

ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ВЕНОЗНОЙ СТЕНКИ ПОСЛЕ РАДИОЧАСТОТНОЙ ОБЛИТЕРАЦИИ IN VIVO

Шайдаков Е.В.¹, Григорян А.Г.¹, Коржевский Д.Э.¹, Илюхин Е.А.²,
Росуховский Д.А.¹, Булатов В.Л.¹

УДК: 616.14-089.87:615.849

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

² Клиника «Медаль», Санкт-Петербург

Резюме

Проведено морфологическое и микроскопическое исследование вены после радиочастотной облитерации (РЧО) с клинически значимой реканализацией. У 10 пациентов выполнены РЧО и последующее удаление подвергнувшегося термооблитерации надфасциально расположенного сегмента вены. Средний диаметр надфасциальных участков вен составил 7 ± 1 мм. Длина удаленного участка составила 23–25 см. Участок был разделен на 3 сегмента по 7 см. Выполнена РЧО с одним, двумя и тремя циклами воздействия соответственно сегментам. Выполнено морфологическое исследование 160 срезов вены (по 5 срезов каждого сегмента и 10 контрольных препаратов). Оценка глубины повреждения с учетом толщины венозной стенки проведена по коэффициенту альтерации.

Ключевые слова: эндовенозная термооблитерация, радиочастотная облитерация, морфология, реканализация, большая подкожная вена.

Несмотря на активное применение РЧО в лечении варикозной болезни вен нижних конечностей, до сих пор отсутствуют единые представления о механизмах облитерации и абляции вен, подвергающихся этой процедуре. Согласно рекомендациям производителя РЧО проводится в стандартном режиме вне зависимости от особенностей клинической картины: два цикла воздействия в приустьевом отделе магистральной подкожной вены и по одному циклу на каждый 7-ми см сегмент вены дистальнее. В большинстве случаев техническим исходом РЧО в отдаленные сроки является абляция (фиброзная трансформация) вены. Однако возможно сохранение облитерированной вены с реканализацией ее просвета в 2–8% [1–4]. Вероятность полной фиброзной трансформации вены зависит от большого количества факторов, в том числе степени поражения венозной стенки. На сегодняшний день данные о зависимости степени такого повреждения от количества циклов воздействия отсутствуют.

Достоверно оценить морфологические изменения венозной стенки можно только после выполнения РЧО in vivo. При моделировании РЧО in vitro невозможно воспроизведение всех условий, влияющих на результат вмешательства, а именно: обжатие вены вокруг катетера при выполнении тумесцентной анестезии, эквивалентная естественной теплопроводность, наличие остаточной крови в просвете вены. Кроме того, хирургическое удаление вены для последующего проведения исследования in vitro неизбежно приводит к травматизации эндотелия

MORPHOLOGIC CHANGES OF THE VENOUS WALL AFTER RADIOFREQUENCY OBLITERATION IN VIVO

Shaidakov E.V., Grigoryan A.G., Korzhevskiy D.E., Ilyukhin E.A.,
Rosukhovskiy D.A., Bulatov V.L.

Morphological and microscopic examination of the veins after radiofrequency obliteration (RFO) with clinically significant recanalization. In 10 patients fulfilled RFO and then removing exposed thermo obliteration upperfascia located segment veins. The average diameter of veins upperfascia plots was 7 ± 1 mm. The length of the remote site was 23–25 cm. The site was divided into 3 segments by 7 cm. Made RFO with one, two or three cycles of exposure segments, respectively. Achieved morphological study vein sections 160 (sections 5 and 10 of each segment control preparations). Evaluation of the depth of damage, taking into account the thickness of the vein wall held at a rate of alteration.

Keywords: Endovenous thermal obliteration, radiofrequency obliteration, morphology, recanalization, great saphenous vein.

венозной стенки, что может исказить морфологическую картину.

Предварительное проведение РЧО на заведомо удаляемом надфасциальном венозном сегменте позволяет достоверно оценить морфологические изменения вены при сохранении оптимального плана хирургической операции (эндоваскулярная облитерация интрафасциального сегмента, удаление надфасциального). Выполнение РЧО надфасциально расположенного сегмента вены в связи с формированием плотного тяжа по внутренней поверхности бедра и гиперпигментацией кожи не рекомендуется. Такой участок целесообразно удалять, при этом он может служить субстратом для морфологических исследований без необходимости изменения плана оперативного лечения пациента [5].

