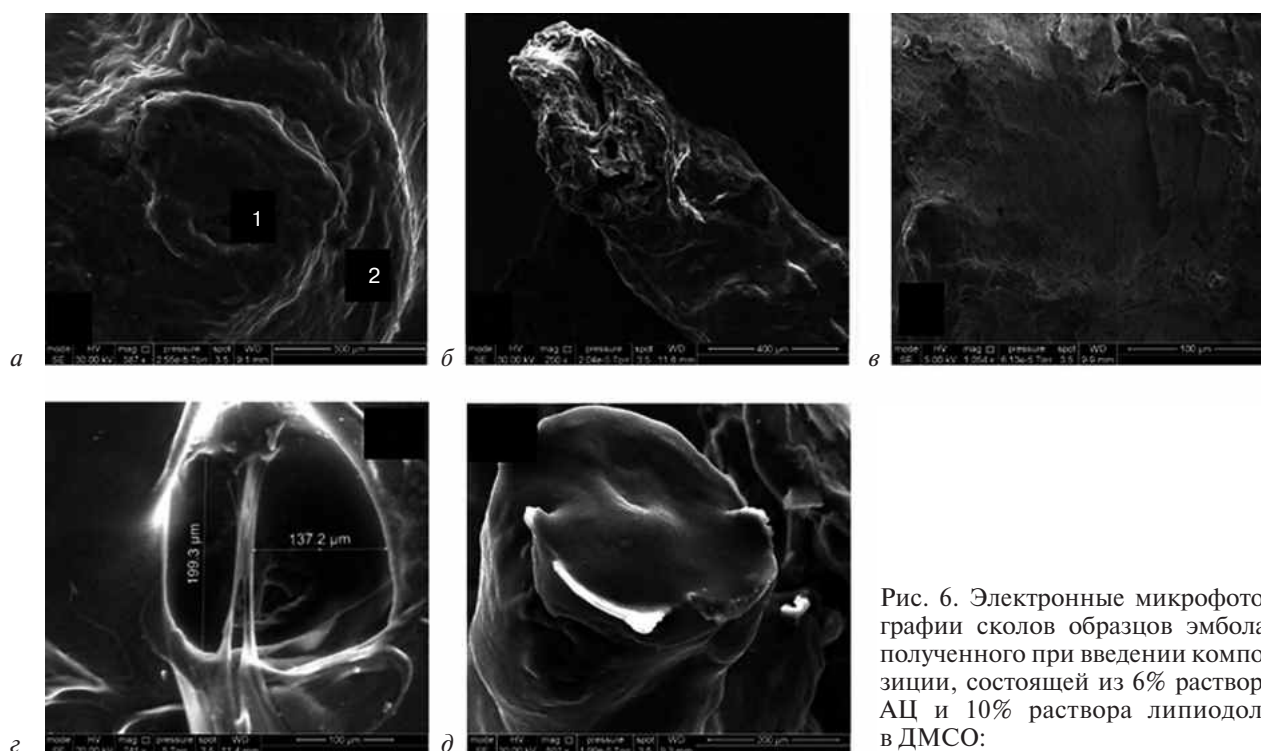


Рис. 6. Электронные микрофотографии сколов образцов эмбола, полученного при введении композиции, состоящей из 6% раствора АЦ и 10% раствора липидола в ДМСО:

а — поперечный срез эмболизированного сосуда, $\times 387$ (образец, отобранный из области голени экспериментального животного): 1 — эмбол в сосуде; 2 — периваскулярная ткань; б — скол эмболизированного сосуда, $\times 250$ (образец, отобранный из области бедра — места введения эмболизирующего состава); в — структура поверхности эмбола, $\times 1054$ (образец, отобранный из области голени); г — образец, отобранный из области бедра (место введения) с указанием размеров пор, $\times 741$; д — образец, отобранный из области ахиллова сухожилия, $\times 507$

