

Latvijas Lauksaimniecības universitātē  
Latvia University of Life Sciences and Technologies

Veterinārmedicīnas fakultātē  
Faculty of Veterinary medicine



**Aija Mālniece**

**JAUNA VEIDA AUSTAS KOMPOZĪTA MATERIĀLA AORTAS  
PROTĒZES BIOINTEGRĀCIJA SUŅA VĒDERA AORTĀ**

***BIOINTEGRATION OF A NEW TYPE WOVEN AORTIC  
PROSTHESIS FROM A COMPOSITE MATERIAL IN A DOG  
ABDOMINAL AORTA***

Promocijas darba KOPSAVILKUMS  
*Dr.med.vet.* zinātniskā grāda iegūšanai

SUMMARY  
of the doctoral thesis for the scientific degree of *Dr.med.vet.*

Jelgava  
2018

## **Promocijas darba zinātniskais vadītājs:**

### ***Scientific supervisor:***

LLU profesors *emeritus* Dr. med. vet., **Alberts Auzāns**

### **Promocijas darbs izstrādāts:**

- Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Klīniskajā un Preklīniskajā institūtā;
- Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un Antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratorijā ;
- Rīgas Stradiņa universitātes slimnīcas Patoloģijas institūtā;
- Lježas universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Morfoloģijas un Patoloģijas departamentā.

### ***Research has been carried out at the:***

- *Clinical and Preclinical Insitute of the Faculty of Veterinary medicine the Latvia University of Life Sciences and Technologies;*
- *Laboratory of Morphology of the Institute of Anatomy and Anthropology the Rīga Stradiņš University;*
- *Institute of the Pathology the Rīga Stradiņš Hospital;*
- *Department of Morphology and Pathology of the Faculty of Veterinary medicine the University of Liege.*

### **Officiālie recenzenti:**

#### ***Official reviewers:***

- Dr.med. vet., LLU profesors **Arnis Mugurevičs** (Latvijas Lauksaimniecības universitāte / *Latvia University of Life Sciences and Technologies*)
- Dr.med.vet., LLU asociētā profesore **Dace Bērziņa** (Latvijas Lauksaimniecības universitāte / *Latvia University of Life Sciences and Technologies*)
- Dr.med.vet., LVZU profesors **Alius Počkevičius** (Lietuvas Veselības Zinātņu universitāte / *Lithuanian University of Health Sciences*)

Promocijas darba izstrāde līdzfinansēta no Eiropas Savienības Sociālā Fonda projekta „Starpnozaru zinātniskās grupas izveidošana viedo tekstiliju jaunu funkcionālo īpašību attīstīšanai un integrēšanai inovatīvos izstrādājumos”, Vienošanās Nr. 2009/0198/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/148, (PVS ID 1372).

*The Doctoral thesis has been carried out in the frames of the European Social Fund co-financed project „Establishment of interdisciplinary research groups for a new functional properties of smart textiles development and integrating in innovative products”.*

*Project No. 2009/0198/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/148, (PVS ID 1372).*



Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2018. gada 28. decembrī, pulkst 12.00. LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā, K. Helmaņa ielā 8, A 300 auditorijā.

*The defense of this thesis will take place at Latvia University of Life Sciences and Technologies Faculty of Veterinary Medicine, Jelgava, K. Helmaņa Street 8, auditorium A300 on 28th of December 2018, at 12.00 p.m.*

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielajā ielā 2 un [http://llufb.llu.lv/promoc\\_darbi.html](http://llufb.llu.lv/promoc_darbi.html)

*The thesis is available at the Fundamental Library of Latvia University of Life Sciences and Technologies, Lielā street 2, Jelgava and [http://llufb.llu.lv/promoc\\_darbi.html](http://llufb.llu.lv/promoc_darbi.html)*

## SATURS / CONTENT

<b>IEVADS</b> .....	7
Darba aktualitāte .....	7
Darba hipotēze .....	8
Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes .....	8
Darba mērķis .....	8
Darba uzdevumi .....	8
Darba zinātniskā aktualitāte .....	9
Personīgais ieguldījums .....	9
Pētījuma rezultātu aprobācija/ <i>Approbation of the research results</i> .....	10
Promocijas darba apjoms un struktūra .....	11
<b>MATERIĀLS UN METODES</b> .....	12
Pētījuma vietas, laikā un objekta raksturojums .....	12
Pētījuma shēma .....	13
Eksperimentālo dzīvnieku vispārīgā veselības stāvokļa izmeklēšana un manipulācijas pirms un pēc operācijas .....	13
Operācijas tehnika .....	16
Vēdera aortas un protēzes diametra un maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē noteikšana .....	16
Dzīvnieku eitanāzija, sekcija un makroskopiska aortas protēzes un tās apvidus izmeklēšana .....	17
Eksplantēto audu mikroskopiskā izmeklēšana .....	19
Iegūto datu biometriskā apstrāde .....	23
<b>PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA</b> .....	24
Vēdera aortas protezēšanas operāciju gaitas raksturojums un iznākums ....	24
Eksperimentālo dzīvnieku vispārējais veselības stāvoklis pirms un pēcoperācijas periodā .....	25
Vēdera aortas, protēzes diametrs un maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē .....	31
Aortas un protēzes diametra izmaiņas pēcoperācijas periodā .....	31
Maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē aortas protēzē un vēdera aortā kraniāli un kaudāli no tās .....	34

Dzīvnieku sekcijas un makroskopiskās izmeklēšanas rezultāti protēzes vietā .....	36
Protēzes sienas histoloģisko izmeklējumu rezultāti .....	37
Imūnhistoķīmisko marķieru pozitīvo struktūru intensitāte protēzes sienā ..	42
<b>SECINĀJUMI</b> .....	46
<b>IETEIKUMI PRAKSEI</b> .....	47
<b>INTRODUCTION</b> .....	48
Topicality of the work .....	48
Hypothesis of the research .....	49
Research theses .....	49
The aim of the research .....	49
The objectives of the doctoral thesis .....	49
Scientific novelty of the research .....	50
Personal contribution .....	50
Structure and volume of doctoral thesis .....	50
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	51
Location and time of the research, characteristics of the research object ...	51
Scheme of the study .....	52
Examination and manipulations performed of experimental animals for evaluation of general state of health before and after surgery .....	53
Surgery Technique .....	55
Determination of diameter and the peak blood flow velocity in systole in abdominal aorta and prosthesis .....	56
Animal euthanasia, autopsy and macroscopic examination of aortic prosthesis .....	57
Microscopic examination of the explanted aortic prosthesis .....	58
Biometric processing of the obtained data .....	61
<b>RESULTS OF THE RESEARCH AND DISCUSSION</b> .....	63
Outcome of the prosthetic surgery of abdominal aorta .....	63
General state of health of experimental animals before and after the operation .....	64

Diameter of abdominal aorta and prosthesis and peak blood flow velocity in systole .....	69
Changes in the diameter of the abdominal aorta and prosthesis in the postoperative period.....	69
Peak blood flow velocity in systole in the aortic prosthesis and the abdominal aorta cranial and caudal from the prosthesis .....	71
Necropsy of the dogs and macroscopic examination of the prosthesis .....	73
Histological examination of the prosthesis .....	74
The intensity of the positive structures of the immunohistochemical markers in the prosthesis wall .....	77
<b>CONCLUSIONS</b> .....	81
<b>RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE</b> .....	82