Цель исследования

На основании морфологических и экспериментальных данных определить оптимальные энергетические режимы РЧО.

Задачи исследования

1. Проанализировать структурные изменения венозной стенки при ее облитерации (неполной фиброзной трансформации) и особенности неоваскулогенеза и реканализации после РЧО.
2. Сравнить морфологические изменения и глубину повреждения венозной стенки после проведения одного, двух или трех циклов РЧО.

Материалы и методы

Для оценки участков магистральных подкожной вены при клиническом рецидиве после РЧО сегменты БПВ удалялись в процессе оперативного лечения.

Анализ зоны реканализации:

1. Визуализация неоваскулогенеза, структуры венозной стенки и их взаимосвязи – микроскопия срезов.
2. Подтверждение наличия неоваскулогенеза в пристеночной зоне просвета облитерированной вены – иммуногистохимические методы.
 - 2.1. Выявление ГМК – выявление актина ГМК – AT Alpha-smooth muscle aktin, 1A4.
 - 2.2. Выявление коллагена базальных мембран – AT Collagen IV, CIV 22. Вторичные реагенты: битинилированные вторичные антитела из набора LSAB+ Dako (Дания); стрептавидин, конъюгированный с флуоресцентным красителем; индокарбоцианин (Cy-3) Invitrogen (США).
 - 2.3. Ядра клеток окрашены флуоресцентным ядерным красителем Sytox Green в концентрации 0,4 мкм.

Для фотосъемки при анализе иммуногистохимических исследований применен микроскоп Leica DM750 и фотокамера Leica ICC50 (Германия). Просмотр препаратов, обработка полученных изображений и трехмерная реконструкция клеток проведена с применением конфокального микроскопа LSM 710 и программного обеспечения ZEN 2010 (Zeiss, Германия).

Оценка морфологических изменений венозной стенки после РЧО с разным количеством циклов проводилась на базе ФГБУ НИИ «Экспериментальной Медицины» СЗО РАМН в период с 02.2012 по 03.2013 гг. Исследование одобрено локальным этическим комитетом. До начала исследования пациенты были детально осведомлены об исследовании, своих правах и обязанностях во время участия в исследовании. Перед проведением любых процедур от каждого пациента было получено подписанное и датированное им информированное согласие на участие в исследовании.

Конечная точка исследования: глубина повреждения (коэффициент альтерации) венозной стенки БПВ после 1, 2 и 3 циклов РЧО.

Критерии включения: первичная несостоятельность БПВ, наличие надфасциального участка БПВ длиной не менее 23 см и равномерный диаметр вены на всем ее протяжении. Критерии исключения: наличие вариксов по ходу надфасциального участка БПВ, извитой характер вены, перенесенные тромбофлебиты целевой вены.

Выполнены РЧО и последующее удаление подвергнувшегося термооблитерации надфасциально расположенного сегмента вены у 10 пациентов. Длина удаленного участка составила 23–25 см. Средний диаметр надфасциальных участков вен составил 7 ± 1 мм.

РЧО выполнялась на всем протяжении БПВ на бедре, в том числе в надфасциальном сегменте, который удалялся по завершении эндоваскулярного этапа операции. В процессе накожной маркировки надфасциальный уча-

сток БПВ под ультразвуковым контролем был разделен на 3 сегмента по 7 см (в соответствии с длиной рабочей части радиочастотного катетера). Это позволило провести морфологический анализ сегментов БПВ после воздействия различным количеством циклов РЧО.

Описание вмешательства

Катетер для РЧО ClosureFAST (с длиной рабочей части 7 см) проводился от дистальной точки рефлюкса по надфасциальному сегменту БПВ до сафено-фemorального соустья. Конец катетера позиционировался в 2 см от места впадения БПВ в бедренную вену. Местная тумесцентная анестезия раствором S. Lidocaini 0,05%, разведенным с помощью S. NaCl 0,9%. Объем раствора в среднем составлял 300–400 мл, из расчета 10 мл/1 см БПВ. Анестезия проводилась под постоянным ультразвуковым контролем. По ходу надфасциального участка БПВ, с целью профилактики ожогов кожи и развития парестезий раствор анестетика дополнительно вводился подкожно.