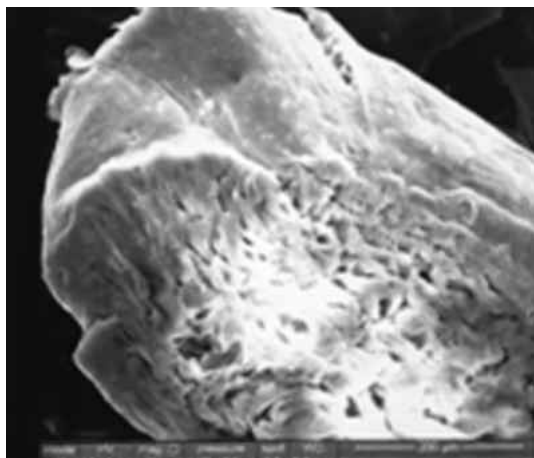


Рис. 7. Электронная микрофотография образца эмбола, полученного в условиях *in vitro*, $\times 501$

тока, в силу чего кровь смешивается с эмболизирующим составом до его превращения в твердое состояние. По микрокартине на торцевой поверхности (поверхность, контактирующая с поверхностью сосуда) образца визуализируются микропоры в виде «спрессованных» полос. Ниже по кровеносному руслу, например в районе ахиллова сухожилия, поверхность скола эмбола, в отличие от его рыхлой структуры в районе места введения, плотная, монолитная

(см. рис. 6, д). Несмотря на кажущуюся высокую пористость, эмбол плотно прилегает к сосуду, встает в распор и обеспечивает тем самым «закупорку» сосуда.

Для сравнения на рисунке 7 представлена микрофотография образца (6% АЦ), полученного в условиях *in vitro*. Видно, что поверхность образца эмбола гладкая, а поверхность скола имеет значительно меньшую пористость, что связано с отсутствием давления кровотока.

Обсуждение

Образующиеся эмболы полностью перекрывают кровотоки независимо от концентрации полимерной составляющей — АЦ (3% или 6%). Поры на поверхности имеют микроскопический размер и объясняются неровностями самих стенок сосуда, к которому плотно прилегает эмбол. Макроскопические поры внутри эмбола объясняются тем, что внутренняя структура эмбола (его пористость и плотность) зависит от концентрации полимера, рентгеноконтрастного препарата, а более всего — места введения и скорости кровотока. Однако это не влияет на эмболизирующие свойства разрабатываемых полимерных композиций в целом, структура

эмболов в период наблюдения остается неизменной в данном месте расположения по сосуду. Образующиеся эмболы гибкие, способны эмболизировать сосуды, переходить в коллатерали магистрального сосуда.

При введении эмболизирующих композиций на основе ацетата целлюлозы в разных процентных соотношениях выявлено, что лимфоидная реакция в окружающих тканях не отличается от таковой при применении Onyx™. Так же как и в случаях использования Onyx™, наблюдали неполное прилегание эмбола к стенке сосуда в ряде мест, при этом сосуд был obturated полностью.

Отличительными чертами применения ЭС на основе 6% раствора АЦ по сравнению с 3% раствором АЦ является сохранность структур, как стенки артерии, так и окружающих тканей, свидетельствующая о сохранении частичной трофики окружающих тканей, что обусловлено замедленным высвобождением ДМСО и липиодола из-за более высокой вязкости жидкого эмболизирующего компаунда. Таким образом, при увеличении концентрации полимера происходит образование более плотного эмбола.

«Негативная» реакция окружающих эмбол тканей определяется действием ДМСО. Полимерная составляющая эмболизирующих композиций, будь то сополимер этиленвинилового спирта (Onyx™) или ацетат целлюлозы, демонстрирует интактные свойства, не влияет на проявление токсичности в окружающих тканях.

При введении липиодола не было выявлено гистологических изменений, относящихся к токсическим, атрофическим повреждениям и жировой эмболии. Структура тканей оставалась сохранной на протяжении всего периода наблюдения по всей длине сосуда, что свидетельствует о возможности применения липиодола внутриартериально в составе различных композиций.

Присутствие липиодола, маслянистой жидкости, в составе эмболизирующих композиций способствует замедлению проникновения ДМСО в прилегающие ткани, тем самым нивелируется воспалительный отклик.