## IEVADS

### Darba aktualitāte

Sirds un asinsvadu slimības cilvēkiem ir vienas no biežāk diagnosticētajām slimībām, kas bieži saistās ar potenciālu priekšlaicīgas nāves iestāšanos. Pie šāda veida slimībām pieder arī vēdera aortas aneirisma (vēdera aorta lokāla lūmena palielināšanās par 50%). Aortas aneirismas sastopamība dažādās cilvēku populācijās ir 4.8% (Li et al., 2013). Tās plīšanas gadījumā līdz pat 75% gadījumu var iestāties nāve, nepagūstot uzsākt operatīvu ārstēšanu (Fleming et al., 2005; Lesperance et al., 2008). Tādēļ medicīnā sevišķa uzmanība tiek fokusēta uz savlaicīgu aortas aneirismas diagnosticēšanu un ārstēšanu. Kā pamatmetode vēdera aortas aneirismas ārstēšanai joprojām tiek uzskatīta, aneirismas maisa ķirurģiska aizstāšana ar sintētiska materiāla protēzēm (Bacharach et al., 2015). Neskatoties uz ilggadīgo pieredzi sintētisko polimēru izmantošanā asinsvadu rekonstruktīvajā ķirurģijā, joprojām pēcoperācijas periodā tiek novērotas dažādas komplikācijas. Tās bieži saista ar protēzes un aortas sienu biomehānisko īpašību neatbilstību, neointīmas hiperplāzijas attīstību, protēzes deformāciju, infekciju un citām komplikācijām (Abbott et al., 1993; Kakkos et al., 2016; Sarkar et al., 2007; Vartanian & Conte, 2015). Tādēļ joprojām pasaulē zinātnieki cenšas uzlabot jau esošās, kā arī izstrādāt jaunas, inovatīvas mākslīgās asinsvadu protēzes, ar mērķi maksimāli samazināt komplikāciju sastopamību pēc implantācijas periodā. Lai klīniskajā praksē veiksmīgi ieviestu jaunas asinsvadu protēzes, kurām būtu labākas reoloģiskās un imunoloģiskās īpašības, nepieciešama šo īpašību vispusīga un kompleksa izpēte *in vivo*, izmantojot eksperimentālos dzīvniekus. Šādai eksperimentālai pārbaudei nav alternatīvu metožu *in vitro* (Byrom, Bannon, White, & C Ng, 2010; Liu, Ong, Fukunishi, Ong, & Hibino, 2018; Swartz & Andreadis, 2013).

Rīgas Tehniskajā universitātē (RTU) veidotu sintētisko asinsvadu protēžu biomehāniskās īpašības ir plaši pētītas *in vitro* (Gupta & Kasyanov, 1997; Kasyanov, Ozolanta, Kadish, Ozols, & Stradins, 2001; Kasyanov, Ozolanta, Purinya, Ozols, & V., 2003). Dažos fragmentāros pētījumos sadarbībā ar Latvijas Lauksaimniecības universitāti ir pētīta šo protēžu bioloģiskā saderība, izmantojot eksperimentālos dzīvniekus (Kanceviča, Feldmane, & Auzāns, 2004).

Latvijā iepriekš veiktajos eksperimentos *in vivo*, izmantota maza diametra asinsvadu protēzes, kas paredzētas galvenokārt perifēro asinsvadu patoloģiju novēršanai. RTU tika radīta jauna tipa kompozīta materiāla protēze maģistrālo asinsvadu, tai skaitā vēdera aortas, protezēšanai. Lai perspektīvā medicīnā izmantotu šīs inovatīvās aortas protēzes, radās akūta nepieciešamība, to vispusīgai pārbaudei, izmantojot eksperimentālos dzīvniekus.

## **Darba hipotēze**

Jauna veida aortas kompozīta materiāla sintētiskās aortas protēzes pēc to implantēšanas organismā spēj biointegrēties un nodrošināt asins apgādi ķermeņa kaudālājam daļai.

## **Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes**

1. Jaunā kompozīta poliestera un poliuretāna aortas protēze pēc implantācijas suņa vēdera aortā nodrošina normālu asins apgādi apasiņotajam reģionam un negatīvi neietekmē dzīvnieku vispārējo veselības stāvokli.
2. Aortas protēzē, pēc tās implantācijas suņa vēdera aortā, sekmīgi spēj inkorporēties dzīvnieka audi.
3. Pēc implantācijas protēzes sienā attīstās raksturīga pret sintētisko polimēru pavedieniem vērsta svešķermeņa reakcija.
4. Iekaisuma citokīnu ekspresija aortas protēzes sienā ir atkarīga no iekaisuma šūnu daudzuma un veida tajā.

## **Darba mērķis**

Promocijas darba mērķis ir pārbaudīt Rīgas Tehniskajā universitātē (RTU) izstrādātās jauna veida kompozīta poliestera un poliuretāna materiāla sintētiskās aortas protēzes biointegrācijas spējas suņu vēdera aortā.

## **Darba uzdevumi**

Mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši darba uzdevumi.

1. Izpētīt aortas protēzes radīto ietekmi uz suņu vispārējo veselības stāvokli pēc implantācijas periodā.
2. Noteikt suņu vēdera aortas un protēzes diametru un asins plūsmas ātrumu dažādos laika periodos pēc protēzes implantācijas.
3. Veikt eksplantēto protēžu makroskopisko novērtējumu un protēzes sienas mikroskopisku audu elementu analīzi.
4. Izanalizēt iekaisuma raksturojošu imūnhistoķīmisko marķieru ekspresijas intensitāti protēzes sienā.
5. Izvērtēt gludo muskuļšūnu aktivitāti un skābekļa nodrošinājumu protēzes sienas audos.
6. Noskaidrot iespējamās vēdera aortas protezēšanas komplikācijas.



## **Darba zinātniskā aktualitāte**

Pirmo reizi Latvijā veikts eksperiments par Latvijā Rīgas Tehniskajā universitātē izstrādātas un ražotas inovatīvā kompozīta sintētiska materiāla aortas protēzes biointegrāciju suņu vēdera aortā. Kā arī šajā pētījumā pielietota plaša spektra diagnostikas metodes, lai kompleksi vērtētu implantētās protēzes ietekmi uz organisma fizioloģiskajiem parametriem.

Eksperimenta rezultāti varētu kalpot kā sākuma punkts tālāku pētījumu veikšanai aortas protēžu izstrādē, testēšanā un aprobācijā izmantošanai medicīnā un veterinārmedicīnā.

## **Personīgais ieguldījums**

1. Dalība starpnozaru projektā un iepazīšanās ar pētījumā izmantotās aortas protēzes izgatavošanas tehniku.
2. Eksperimentālo dzīvnieku ikdienas uzraudzība un aprūpe visa pētījuma garumā.
3. Asistēšana visās implantācijas operācijās un dzīvnieku uzraudzība pēcoperācijas periodā.
4. Klīnisko izmeklējumu veikšana visa pētījuma garumā un paraugu iegūšana laboratorisko analīžu veikšanai.
5. Piedalīšanās visos vizuālās diagnostikas izmeklējumos.
6. Patologanatomiska orgānu un protezētā apvidus izmeklēšana.
7. Eksplantēto aortas protēžu paraugu iegūšana, makroskopiska izmeklēšana un paraugu sagatavošana histoloģiskai un imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai.
8. Histoloģisko un imūnhistoķīmisko krāsošanas metožu praktiska apgūšana un daļa preparātu sagatavošana.
9. Histoloģisko un imūnhistoķīmisko preparātu novērtēšana.
10. Klīniskās, laboratoriskās, vizuālās diagnostikas, patologanatomiskās, histoloģiskās, imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultātu apkopošana, analīze un statistiskā apstrāde.

## **Pētījuma rezultātu aprobācija/ *Approbation of the research results***

### **Zinātniskās publikācijas un tēzes/ *Scientific publikation and theses:***

1. Mālniece A., Auzāns A., Drevinska K., Logina L., Kanceviča V., Lukjančikovs A. (2012) Aortic lumen dynamics after replacing aorta abdominalis with prosthesis in dog. Starptautiskās konferences „Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes” Raksti. Jelgava. Nr. 1, 98 – 103 lpp.
2. Mālniece A., Auzāns A., Drevinska K. (2012) Aortic lumen diameter and blood pressure changes dynamics after replacing aorta abdominalis with prosthesis. Starptautiskās ikgadējas konferences raksti „Zinātne lauku attīstībai 2012”(„Research for Rural Development 2012”). Jelgava. Nr. 1, 264 – 269 lpp.
3. Mālniece A., Auzāns A., Drevinska K. (2013) Aortic lumen diameter and blood pressure changes dynamics after replacing aorta abdominalis with prosthesis. Starptautiskās ikgadējas konferences raksti „Zinātne lauku attīstībai 2012”(„Research for Rural Development 2013”). Jelgava. Nr.1, 141 – 146 pp.
4. Mālniece A., Dūrītis I., Auzāns A., Drevinska K. (2018) The Effect of Stenotic Segment of Abdominal Aorta on Blood Velocity and Systolic Blood Pressure in female Beagle Dogs. *Online Journal of Veterinary Research*, 22 (2): 129-138.
5. Mālniece A., Auzāns A. (2018) Tissue Biointegration in Polyester-Polyurethane Aortic Prosthesis in a Dog Model. 7th International Conference for Young Researchers Multidirectional Research in Agriculture, Forestry and Technology. Book of Abstracts, 15 pp.
6. Mālniece A., Auzāns A. (2018) The inflammatory reaction and the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines to a novel polyester-polyurethane aortic prosthesis evaluated in dogs at 6 and 12 months post-implantation. *Polish Journal of Veterinary Science*, 21(3/4), *Accepted*.