Облитерация приустьевоего отдела и интрафасциального сегмента сафеной вены проводилась в стандартном режиме в соответствии с рекомендациями производителя – 2 цикла воздействия в приустьевом отделе и далее по одному циклу. Обработка надфасциального участка сафеной вены: первый сегмент обрабатывался 1 циклом воздействия продолжительностью в 20 секунд, второй – 2 циклами воздействия (2×20 секунд), третий – 3 циклами воздействия (3×20 секунд).

По завершению процедуры выполнялись 4 прокола кожи соответственно разметке надфасциального участка целевой вены. Выведение БПВ выполнялось с помощью крючков – флебоэкстракторов и лигатур, которые использовались в качестве «держалок». Вена подтягивалась за лигатуры и последовательно удалялась. Такая технология удаления надфасциального венозного сегмента позволила минимизировать его травматизацию. Участок надфасциально расположенного варикозно измененного ствола БПВ дистальнее точки венесекции не подвергнувшийся термооблитерации удалялся по технологии мини-флебэктомии в качестве контроля. Проколы кожи ушивались монофиламентной нитью. Послеоперационный период не сопровождался парестезиями и ожогами паравазальных тканей после проведения трех циклов РЧО надфасциального участка БПВ.

Для изготовления срезов из удаленных сегментов БПВ длиной по 7 см были использованы центральные участки длиной по 2 см помещали в отдельные пробирки, фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, обезвоживали и заливали в парафин общепринятым способом. Оценка препаратов проводилась опытным экспертом вслепую (препараты были пронумерованы без указания количества циклов РЧО).

Статистический анализ

При анализе использовались методы непараметрической статистики.

Оценка достаточности объема выборки – формула Лера. Межгрупповое сравнение глубины повреждения венозной стенки с учетом изменения ее толщины по коэффициенту альтерации – парный тест Уилкоксона. Коррекция полученных уровней значимости – метод Бенъямини – Йекутили.

Результаты

1. Результаты морфологического анализа реканализированных сегментов вен после РЧО.

Выполнено по 5 срезов реканализированного венозного сегмента после РЧО от 8 пациентов. В общей сложности проанализировано 40 срезов.

При морфологическом исследовании в сегментах БПВ с реканализацией: структура венозной стенки сохранена. Просвет сегмента выполнен соединительной тканью, пронизанной сосудами различного калибра. Они представлены венулами, артериями и артериолами. Наиболее крупные сосуды преимущественно расположены по периферии просвета, вблизи венозной стенки. В сравнении с эндотелием нативной вены (контрольный препарат) эндотелий венул состоит из более крупных клеток, богатых эухроматином, что свидетельствует о его высокой функциональной активности. Крупные артерии демонстрируют спазм стенки, который морфологически проявляется в виде фестончатости стенки с выбуханием эндотелиоцитов в просвете сосуда (рисунки 1, 2, 3).

Таким образом, венозная стенка является источником неоваскулогенеза. Можно предположить, что недостаточное повреждение венозной стенки (всех ее слоев) приводит к активизации процессов репаративной регенерации интимы с формированием краевой реканализации вены подвергшейся РЧО.

2. Результаты оценки морфологических изменений венозной стенки после РЧО с разным количеством циклов воздействия.

Выполнено по 5 срезов венозного сегмента после одного, двух и трех циклов термического воздействия, а так же по 1 срезу из контрольного участка от 10 пациентов. В общей сложности проанализировано 160 срезов.

Имеющаяся выборка обеспечивает 90% мощность исследования с 5% уровнем значимости и стандартизованной разностью 0,6.

Морфологическая структура стенки БПВ без термического воздействия представлена на рисунке 4.

После 1 цикла проведения РЧО на венозную стенку определяется гомогенизация ее внутренних слоев (коагуляционный некроз). На некоторых участках глубина гомогенизации достигает середины мышечного слоя стенки (рис. 5). Наблюдается полная деэндотелизация. Медиана глубины повреждения венозной стенки составила 127,5 мкм (рис. 6).