Рентгеноконтрастность эмбола сохраняется максимум до 3-х суток при использовании липиодола в качестве рентгеноконтрастного вещества, наибольшая контрастность рисунка наблюдается в первые часы после введения при концентрации ацетата целлюлозы 6%. В даль-

нейшем, при длительной экспозиции в сосуде эмболов, полученных из разрабатываемых композиций, требуется дополнительное применение контрастного вещества для диагностики эмболизации.

Гематологические исследования подтвердили, что вводимые препараты не оказывают токсического и фатального действия на организм в целом. Количественные показатели уровня клеточного иммунитета также свидетельствуют о нормальном функционировании иммунной системы организма. Исследование внутренних органов не показало существенного патологического влияния на организм животного при применении эмболизирующего состава. Кроме того, не было выявлено следов липиодола в легочной ткани.

Заключение

По своим эксплуатационным характеристикам, медико-биологическим свойствам композиции на основе ацетата целлюлозы демонстрируют аналогичное поведение в сравнении с известным препаратом Onyx™, а сам полимер является инертным по отношению к окружающим тканям, не токсичным и, следовательно, безопасным для применения в составе эмболизирующих средств.

Литература/References

1. Дан В.Н., Сапелькин С.В., Легонькова О.А., Цыганков В.Н., Варава А.Б., Кедик С.А. и др. Материалы и методы эндоваскулярного лечения артериовенозных мальформаций: возможности и проблемы. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2016; 19 (7): 3–11.
Dan V.N., Sapelkin S.V., Legonkova O.A., Tsygankov V.N., Varava A.B., Kedik S.A. et al. Materials and methods of arteriovenous malformations endovascular treatment: opportunities and problems. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2016; 19 (7): 3–11 (in Russ.).
2. Alluhaybi A.A., Abdulqader S.B., Altuhayni K., AlTurkstani A., Kabbani A., Ahmad M. Preoperative trans-arterial embolization of a giant scalp congenial hemangioma associated with cardiac failure in a premature newborn. *J. Intern. Med. Res.* 2020; 48 (12): 1–7.
3. Orron D.E., Bloom A.I., Neeman Z. The role of transcatheter arterial embolization in the management of nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Gastrointest. Endosc. Clin. North Am.* 2018; 28 (3): 331–49.
4. Onyx® Liquid Embolic System. Instructions for use. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf3/P030004c.pdf (accessed 21.01.2021).
5. Poursaid A., Jensen M.M., Huo E., Ghandehari H. Polymeric materials for embolic and chemoembolic applications. *J. Control. Rel.* 2016; 240: 414–33.
6. Lord J., Britton H., Spain S.G., Lewis A.L. Advancements in the development on new liquid embolic agents for use in therapeutic embolization. *J. Mat. Chem. B* 2020; 8: 8207–18.
7. Решетняк Д.В., Жаворонок Е.С., Легонькова О.А., Оганнисян А.С., Панов А.В., Кедик С.А. Современные

жидкие эмболизирующие агенты на основе полимеров: состав, свойства и области применения. Обзор. *Все материалы. Энциклопедический справочник*. 2021; 6: 3–13. DOI: 10.31044/1994-6260-2021-0-6-3-13

Reshetnyak D.V., Zhavoronok E.S., Legonkova O.A., Ogannisyan A.S., Panov A.V., Kedik S.A. Modern liquid embolizing agents based on polymers: composition, properties and fields of application (Review). *Vse Materialy. Entsiklopedicheskii Spravochnik*. 2021; 6: 3–13 (in Russ.). DOI: 10.31044/1994-6260-2021-0-6-3-13

8. Кедик С.А., Легонькова О.А., Жаворонок Е.С., Панов А.В., Асанова Л.Ю., Огаркова П.Л. и др. Композиция для эмболизации кровеносных сосудов. Патент на изобретение RU 2 723 991 C2. *Изобретения. Полезные модели. Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности*. 2020; 17.

Kedik S.A., Legonkova O.A., Zhavoronok E.S., Panov A.V., Asanova L.Yu., Ogarkova P.L. et al. Composition for embolization of blood vessels. Patent for invention RU 2 723 991 C2. *Interventions. Useful Models. Official Bulletin of the Federal Service for Intellectual Property*. 2020; 17 (in Russ.).