**Pētījuma rezultāti ziņoti šādās starptautiskās zinātniskās konferencēs/  
*The results of the research were presented at the following international scientific conferences:***

1. 18. ikgadējā starptautiskā zinātniskā konference „Research for Rural Development 2012”. Jelgava, Latvija, 16 – 18. maijs, 2012. Mālniece A., Auzāns A., Drevinska K. Aortic Lumen Diameter and Blood Pressure Changes Dynamics after Replacing Aorta Abdominalis With Prosthesis (mutisks ziņojums).
2. Starptautiskā zinātniskā konference „Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes”(„Animal. Health. Food Hygiene”). Jelgava, Latvija, 22 – 23. novembris, 2012. Mālniece A., Auzāns A., Drevinska K. Aortic Lumen Diameter Dynamics after Replacing Aorta Abdominalis with Prosthesis (mutisks ziņojums).
3. 19. ikgadējā starptautiskā zinātniskā konference „Research for Rural Development 2013”. Jelgava, Latvija, 15 – 17. maijs, 2013. Mālniece A., Auzāns A., Drevinska K. Blood Pressure and Aortic Lumen Diameter Changes after Replacing Aorta Abdominalis with Prosthesis (mutisks ziņojums).
4. 7th International Conference for Young Researchers. Multidirectional Research in Agriculture, Forestry and Technology. Krakova, Polija, 17 – 8. aprīlis, 2018. Mālniece A., Auzāns A. Tissue Biointegration in Polyester-Polyurethane Aortic Prosthesis in a Dog Model (stenda un mutisks ziņojums).

## **Promocijas darba apjoms un struktūra**

Promocijas darbs noformēts uz 127 lapaspusēm ar 62 attēliem un 11 tabulām. Promocijas darbs izkārtots astoņās nodaļās: ievads, literatūras apskats, materiāls un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, aizstāvēšanai izvirzītās tēzes, ieteikumi praksei, izmantotās literatūras saraksts (282 literatūras avoti). Darbam pievienoti 12 pielikumi.

# MATERIĀLS UN METODES

## Pētījuma vietas, laikā un objekta raksturojums

Klīniskais eksperiments tika veikts Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātē no 2011. gada 19. jūlija līdz 2012. gada 30. oktobrim. Eksperimenta veikšanai 2011. gadā saņemta Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja Nr. 28.

Pētījumā izmantoti 9 sieviešu dzimuma 1 līdz 3 gadus veci Bīglu šķirnes suņi ar ķermeņa masu no 8.50 līdz 10.75 kg, kas iegādāti no eksperimentālo dzīvnieku audzētavas Francijā. Dzīvnieki visā pētījuma laikā turēti Veterinārmedicīnas fakultātes Klīniskajā institūtā, speciāli šīm vajadzībām rekonstruētā un atbilstoši dzīvnieku labturības prasībām labiekārtotā telpā. Telpā katrs dzīvnieks atradās savā boksā. Papildus visi suņi regulāri katru dienu tika laisti ārā 64 m<sup>2</sup> lielā nožogotā pastaigu laukumā, kurā brīvi pārvietojās. Suņus divas reizes dienā baroja ar komerciāli ražotu sauso barību „Bewi Dog Basic Croc”. Barības deva tika noteikta, ņemot vērā suņu ķermeņa masu un atbilstoši ražotāja norādījumiem uz iepakojuma. Dzeramais ūdens bija pieejams *ad libitum*.

Dzīvnieku klīniska un laboratoriska izmeklēšana tika veikta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Klīniskā institūta dzīvnieku izmeklēšanas telpās (klīnikā) un laboratorijās. Histoloģisko un imūnhistoķīmisko paraugu sagatavošana un izmeklēšana tika veikta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskā institūta Morfofunkcionālajā laboratorijā, Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas institūtā un Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un Antropoloģijas institūta Morfoģijas laboratorijā. Histoloģisko preparātu novērtēšanā konsultēja arī Lježas universitātes veterinārmedicīnas fakultātes Morfoģijas un Patoloģijas departamenta speciālisti.

Promocijas darba laikā pārbaudītas Rīgas Tehniskās universitātes Biomateriālu un Biomehānikas institūta Biotekstilmateriālu zinātniskās pētniecības laboratorijā izstrādātās jaunas struktūras kompozīta materiāla aortas protēzes. Darbā testētās aortas protēzes izgatavotas, izmantojot aušanas tehnoloģiju un biosaderīgus ar apkārtējiem audiem, inertus, netoksiskus un mehāniski saderīgus poliestera un poliuretāna kompleksos pavedienus. Protēze veidota, izmantojot trīs savstarpēji sapītu slāņu dobu pinuma rakstu (Lukyanchikovs & Kantsevicha, 2010a, 2010b). Izmantojot dažāda garuma audu pavedienu pārsedes, aortā veidojas dažādu izmēru poras (no 1.0 līdz 3.0 mm), kas labāk nodrošina neorganizēto dzīvo audu ieaugšanu neorganizētā veidā. Lai uzlabotu šīs protēzes reoloģiskās īpašības, tās piesūcinātas vakuumā pie 90° C temperatūras ar bioloģiski aktīvu šķīduma kompozīciju (10–11% želatīna un 12–14% glicerīna) (Lukyanchikovs & Kantsevicha, 2010a, 2010b).

## Pētījuma shēma

Klīniskajā pētījumā izmantoti 9 sieviešu dzimuma, 1 līdz 3 gadus veci, Bīglu šķirnes suņi. Lai noskaidrotu protēzes integrācijas gaitas strukturālās (endotēlija izveide, saistaudu, gludo muskuļšūnu ieaugšana utt.) un funkcionālās (asins plūsma protēzē u.c.) izmaiņas laika griezumā, eksperimentālie dzīvnieki sagrupēti divās grupās:

- A grupā – 5 dzīvnieki, kuriem aortas protēze implantēta uz 6 mēnešiem;
- B grupā – 4 dzīvnieki, kuriem protēze implantēta uz 12 mēnešiem.

Visiem suņiem pirms aortas protēzes implantācijas veikta pilna klīniskā, laboratoriskā un vizuālā diagnostika. Abu grupu dzīvniekiem retroperitoneāli implantētas 5.00 līdz 8.00 mm diametrā un 9.0 mm līdz 20.00 mm garas inovatīvās aortas protēzes. Pēc ķirurģiskās operācijas dzīvniekiem regulāri katru dienu veikta vispārējā klīniskā izmeklēšana un 1 reizi mēnesī veikta ultrasonogrāfiska aortas protēzes izmeklēšana un mērīšana līdz pētījuma beigām. Sešiem suņiem (pieciem no A grupas, vienam no B grupas) veikta asinsspiediena mērīšana pirms operācijas un vienu reizi mēnesī sešus mēnešus pēc kārtas pēc operācijas. Pirms eitanāzijas suņiem veikta pilna klīniskā, laboratoriskā un vizuālā diagnostika.

A grupas dzīvniekus eitanizēja 6 mēnešus pēc maksīgā asinsvada implantācijas, bet B grupas – 12 mēnešus pēc operācijas. Pēc eitanāzijas veikta vēdera dobuma sekcija un inspekcija, maksīgā vēdera aortas segmenta rezekcija un paraugu ievietošana neitrālajā 10% formalīna šķīdumā. Tālāk no paraugiem sagatavoti preparāti histoloģiskai un imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai.

### **Eksperimentālo dzīvnieku vispārīgā veselības stāvokļa izmeklēšana un manipulācijas pirms un pēc operācijas**

Visi eksperimentā izmantotie dzīvnieki pēc to iegādes 1 mēnesi tika turēti karantīnā un novēroti. Dzīvniekiem pirms operācijas tika veikta pilna klīniskā izmeklēšana vadoties pēc vispār pieņemtiem principiem (Jemeljanovs, Manevičs, & Dūrītis, 2007; Mccurnin & Bassert, 2006; Nelson & Couto, 2009). Katram sunim no priekšējās vēnas (*v.cephalica humeri*) tika paņemts asins paraugs laboratoriskai izmeklēšanai.

Lai pārlicinātos, ka iekšējie orgāni ir klīniski veseli suņiem veicām vēdera dobuma ultrasonogrāfisku un krūšu un vēdera dobuma rentgenoloģisku izmeklēšanu pēc vispārpieņemtas metodikas (Mattoon & Nyland, 2014).