После 2 циклов воздействия РЧО на венозную стенку гомогенизация только на некоторых участках распространяется до адвентиции и затрагивает внутреннюю

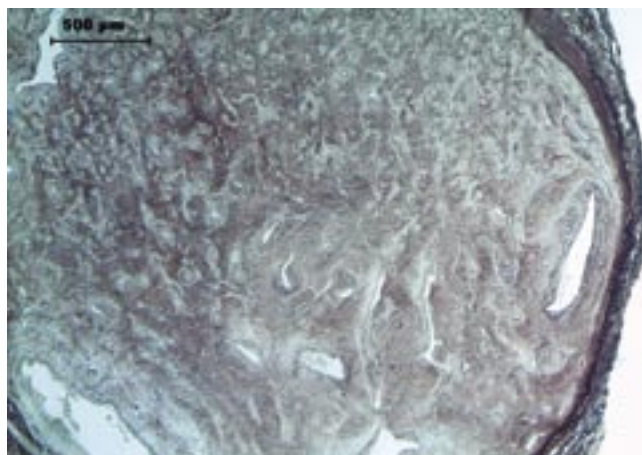


Рис. 1. Поперечный срез БПВ, реканализация через 6 месяцев после РЧО. Окраска орсеин

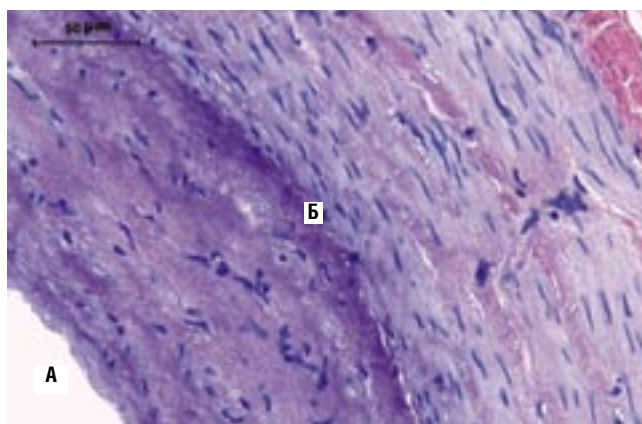


Рис. 2. Сохранение структуры венозной стенки. Окраска азур-эозин. А – просвет вены. Б – граница повреждения венозной стенки

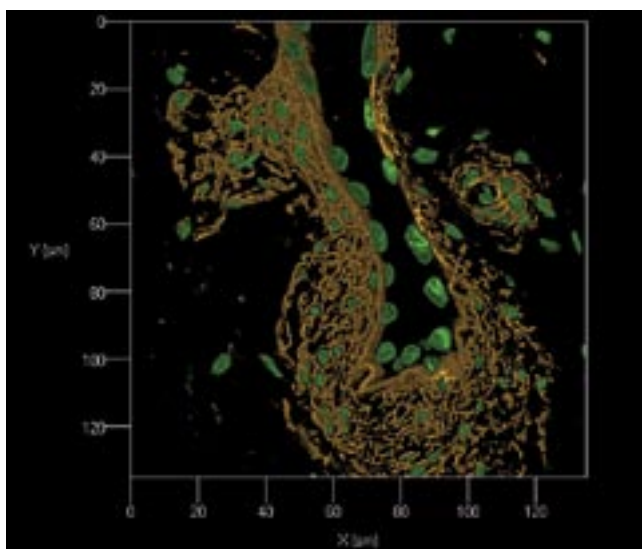


Рис. 3. Конфокальная реконструкция венулы в реканализированном сегменте БПВ. Активный неоваскулогенез – эндотелий, базальная мембрана, гладкомышечные клетки, коллаген IV типа венулы в зоне реканализации при конфокальной микроскопии

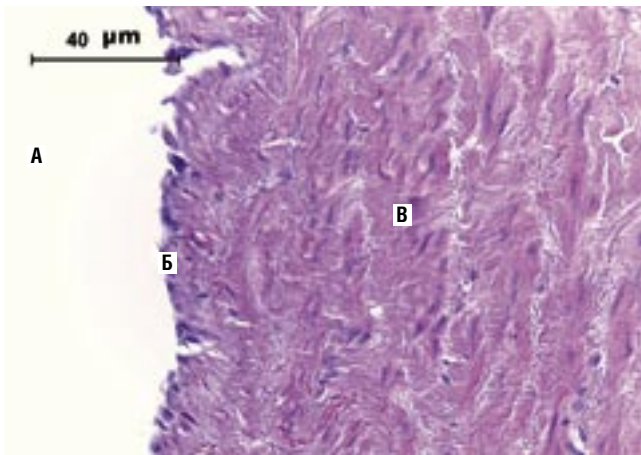


Рис. 4. Стенка варикозно измененной БПВ без воздействия (контроль). Окраска гематоксилин – эозин. А – просвет вены. Б – эндотелий. В – венозная стенка

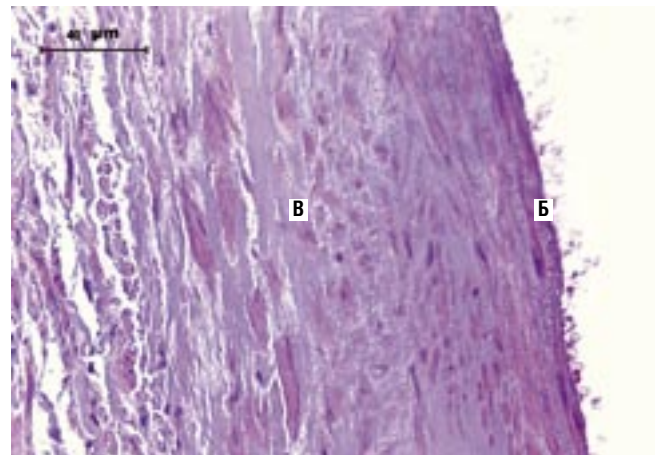


Рис. 5. Стенка БПВ после 1 цикла РЧО. Гомогенизация достигает середины мышечного слоя. Полная деэндотелизация. Окраска гематоксилин – эозин. А – просвет вены. Б – деэндотелизация. В – гомогенизация соединительной ткани до середины мышечного слоя венозной стенки

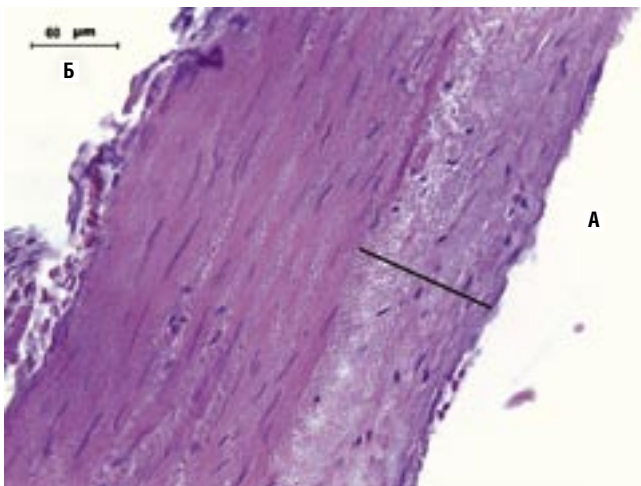


Рис. 6. Стенка БПВ после 1 цикла воздействия. Указана глубина повреждения венозной стенки. Окраска гематоксилин – эозин. А – просвет вены. Б – сторона адвентиции, линией указана глубина повреждения венозной стенки