Visiem suņiem divpadsmit stundas pirms ķirurģiskās operācijas tika liegta barība un piecas stundas dzeramais ūdens.

Suņi īsi pirms operācijas nosvērti, noteikta ķermeņa temperatūra, elpošanas un pulsa frekvence, kas reģistrēta operācijas protokolā. Atbilstoši suņa ķermeņa masai intramuskulāri injicētas antibiotikas enrofloksacīns ('Enroxil' 5 mg 100 mL<sup>-1</sup> vai 10 mg 100 mL<sup>-1</sup>) 5 mg kg<sup>-1</sup>. Perorāli tika ievadīts nesteroīdais pretiekaisuma līdzeklis meloksikams (Loxicam) 0,2 mg kg<sup>-1</sup>. Premedikācijai izmantots 0,1 mg 100 mL<sup>-1</sup> atropīna sulfāts 0,02 mg kg<sup>-1</sup> un 1 mg 100 mL<sup>-1</sup> acepromazīna maleāts 0,1 mg kg<sup>-1</sup> ievadot intramuskulāri. Ievadnarkozei intravenozi lietots diazepams 0,5 mg 100mL<sup>-1</sup> 0,25 mg kg<sup>-1</sup> un 10 mg 100 mL<sup>-1</sup> ketamīns 10 mg kg<sup>-1</sup>. Operācijas laikā nodrošināta inhalācijas narkoze ar izoflurānu.

Atbilstoši dzīvnieka ķermeņa masai, pēc operācijas visiem suņiem septiņas dienas lietots 5 mg 100mL<sup>-1</sup> vai 10 mg 100mL<sup>-1</sup> enrofloksacīns 5 mg kg<sup>-1</sup> un perorāli ievadīts meloksikams. Piecas dienas lietots arī tramadola hidrohlorīds "Tramadol" 4 mg kg<sup>-1</sup> 2 – 3 reizes dienā. Divas reizes dienā veikta brūces apkopšana ar 3 mg 100 mL<sup>-1</sup> ūdeņraža pārskābi vai nātrija hlorīda 0,9 mg 100 mL<sup>-1</sup> šķīdumu, vai povidonajoda šķīdumu. Pēc 14 dienām izņemtas šuves.

Pēcoperācijas perioda pirmajā nedēļā katrs dzīvnieks regulāri divas reizes dienā tika vispārēji klīniski izmeklēts. Pēc tam vispārējā klīniskā izmeklēšana veikta regulāri reizi dienā. Vērtēti šādi parametri: dzīvnieka stāvoklis telpā, temperaments, ēstgriba, dzertgriba, defekācija, urinācija, ķermeņa temperatūra, elpošanas frekvence, sirdsdarbības frekvence, gļotādas, kapilāru pildīšanās laiks. Lai novērtētu, vai implantētās aortas protēzes ietekmē kustību aktivitāti un amplitūdu, tās regulāri vērtētas, īpaši ķermeņa aiz mugurējā daļā un pakaklājās.

### **Asins paraugu izmeklēšana**

Asins paraugi, ievērojot aseptikas principus, tika iegūti no priekškājas – pleca zemādas vēnas (v. *cephelica humeri*). Hematoloģiskai izmeklēšanai 2 mL asiņu iepildīti stobriņā „Standart Monovette”, kas satur antikoagulantu EDTA. Bioķīmiskai izmeklēšanai 3–5 mL asiņu iepildīti „Standart Monovette Serum” stobriņā. Stobriņi marķēti un uzglabāti ledusskapī ne ilgāk par 4 stundām līdz izmeklēšanai.

Hematoloģiskā asins parauga izmeklēšana veikta ar Mindray firmas iekārtu “BC – 2800Vet autohematology analyzer”. Noteikti sekojoši parametri: kopējais leikocītu skaits 10<sup>12</sup> L<sup>-1</sup>, kopējais eritrocītu skaits (RBC)10<sup>12</sup> L<sup>-1</sup>, hemoglobīna saturs (HGB) g L<sup>-1</sup>, hematokrīts (HCT) %, vidējais eritrocīta tilpums (MCV) fl, vidējais hemoglobīna saturs eritrocītā (MCH) pg, vidējā hemoglobīna koncentrācija eritrocītos (MCHC) g L<sup>-1</sup>, trombocītu skaits (PLT)10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>, trombocitokrīts PCT,%. Leikocitārā formula noteikta, mikroskopējot Klīniskā institūta laboratorijā sagatavotu un ar „Diff Quik” krāsām krāsotu asins parauga uztriepi.

Asins seruma bioķīmiskā analīze veikta ar firmas Johnson & Johnson company Orth–Clinical Diagnostics iekārtu „Vitros Chemistry System DT6011”. Eksperimentālo dzīvnieku vispārējā veselības stāvokļa kontrolei pirms un pēcoperācijas periodā noteikti šādi rādītāji – urīnviela, kreatinīns, kopējais bilirubīns, kopējais proteīns, albumīns, ALAT, ASAT, sārmainā fosfatāze, alfa–amilāze.

### **Rentgenoloģiska un ultrasonogrāfiska dzīvnieku izmeklēšana**

Pirms aortas protēzes implantācijas un pirms eitanāzijas suņiem veicām vēdera dobuma ultrasonogrāfisku izmeklēšanu pēc vispār pieņemtās metodikas (Mattoon & Nyland, 2014), izmantojot iekārtu PHILIPS HD 11 ultrasound system (Modeļa Nr.:MCMD02AA, ražota Sronno,Itālija) ar 3.5 līdz 7.5 MHz sektoriālo zondi.

Pirms aortas protēzes implantācijas un pirms eitanāzijas veicām arī suņu rentgenoloģisku izmeklēšanu ar iekārtu „PHILIPS COSMOS BS”. Rentgenuzņēmumi uzņemti vispārējai krūšu kurvja un vēdera dobuma orgānu veselības stāvokļa izmeklēšanai. Uzņēmām krūšu kurvja un vēdera dobuma rentgena uzņēmumus katram sunim laterālajā (sānu) un dorso–ventrālajā (muguras) guļā. Krūšu kurvja rentgenogrammu veica, izmantojot 48 kV un 3.20 mAs lielus parametrus un vēdera dobuma rentgenogrammu – 46 kV un 5.00 mAs (Thrall, 2013).

### **Asinsspiediena mērīšana eksperimentālajiem dzīvniekiem**

Sistoliskais un diastoliskais asinsspiediens mērīts, izmantojot High Definition Oscillometry (HDO) ierīci. Dzīvnieks novietots tam ērtā pozīcijā klusā telpā, nogaidītas piecas minūtes, lai suns pierod pie jauniekiem apstākļiem, tā samazinot stresa ietekmi uz asinsspiediena mērījumu rezultātiem. Mērījumi iegūti, izmantojot pirmā izmēra suņu manšeti (kā norādīts ierīcei pievienotajā pamācībā), to apliekot ap astes pamatni. Mērīšanas laikā ķermeņa daļa, kurai aplikta manšete, atradās +/- 10 cm vienā līmenī ar sirdi (Egner, Carr, & Brown, 2007). Vienā mērīšanas reizē veikti pieci mērījumi un aprēķināts vidējais rādītājs, kas tālāk izmantots aprēķinos. Asinsspiediena mērījumi noteikti pirms protezēšanas un reizi mēnesī 6 mēnešus pēc tās.

## Operācijas tehnika

Vēdera aortas piekļuvei operācijas laikā izmantota retroperitoneāla pieeja. Dzīvnieks uz operācijas galdā novietots labajā laterālajā guļā. Atbilstoši aseptikas principiem sagatavots operācijas laukums sākot no pēdējo ribu apvidus līdz gūžas locītavas līmenim un no jostas skriemeļu mugurizaugumiem līdz baltajai līnijai. Veikts horizontāls 10–12 cm garš grieziens paralēli jostas skriemeļiem zem muguras garā muskuļa (*m. longissimus dorsi*), kaudāli no kreisās pēdējās ribas, pāršķeļot ādu, vēdera iekšējo slīpo muskuli (*m. obliquus internus abdominis*), vēdera šķērsmuskuli (*m. transversus abdominis*). Nepārgriežot vēderplēvi, no apkārtējiem saistaudiem atpreparēts vidēji 5.00–6.00 cm garš vēdera aortas segments. Manipulācijas ar vēdera aortu veiktas tās viduspunktā starp nieru artēriju (*aa. renales*) atzarošanās vietu un vēdera aortas bifurkāciju. Lai pārtrauktu asinsriti paredzētajā aortas segmentā uz aortas tika uzliktas divas speciāli šim nolūkam paredzētas klemmes aptuveni 3.00–4.00 cm attālumā viena no otras. Tālāk tika veikts grieziens vēdera aortā, to šķērsām pārdalot, un rezekcēta tās daļa. Pēc tam izņemtā vēdera aortas segmenta vietā implantēta testējamā aortas protēze un pēc tam noņemtas klemmes.