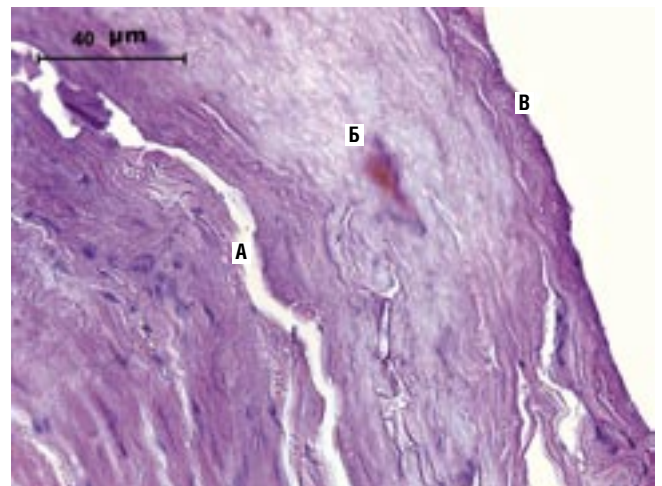


Рис. 7. Стенка БПВ после 2 циклов РЧО со стороны адвентиции. Гомогенизация всего мышечного слоя. Окраска гематоксилин – эозин. А – просвет вены, Б – деэндотелизация, В – гомогенизация соединительной ткани до внутренней оболочки

оболочку вены. Глубина поражения несколько больше, чем после одного цикла воздействия, мышечный слой поврежден практически полностью. Отмечается нарушение структуры венозной стенки в виде трещин. Медиана глубины повреждения венозной стенки составила 251,5 мкм (рис. 7, 8).

После 3 циклов воздействия РЧО на венозную стенку определяется равномерная гомогенизация всех слоев венозной стенки вплоть до адвентиции. Также отмечается базофилия межклеточного вещества и наличие структурных изменений стенки в виде трещин на всем протяжении вены (рисунки 9, 10). Такие изменения для венозной стенки после 1 цикла термического воздействия не характерны, после 2 циклов носят ограниченный характер. Медиана глубины повреждения венозной стенки составила 441,5 мкм (рис. 11).

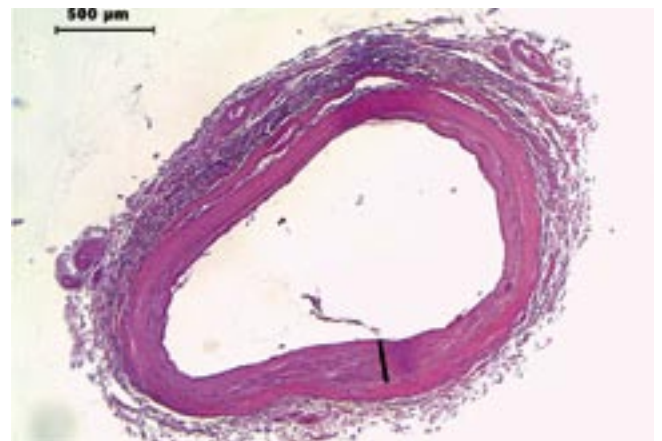


Рис. 8. БПВ после 2 циклов РЧО. Указана глубина повреждения венозной стенки. Окраска гематоксилин – эозин. Линией указана глубина повреждения венозной стенки

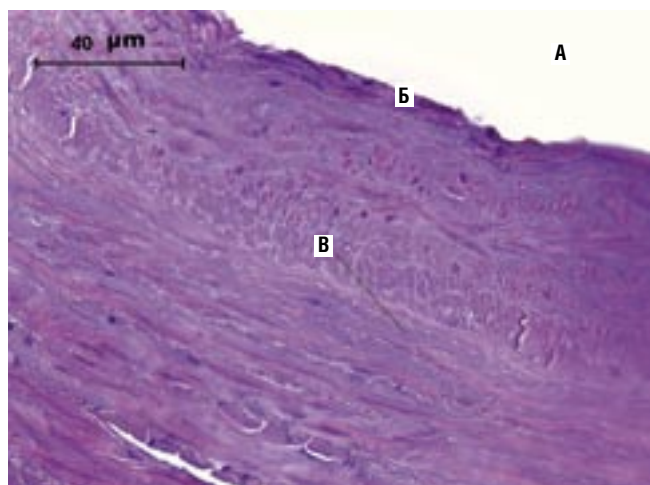


Рис. 9. Стенка БПВ после 3 циклов РЧО со стороны интимы. Гомогенизация всех слоев. Окраска гематоксилин – эозин. А – просвет вены. Б – деэндотелизация. В – базофилия

В связи с различной толщиной венозной стенки после применения разного количества циклов РЧО для сравнительного анализа глубины повреждения рассчитан коэффициент альтерации α .

$$\alpha = \frac{\text{глубины повреждения}}{\text{толщины венозной стенки}} \times 100\%$$

Сводные данные по глубине повреждения венозной стенки, ее толщины в зоне оценки и коэффициентам альтерации представлены в таблице 1.