Implantētās protēzes diametrs A grupā diviem suņiem bija 5.00 mm un trijiem 8.00 mm, bet B grupā visiem suņiem 5.00 mm. Implantētās protēzes garums bija no 9.00 mm līdz 20.00 mm. Protēzes diametrs tika pielāgots rezekcētās aortas galu diametram. Aortas protēžu šūšanai izmantoti monofili neuzsūcošie diegi 7/0 “Premilene” un nepārtrauktā šuve. Muskuļu un zemādas šūšanai izmantoti pīti uzsūcošie diegi – 2/0 “Serafit” un audi savienoti, izmantojot attiecīgi mezglu šuves un zemādas matračšuvi. Āda šūta ar monofilu neuzsūcošu diegu 3/0 “Supramide”, izmantojot mezglu šuves. Ir jāatzīmē, ka aortas protezēšanas operācijas suņiem tika veiktas sadarbībā ar medicīnas mikroķirurģijas speciālistu.

### **Vēdera aortas un protēzes diametra un maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē noteikšana**

Vēdera aortas un tās protēzes diametrs, kā arī asins plūsmas ātrums tika noteikts ultrasonogrāfiski jostas skriemeļu apvidū. Dzīvniekiem pirms minētās manipulācijas intramuskulāri ievadīts acepromazīna maleāts 0,1 mg uz 1 kg ķermeņa masas, lai tie būtu mierīgāki, tādējādi atvieglot izmeklēšanu. Suņi ultrasonogrāfijas laikā novietoti labajā laterālajā guļā, un mērījumu veikšanai sagatavots laukums, nocērpot apmatojumu kaudāli aiz ribu loka un ventrāli no muguras garajiem muskuļiem 10x20 cm laukumā. Ultrasonogrāfiskie izmeklējumi veikti, izmantojot ultraskaņas iekārtu PHILIPS HD 11 ultrasound system (modeļa Nr.:MCMD02AA, ražota Sronno, Itālijā) ar 3.5 līdz 7.5 MHz



lineāro zondi. Pirms aortas protēzes implantācijas vēdera aortas diametrs mērīts vienā punktā – pa vidu starp nieru artērijas atzarošanās vietu un vēdera aortas bifurkāciju. Pēc vēdera aortas protezēšanas diametrs mērīts trīs punktos – vēdera aortā kraniāli no protēzes, protēzes vidusdaļā un kaudāli no protēzes (1. attēls). Mērot vēdera aortas un tās protēzes diametru šķērsgriezumā, kursorus visos gadījumos novietoja aortas un protēzes sienas vidū. Diametra mērījumi veikti sistoles laikā, izmantojot 2D režīmu, un rezultāti izteikti milimetros. Maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē vēdera aortā pirms protēzes implantācijas noteikts vienā punktā – pa vidu starp nieru artērijas atzarošanās vietu un vēdera aortas bifurkāciju. Pēc vēdera aortas protezēšanas maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē arī mērīts trīs punktos – vēdera aortā kraniāli no protēzes, protēzes vidusdaļā un kaudāli no protēzes (1. attēls). Maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē noteikšanai izmantota pulsa viļņa doplerogrāfija (*Pulse Wave doppler*) reālā laikā *B-mode* režīmā un plūsmas ātrums noteikts centimetros sekundē. Maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē mērīšanas brīdī tika veikta zondes leņķa korekcija paralēli asins plūsmas garenasij (Bonagura & Fuentes, 2015). Katram dzīvniekam mērīti trīs reprezentatīvi, brīvi izvēlēti maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē viļņi, un noteikts vidējais rādītājs, kas tālāk izmantots aprēķinos. Vēdera aortas un tās protēzes diametra un maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē mērījumi noteikti pirms protezēšanas un reizi mēnesī pēc tās līdz eksperimenta beigām.

## **Dzīvnieku eitanāzija, sekcija un makroskopiska aortas protēzes un tās apvidus izmeklēšana**

Visus A grupas dzīvniekus eitanizēja 6 mēnešus pēc aortas protēzes implantācijas, B grupas dzīvniekus – pēc 12 mēnešiem. Pirms eitanizācijas suņiem veikta pilna klīniskā izmeklēšana, asins paraugu noņemšana un analīze, ultrasonogrāfiskie un rentgenoloģiskie izmeklējumi atbilstoši iepriekš aprakstītajai metodikai.

Pilnā narkozē (skat. sadaļā Eksperimentālo dzīvnieku vispārīgā veselības stāvokļa izmeklēšana un manipulācijas pirms un pēc operācijas) suņi eitanizēti ar līdzekli “Dorminal” (aktīvā viela – Na pentobarbitāls) 200 mg kg<sup>-1</sup>, ievadot to intravenozi, atbilstoši dzīvnieka ķermeņa masai.

Pēc nāves tika veikta nepilna patoloģiskā sekcija. Veikta aortas protēzes eksplantācija, iekļaujot vēdera aortas posmu kraniāli un kaudāli no protēzes. Uzgriežot eksplantēto protēzes posmu, pēc Ueberrueck et al. (2005) metodikas, vērtēta protēzes lūmena caurejamība, neointīmas formēšanās intensitāte, saistaudu kapsulas veidošanās intensitāte, saaugumi, jaunveidojumi, aortas implanta iespējamās deformācijas.



Eksplantētā aortas protēze vērtēta pēc šādas shēmas:

- 1) Protēzes lūmens:
  - protēzes lūmens brīvs;
  - protēzes lūmens daļēji nosprostoļies (neointīmas hiperplāzijas, trombu vai citu faktoru dēļ);
  - protēzes lūmens pilnīgi nosprostoļies (neointīmas hiperplāzijas, trombu vai citu faktoru dēļ).
- 2) Neointīmas formēšanās pakāpe:
  - neointīma sedz visu protēzes lūmena virsmu;
  - neointīma daļēji sedz protēzes lūmena virsmu.
- 3) Saistaudu kapsulas veidošanās:
  - saistaudu kapsula pilnīgi apņem protēzi, izteikta saistaudu formēšanās;
  - saistaudu kapsula pilnīgi apņem protēzi, vidēji izteikta saistaudu formēšanās;
  - saistaudu kapsula daļēji apņem protēzi, vāji izteikta saistaudu formēšanās (Ueberrueck et al., 2005).

Protēzes lūmena diametrs, garums, protēzes sienas biezums mērīts, izmantojot elektronisko bīdmēru LIMIT (precizitāte 0.01 mm). Paņemti paraugi histoloģiskai un imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai, kas tūlīt pēc to rezekcijas ievietoti 10mg 100mL<sup>-1</sup>neitrālajā formalīna šķīdumā.

## **Eksplantēto audu mikroskopiskā izmeklēšana**

### **Audu sagatavošana mikroskopiskai izmeklēšanai**

Mikroskopiskai izmeklēšanai no katra suņa tika iegūts viens sākotnējais paraugs, kas ievietots 10 mg 100mL<sup>-1</sup>neitrālajā formalīna šķīdumā ne mazāk kā 4 dienas istabas temperatūrā. Pēc tam tas protēzes vidū šķērsām pārgriezts uz pusēm, iegūstot kraniālo un kaudālu parauga daļu, kas katra sastāvēja no aortas protēzes, anastomozes un normālās vēdera aortas daļas. Katra daļa tika pārgriezta uz pusēm gareniskā virzienā. Tālāk no katra suņa viens kraniālais un viens kaudālais segments dehidratēts audu procesorā (TISSUE-TEK II) un ieslēgts parafīna blokos, izmantojot standartizētu audu histoloģiskās sagatavošanas procedūru (Kiernan, 2008), tā lai asinsvada abas garenvirziena malas būtu pie parafīna bloka griežamās virsmas. Kopā parafīna blokos ieslēgti 18 audu paraugi no eksperimenta suņiem. Tālāk no katra ieslēgtā paraudziņa tika iegūti 5 μm biezi griezumumi, izmantojot mikrotomu SLEE CUT 5062 un ievietoti siltā ūdens vannā. Tālāk audu griezumumi tika uzpeldināti uz attaukotiem priekšmetstikliņiem (divi griezumumi uz katra priekšmetstikliņa) un žāvēti 38 °C temperatūrā 24 h.

## **Histoloģiska preparātu izmeklēšana**

Vispārējai histoloģiskai pārskata ainas, iekaisuma šūnu un saistaudu infiltrācijas pakāpes novērtēšanai izmantotas hematokselīna un eozīna (H&E) un Van Gieson krāsošanas metodes. Visiem suņiem ar katru metodi krāsoti divi preparāti no kraniālās un kaudālās parauga daļas. Audu paraugi krāsoti pēc vispār pieņemtiem H&E, Van Gieson krāsošanas protokoliem (Kiernan, 2008). Kopā histoloģiskai izmeklēšanai sagatavoti un vērtēti 144 audu griezumumi, no tiem 72 krāsoti ar Hematokselīnu un Eozīnu un 72 audu preparāti ar Van Gieson metodi.

Histoloģiskie preparāti izmeklēti, izmantojot multifunkcionālu gaismas mikroskopu Leica CTR 500 ar kameru Leica DFC 490. Mikroskopisko izmeklējumu attēlu iegūšanai un apstrādei, kā un mērījumu iegūšanai izmantota ar minēto kameru sinhronizēta datora programma Image-Pro Plus 6.1.

Sagatavotajos H&E preparātos veikta vispārēja histoloģiskā griezuma kopainas novērtēšana. Mikroskopiski vērtēta iekaisuma šūnu infiltrācija 400 reižu palielinājumā. Iekaisuma intensitāte tika noteikta kvalificēta patologanoma uzraudzībā, vadoties pēc makrofāgu, limfocītu, svešķermeņa milzu šūnu un neitrofilo leukocītu infiltrācijas intensitātes pakāpes un izvietojuma preparātā, attiecīgi tam piešķirot balles no 1 līdz 4:

- 1 – viegls iekaisums
- 2 – vidēji smags iekaisums
- 3 – smags iekaisums
- 4 – ļoti smags iekaisums

(Bellows, Wheatley, Moroz, Rosales, & Morici, 2012; Jayanth et al., 2015; Orenstein, Saberski, Kreutzer, & Novitsky, 2012; Pierce et al., 2009).

Tika veikta arī iekaisuma šūnu skaitīšana. Iekaisuma šūnas skaitītas piecos reprezentatīvos brīvi izvēlētos redzes laukos, kuru laukums bija vidēji  $71404 \pm 79.06 \mu\text{m}^2$ . Iekaisuma šūnu vērtēšanai redzes lauki izvēlēti starp protēzes diegiem vai to tuvumā. Makrofāgi, limfocīti, svešķermeņa milzu šūnas, neitrofilie leukocīti skaitīti 400 reižu lielā palielinājumā. Katram eksperimenta indivīdam tikai noteikts savs vērtējums.

Šajos preparātos noteicām arī kapilāru ieaugšanas intensitāti protēzes vidusdaļā. Kapilāri skaitīti piecos brīvi izvēlētos redzes laukos 200 reižu palielinājumā (Bashar et al., 2002; de Valence et al., 2012; Jeschke, Hermanutz, Wolf, & Köveker, 1999). Izvērtējām arī saistaudu šūnu un šķiedru daudzumu protēzes sienā un ekstralumināli.

Ar Van Gieson metodi krāsotajos preparātos vērtēts saistaudu raksturojums, kolagēno un elastīgo šķiedru proliferācijas un izvietojuma raksturs protēzē. Trīs līdz piecos brīvi izvēlētos redzes laukos mērīts mēdijas, intīmas un saistaudu kapsulas biezums  $\mu\text{m}$ , katrā redzes laukā veicot vismaz piecus

mērtījumus, līdzīgi kā citos pētījumos (Jeschke 1999, Valence 2012). Mēdijas biežums mērīts 10 reižu palielinājumā vēdera aortā kraniāli no protēzes, kaudāli no protēzes, kraniālajā un kaudālajā protēzes – vēdera aortas anastomoze, kā arī pašā sintētiskajā protēzē. Intīma un saistaudu kapsula, mērīta analogās vietās kā mēdija, izmantojot 400 reižu palielinājumu. Mēdijas biežums aortā un anastomozes vietā mērīts kā distance starp visvairāk iekšpusē izveidojušos elastīna kārtu un visvairāk ārpusē izveidojušos elastīna kārtu mēdijā. Mēdijas biežums protēzes apvidū mērīts kā distance starp protēzes neointīmas robežu un saistaudu kapsulas tuvāk protēzei vērsto virsmu (Bashar 2002). Neointīmas biežums protēzes vidū mērīts kā attālums no neointīmas virsmas līdz protēzes virsmai (Zippel et al., 2008). Lai izslēgtu histoloģiskā griezumā plaknes ietekmi uz mēdijas un intīmas biežumu, mērtījumi izteikti arī procentos.

### **Imūnhistoķīmiskā preparātu izmeklēšana**

Imūnreaktīvo struktūru noteikšanai paredzētie audu griezumī tika uzpeldināti uz silikonizētiem priekšmetstikliņiem (Histo Bond®), lai nodrošinātu labāku audu saķeri ar priekšmetstikliņu reakcijas laikā. Pēc tam iegūtie preparāti žāvēti 12 h 44°C temperatūrā.

### **Pētījumā audos noteiktas šādas imūnreaktīvās struktūras:**

- 1) Gludo muskuļšūnu aktīns (Dako Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4, kods M0851; DacoCytomation, Dānija) neointīmas šūnu proliferācijas identificēšanai.
- 2) Interleikīna 1 receptoru antagonīts (IL1 ra (Q-19)): sc-8481, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Amerikas Savienotās Valstis), lai identificētu citokīnu IL 1 $\alpha$  un IL1  $\beta$  intensitāti, jo IL1 ra saistās ar abiem iepriekšminētajiem interleikīniem.
- 3) Audzēja nekrozes factors  $\alpha$  (Rabbit polyclonal to TNF- $\alpha$  antibody, nr. orb7100, Biorbyt, Anglija), lai noteiktu viena no spēcīgāko iekaisuma citokīna klātbūtni aortas protēzes apvidū.
- 4) Interleikīnu 10 (Rabbit polyclonal to IL10 antibody, nr.orb100193, Biorbyt, Anglija), lai novērtētu pretiekaisuma citokīna, kas veicina sklerotizāciju, intensitāti audos.
- 5) Asinsvadu endotēlija augšanas faktors (Rabbit polyclonal to VEGF antibody, nr. orb11554, Biorbyt, Anglija), lai spriestu par išēmiju, revaskularizāciju konkrētajos audos.

Šūnu identificēšanai tika izmantota universālā streptavidīna – biofīna metode un lietots šim nolūkam paredzēts reaģentu komplekts (LSAB+ System–HRP, Dako, K0679, Daco Cytomation, Dānija) (Boenish et al., 2001). Sākumā tika veikta preparātu deparafinizācija un hidratācija spirtu rindā, pēc tam

preparāti skaloti ar TBS buferšķīdumu (Tris Buffered Saline, pH 9,0, Dako, S3001) 10 min. Tālāk preparāti ievietoti konteinerī ar buferšķīdumu Target Retrieval solution, pH 9, Dako S2367 un divas reizes sildīti izmantojot mikroviļņus (kopā 5 min, 450 W), epitopu atbrīvošanai, tādējādi labākai antivielas piesaistei antigēnam. Pēc sildīšanas preparāti atdzesēti 30 min un skaloti divas reizes pa 5 min ar TBS buferšķīdumu. Pēc tam katrs audu griezums apstrādāts ar 150 µL 3mg 100 mL<sup>-1</sup> ūdeņraža peroksīdu (Peroxidase Block, Dako, K0679) un izturēts 10 min istabas temperatūrā. Tālāk preparāti noskaloti ar destilētu ūdeni, nosusināti, un uz katra griezuma uznestas primārās antivielas, kas izturētas 30 vai 60 min, vadoties pēc ražotāja norādījumiem. Primāro antivielu izmatotie titri un inkubācijas laiks redzami tabulā 1. Antivielu atšķaidīšanai izmantots speciāls šim nolūkam paredzēts šķīdums – Dako Antibody Diluent, S0809. Pēc primāro antivielu inkubācijas preparātus skaloja, izturot TBS buferšķīdumā divas reizes pa 5 min. Tālāk uz audu griezumiem uznestas ar biotīnu saistītās sekundārās antivielas (LSAB+ System–HRP komplekta Biotinylated link, Dako, K0679) uz 30 min. Tālāk preparātus skaloja ar TBS buferšķīdumu 5 min un uztriepa streptavidīnu (LSAB+System–HRP komplekta Streptavidin–HRP, Dako, K0679), ko inkubēja 30 min, pēc tam priekšmetstikliņi skaloti ar TBS buferšķīdumu 5 min. Tālāk antivielas – antigēna kompleksa vizualizēšanai uz audu griezuma tika aplicēta hromogēna sistēma (20 µL DAB Chromogen + 1mL DAB+ Substrate buffer šķīdums, Dako, K0679), kas pēc tam noskalota ar krāna ūdeni. Noslēgumā šūnu kodoli iekrāsoti ar Haris hematoksēlīnu (2–3 min). Preparātos pozitīvās struktūras vizualizējās brūnā krāsā šūnu kodolos, citoplazmā vai starpšūnu telpā.