Различия между группами по коэффициенту альтерации статистически значимы, $p < 0,005$ (парные тесты Уилкоксона). При коррекции полученных уровней значимости, различия статистически значимы $p = 0,05$ (метод Беньямини – Йекутили).

Обсуждение

В основу нашей работы легла гипотеза, что причиной неполной фиброзной трансформации вены и ее активной неоваскуляризации является недостаточное термическое повреждение всех слоев венозной стенки при стандартном однократном воздействии РЧО. При исследовании реканализованного участка БПВ нами было выявлено сохранение структуры венозной стенки и активная неоваскуляризация соединительной ткани в просвете сосуда с частичным восстановлением аксиального кровотока. Активность неоваскулогенеза максимально выражена в пристеночной зоне, что косвенно свидетельствует о ведущей роли в этом процессе сохраненной венозной стенки. Мы предполагаем, что недостаточное повреждение меди и адвентиции является основой неоваскулогенеза и ведущей причиной реканализации. Наше предположение косвенно подтверждает относительно большая частота реканализаций после проведения склерооблитерации вен, когда повреждается только интима вены. В 2013 году

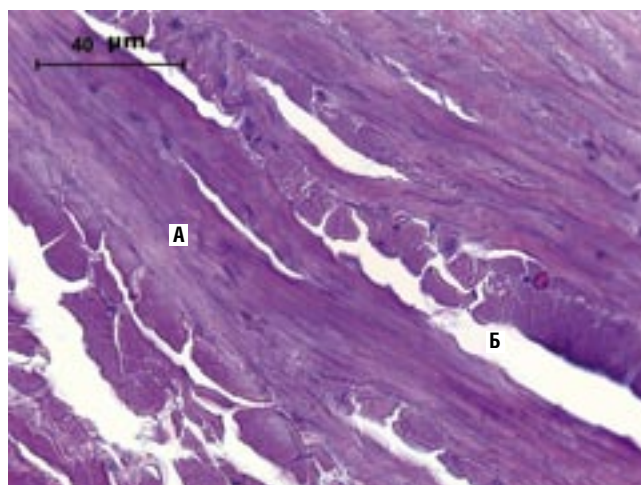


Рис. 10. Стенка БПВ после 3 циклов РЧО со стороны адвентиции. Гомогенизация всех слоев. Окраска гематоксилин – эозин. А – гомогенизация соединительной ткани до адвентиции, Б – щелевидные разрывы стенки

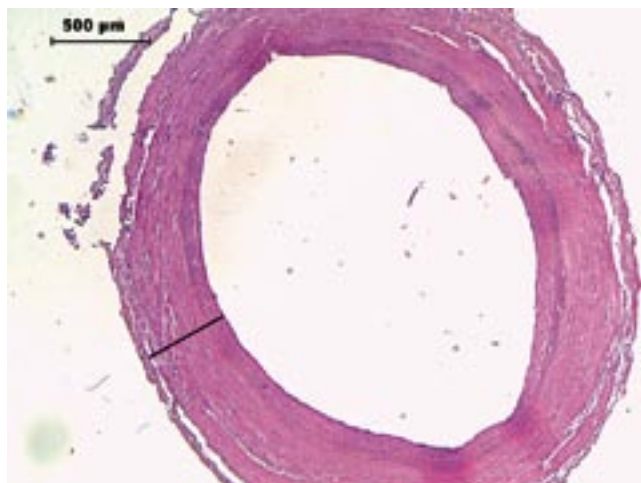


Рис. 11. БПВ после 3 циклов РЧО. Указана глубина повреждения венозной стенки. Гомогенизация всех слоев. Окраска гематоксилин – эозин. Линией указана глубина повреждения венозной стенки

Табл. 1. Показатели глубины повреждения и толщины венозной стенки после РЧО

	1 цикл РЧО	2 цикла РЧО	3 цикла РЧО
Медиана глубины повреждения венозной стенки, мкм	127,5	251,5	441,5
Значения 1 и 3 квартилей	123,75 / 130,75	229,75 / 259	436,75 / 445,25
Медиана толщины венозной стенки, мкм	485,5	481,5	480,5
Значения 1 и 3 квартилей	477,25 / 489,5	480 / 489,25	479,25 / 482,75
Коэффициент альтерации, %	26	53%	92%

были опубликованы 3-х летние результаты рандомизированного сравнительного исследования РЧО, ЭВЛО, склерооблитерации и классической флебэктомии. Частота наступления реканализации магистральной поверхностной вены на бедренном сегменте после РЧО составила 6,75%, после ЭХО-склерооблитерации составила 6,2%, различия статистически не значимы на уровне $p = 0,28$. При этом после склерооблитерации реканализация наступила в приустьевом отделе в 3% случаев в отличие от РЧО, где реканализация в приустьевом отделе зарегистрировано не было [6].

В результате морфологического исследования участков БПВ после проведения РЧО в трёх различных по интенсивности режимах выявлены статистически значимые различия в глубине повреждения венозной стенки. Глубина гомогенизации и коэффициент альтерации венозной стенки зависели от количества циклов РЧО. При проведении 1 и 2 циклов РЧО нами было отмечено неполное повреждение всех слоев венозной стенки. Три цикла РЧО привели к повреждению всех слоёв вены, включая адвентицию, без повреждения окружающих тканей. Таким образом, представляется недостаточным проведение только одного цикла термооблитерации при выполнении РЧО ClosureFAST. Полученные данные свидетельствуют о необходимости и достаточности выполнения 3 циклов термооблитерации в любом сегменте целевой вены.

Следует учесть, что влияние на глубину повреждения венозной стенки может оказать исходный диаметр вены и качество тумесцентной анестезии. В нашем исследовании диаметр надфасциальных участков вен составил 7 ± 1 мм. Целесообразно провести исследование на венах разного диаметра с целью определения зависимости степени повреждения венозной стенки от диаметра вены и количества циклов термооблитерации.

Слабостью данного исследования является фиксация результатов воздействия на стенку вены непосредственно после проведения процедуры. Для более достоверной оценки различий между режимами РЧО с различным количеством циклов воздействия необходимо провести морфологическое исследование венозной стенки в отдаленные после облитерации.

Выводы

1. Количество циклов влияет на глубину повреждения венозной стенки, один и два цикла воздействия не обеспечивают повреждение всех слоев венозной стенки, что повышает риск развития реканализации.
2. Проведение трех циклов воздействия РЧО обеспечивает равномерное повреждение всех слоев венозной стенки.

Литература

1. Creton D. и др. Radiofrequency-Powered Segmental Thermal Obliteration Carried out with the ClosureFast Procedure: Results at 1 Year // *Ann Vasc Surg.* 2010. Т. 24. № 3. С. 360–366.
2. Nesbitt C. и др. Endovenous ablation (radiofrequency and laser) and foam sclerotherapy versus conventional surgery for great saphenous vein varices (Review) // 2011. № 10. С. 6–51.
3. Proebstle T.M. и др. Three-year European follow-up of endovenous radiofrequency-powered segmental thermal ablation of the great saphenous vein with or without treatment of calf varicosities. // *J Vasc Surg.* 2011. Т. 54. № 1. С. 146–52.
4. Rasmussen L.H. и др. Randomized clinical trial comparing endovenous laser ablation, radiofrequency ablation, foam sclerotherapy and surgical stripping for great saphenous varicose veins. // *Br. J. Surg.* 2011. Т. 98. № 8. С. 1079–87.
5. Gloviczki P. и др. The care of patients with varicose veins and associated chronic venous diseases: Clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery and the American Venous Forum // *YMVA.* 2011. Т. 53. № 5. С. 2S–48S.
6. Rasmussen L. и др. Randomized clinical trial comparing endovenous laser ablation, radiofrequency ablation, foam sclerotherapy, and surgical stripping for great saphenous varicose veins with 3-year follow-up // *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.* 2013. Т. 1. № 4. С. 349–356.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Григорян Арсен Грачьевич
e-mail: grigoryan.ars@gmail.com