1. tabula/Table 1

**Imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai izmantoto antivielu titrs un inkubācijas laiks/  
Antibody incubation time and titre used for immunohistochemical testing**

<b>Antivielas nosaukums/ Title of antibodies</b>	<b>Titrs/ Titre</b>	<b>Inkubācijas laiks, min/ incubation time, min</b>
Gludo muskuļšūnu aktīns (Dako Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4)	1:100	30
Interleikīna 1 receptoru antagonists (IL - 1 ra (Q-19))	1 :50	30
Audzēja nekrozes factors α (Rabbit polyclonal to TNF-α)	1:50	30
Interleikīns 10 (Rabbit polyclonal to IL 10)	1:50	30
Asinsvadu endotēlija augšanas factors (Rabbit polyclonal to VEGF)	1:60	30

Kā negatīvā kontrole tika izmantoti identiski audu paraugi, kuriem, veicot iepriekš aprakstīto imunohistoķīmisko procedūru, primārās antivielas vietā tika izmantots antivielu atšķaidītājs (Dako Antibody Diluent, S0809) bez primārās antivielas.

Ar imūnhistoķīmisko metodi izmeklētajos paraugos, pozitīvās struktūras identificētas, un to relatīvais daudzums noteikts, izmantojot puskvantitatīvo skaitīšanas metodi pēc M. Pilmanes.

Pozitīvo struktūru intensitāte noteikta, izmantojot šādu gradāciju:

- (-) – nav pozitīvo struktūru redzes laukā;
  - (+) – nedaudz pozitīvo struktūru redzes laukā;
  - (++) – vidējs daudzums pozitīvo struktūru redzes laukā;
  - (+++)
  - (++++)
- ļoti daudz pozitīvo struktūru redzes laukā (Pilmane et al., 1998)

Kopā imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai tika sagatavoti un analizēti 90 audu preparāti.

## **Iegūto datu biometriskā apstrāde**

Iegūtos datu statistiskā apstrāde veikta izmantojot, programmas Microsoft Exel un SPSS (Version 23). Visiem datiem veikta to aprakstošās statistikas kalkulācija (minimālā un maksimālā vērtība, vidējā vērtība, standartnovirze, standartklūda, mediāna). Fizioloģisko parametru, asins laboratorisko izmeklējumu rezultātu, ultrasonogrāfiskās izmeklēšanas rezultātu (vēdera aortas un protēzes lūmena diametra, asins plūsmas ātruma) salīdzināšanai pirms aortas protēzes implantācijas un pēc tās izmantota Vilkoksona T – kritērija metode (Wilcoxon test), bet rezultātu salīdzināšanai starp grupām, izmatots Mann–Whitney Tests. Audu mikroskopiskās izmeklēšanas rezultātu salīdzināšanai starp 6 un 12 mēnešu grupām izmantos Mann–Whitney Tests. Atšķirības uzskatītas par būtiskām, ja  $p < 0.05$  (Arhipova & Bāliņa, 2006).

Veikta korelācijas analīze, lai noskaidrotu dažādu iegūto parametru atkarību vienam no otra. Pīrsona korelācijas koeficienta r interpretācija veikta pēc šādas skalas (Evans, 1996).

- 0.0 – 0.19 "ļoti vāja"
- 0.20 – 0.39 "vāja"
- 0.40 – 0.59 "vidēja"
- 0.60 – 0.79 "spēcīga"
- 0.80 – 1.0 "ļoti spēcīgs"

## PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

### Vēdera aortas protezēšanas operāciju gaitas raksturojums un iznākums

Ekspierimenta laikā vēdera aortā deviņiem suņiem veiksmīgi tika implantētas inovatīvās aortas protēzes, izmantojot retroperitoneālo pieeju. Aortas implantācijas operācijas vidēji tika veiktas trīs stundas un 21 minūti ilgi. Īsākā no operācijām tika paveikta divās stundās un 40 minūtēs, bet garākā četrās stundās un 4 minūtēs. Visas operācijas notika bez sarežģījumiem. Pēc operācijas brūces dzīšana noritēja bez komplikācijām un ādas šuves izņemtas pēc 14 dienām.

T. Ueberrueck publicējis datus, ka vēdera aortas protezēšanas operācija cūkām, izmantojot laparotomijas piekļuvi veikta vidēji  $62.8 \pm 10.4$  minūtēs (Ueberrueck et al., 2005). Kas attiecas uz medicīnas praksi, ir noskaidrots, ka vēdera aortas rekonstrukcijas operācijas vidēji var ilgt  $198 \pm 41$  minūtes laparotomijas pieejas gadījumā un  $141 \pm 21$  minūti ilgi, izmantojot retroperitoneālo metodi (Butler et al., 1993). Šādu operāciju laikā asinsrite vēdera aortā tiek pārtraukta no  $74 \pm 13$  līdz  $104 \pm 46$  minūtēm (Butler et al., 1993).

Mūsu gadījumā išēmijas laiks (laiks, kad pārtraukta asinsrite vēdera aortā kaudāli no renālo artēriju atzariem) svārstījās robežās no 21 minūtes līdz 1 stundai 6 minūtēm, vidēji ilgstot  $41 \pm 4$  minūtes. Operācijas laikā radītā išēmija vēdera aortā suņiem neradīja būtiskas vispārējā veselības stāvokļa izmaiņas. Vienam sunim (H8J4463) eksperimenta beigās tika konstatēta palielināta loka zarna (*megacolon*), tā cēlonis, iespējams, bija saistīts ar inervācijas traucējumiem, kurus radīja salīdzinoši garais išēmijas laiks (52 minūtes) vēdera aortā, implantācijas laikā. Tomēr sunim H8J4485, kuram operācijas laikā bija visilgākais išēmijas periods (66 minūtes) vēdera aortā, šāda zarnu patoloģija netika konstatēta. Krause et al. (1997), atzīmē, ka suņiem komplikācijas biežāk rodas, ja asinsrite vēdera aortā tiek pārtraukta virs nieru artēriju atzarošanās vietas. Cilvēkiem asinsrites pārtraukšana vēdera aortā zem nieru artēriju atzarošanās vietas no 30 līdz 50 minūtēm tiek uzskatīta par drošu un nerada nieru mazspēju, kā arī paraplēģiju un parēzi, muguras smadzeņu apasiņošanas traucējumu dēļ (Gelman, 1995; Krause et al., 1997; Wahlberg et al., 2002). Mūsu pētījumā ievērojamas komplikācijas visā periodā pēcoperācijas nenovērojām. Tādēļ uzskatām, ka pēcoperācijas komplikāciju veidošanās nav atkarīga tikai no išēmijas laika garuma aortā, bet šo komplikāciju cēloņi ir multifaktoriāli un varētu ietvert gan išēmijas laiku, gan kardiovaskulārās sistēmās tolerēt spēju vēdera aortas išēmijas laikā, gan audu bojājums ķirurģiskās brūces vietā un citus faktorus.



## **Eksperimentālo dzīvnieku vispārējais veselības stāvoklis pirms un pēcoperācijas periodā**

Uzsākot eksperimentu, visi suņi tika atzīti par klīniski veselīgiem.

Vienu dienu pēc vēdera aortas operācijas, visiem dzīvniekiem tika novērota samazināta kustību aktivitāte, kas pēc mūsu domām liecināja par vieglām sāpēm, ko novēro pēc ķirurģiskas audu šķelšanas. Dzīvnieku apetīte, dzert griba, urinācija un defekācija visā pēcoperācijas periodā bija normāla, sugai raksturīga. Līdzīgu informāciju norāda arī citi pētnieki, ka vispārējās aktivitātes un kustību samazināšanās pēc ķirurģiskām operācijām suņiem ir saistīta ar sāpēm (Afshar et al., 2017; Sharkey, 2013). Aktivitātes samazināšanos vienu dienu pēc aortas protezēšanas suņiem konstatējusi arī Muste et al. (2008), savukārt cūkām minētajā pētījumā samazināta aktivitāte kā arī ēstgriba un dzertgriba ielga līdz pat nedēļai pēc aortas operācijas.

Mūsu pētījumā aktivitāte suņiem strauji atgriezās otrajā dienā pēc operācijas un tāda saglabājās līdz pētījuma beigām. Tas norāda uz veiksmīgu operāciju rezultātu un arī uz lietoto nesteroido pretiekaisuma un pretsāpju medikamentu meloksikama un tramadola efektivitāti, kas suņiem pierādīta arī citos pētījumos (Afshar et al., 2017; Minto, Rodrigues, Steagall, Monteiro, & Brandão, 2013).

Visiem suņiem abās grupās pēc aortas protēzes implantācijas kustību koordinācijas traucējumi netika konstatēti visā pētījuma laikā. Līdzīgi rezultāti iegūti arī citos asinsvadu protēžu pētījumos, kuros izmantoti suņi (Bhattacharya et al., 2000; Muste et al., 2008; Seifalian et al., 2003; Wu et al., 1997). Savukārt aitām ir novērota paraplēģija vai pakalkāju paralīze īsi pēc vēdera aortas operācijām (Beygui et al., 1999; Soula et al., 2001).

### **Fizioloģiskie rādītāji suņiem**

Visiem suņiem vidējā ķermeņa temperatūra dienā pirms aortas protēzes implantācijas bija  $38.23 \pm 0.19$  °C. Piecas minūtes pēc vēdera aortas operācijas vidējā ķermeņa temperatūra suņiem bija  $34.19 \pm 0.34$  °C (zemākā 32.8 un augstākā 36.1 °C), bet 24 stundu laikā tā normalizējās un vidēji bija  $38.30 \pm 0.18$  °C (zemākā 37.5 un augstākā 39.2 °C).

Šīs minētās izmaiņas sakrīt ar literatūrā norādītajiem datiem attiecīgās anestēzijas laikā un pēc tās suņiem mīksto audu ķirurģijas veikšanas gadījumā (Afshar et al., 2017; Fayyaz, Kerr, Dyson, & Mirakhur, 2009; Ferreira et al., 2015; Srithunyarat et al., 2016)

Turpmāk, trešajā dienā un mēnesi pēc operācijas un eitanāzijas dienā vidējā ķermeņa temperatūra attiecīgi bija  $38.42 \pm 0.09$  °C,  $38.62 \pm 0.10$  °C un  $38.38 \pm 0.11$  °C, arī individuāli visu suņu ķermeņa temperatūras svārstības šajā pētījuma laikā iekļāvās normas intervālā. Būtisku atšķirību starp A un B grupu indivīdu ķermeņa temperatūras svārstībām nenovērojām ( $p > 0.05$ ).

Cilvēkiem pēc austas poliestera protēzes izmantošanas vēdera aortas rekonstrukcijai tika novērota ķermeņa temperatūras paaugstināšanās vidēji par  $1.6 \pm 0.7$  grādiem pēc Celsija vienu līdz četras dienas pēc veiktās operācijas (Voûte et al., 2012). Mūsu pētījumā paaugstinātu ķermeņa temperatūru suņiem visā pēcimplantācijas periodā nenovērojām.

Sirds darbības frekvence visiem suņiem gan pirms, gan operācijas laikā, kā arī visā pēcoperācijas periodā bija normas intervālā. Protēzes implantācijas dienā tā vidēji bija  $107.2 \pm 8.10$  (zemākā 82, augstākā 140), bet piecas minūtes pēc aortas protēzes implantēšanas  $111.2 \pm 5.2$  (zemākā 82, augstākā 132), dienu pēc operācijas  $99.9 \pm 7.5$  (zemākā 72, augstākā 140), mēnesi pēc operācijas  $114.4 \pm 6.4$  (zemākā 80, augstākā 140) un eitanāzijas dienā  $103.1 \pm 5.5$  (zemākā 68, augstākā 124) reizes minūtē.

Fayyaz et al. (2009) suņiem izoflurāna inhalācijas anestēzijas laikā reģistrējais sirds darbības frekvenci  $119 \pm 30$  reizes minūtē un  $93 \pm 9$  minūtē pēc 30 mL kg<sup>-1</sup> asiņu zaudēšanas, kas arī pēcoperācijas periodā saglabājās normas intervālā. Normāla sirds darbības frekvence īsi pēc aortas protezēšanas operācijām, kā to norāda Gelman (1995), liecina par suņu organisma spēju kompensēt arteriālo hipotensiju.

Būtiska atšķirība starp A un B grupas dzīvnieku sirds darbības frekvences mērījumiem netika konstatēta visa pētījuma garumā ( $p > 0.05$ ).

Elpošanas frekvence visā pētījumā laikā vidēji svārstījās robežās no  $29.8 \pm 2.5$  reizēm minūtē pirms operācijas līdz  $18.2 \pm 3.7$  reizēm minūtē piecas minūtes pēc aortas protēzes implantācijas un bija  $28.7 \pm 1.7$  dienu,  $28.4 \pm 1.9$  mēnesi pēc tās, un  $27.3 \pm 3.0$  reizes minūtē eitanāzijas dienā. Visaugstākā elpošanas frekvence individuālam sunim visā pētījuma laikā nepārsniedza 40 reizes minūtē. Jāatzīmē, ka viszemākā elpošanas frekvence suņiem novērota aortas protēzes implantācijas laikā. Kā arī diviem suņiem (H9A0069 un H9D0577) ievērojami zema elpošanas frekvence bija īsi pēc operācijas, attiecīgi 7 un 8 elpošanas reizes minūtē, bet tā normalizējās un nākamajā dienā un attiecīgi bija 36 un 28 reizes minūtē.

To skaidrojam ar fizioloģisko procesu norisi anestēzijas laikā. Elpošanas frekvences samazināšanās anestēzijas laikā un īsi pēc tās ir konstatēta arī citos pētījumos un pārsvarā tiek saistīta ar anestēzijas līdzekļu supresīvo iedarbību uz elpošanas centru un asiņu cirkulatorās sistēmas funkcijām (Grimm, Lamont, Tranquilli, Greene, & Robertson, 2015).

Atšķirība starp A un B grupas dzīvnieku elpošanas frekvences mērījumiem netika konstatēta visa pētījuma garumā ( $p > 0.05$ ). Elpošanas frekvence pirms un pēcoperācijas periodā suņiem neatšķīrās ( $p > 0.05$ ).

## **Laboratorisko izmeklējumu rezultāti un novērtējums**

Iekaisuma un eritropoēzes asins analīžu rezultāti A un B grupas suņiem pirms aortas protēzes implantācijas apkopoti 2. tabulā un eksperimenta noslēgumā

3. tabulā. Konstatētais vidējais kopējais leukocītu skaits asinīs A un B grupas suņiem visā pētījuma laikā bija normas intervālā. Literatūrā arī ir dati, kuros norādīts, ka suņiem aortā implantējot poliesteru protēzes, kopējā leukocītu skaita izmaiņas 6 mēnešu laikā pēc implantācijas nebija konstatētas (Marois et al., 1997). Mūsu rezultāti ir līdzīgi ar šiem datiem, jo 6 un 12 mēnešus pēc vēdera aortas protezēšanas kopējais leukocītu skaits bija tuvs, pirms operācijas konstatētajam. Tas varētu norādīt uz to, ka suņu organisma aizsargsistēmas spēja kontrolēt un lokalizēt tiem vēdera aortā implantētās poliesteru – poliuretāna protēzes radīto iekaisuma un svešķermeņa reakciju. Savukārt cilvēkiem kopējam leukocītu skaitam, līdzīgi kā ķermeņa temperatūrai, ir tendence paaugstināties pirmo 3 dienu laikā pēc vēdera aortas operācijām, salīdzinot ar pirms operāciju rādītājiem (Galle et al., 2000; Moulakakis et al., 2013).

Analizējot stabīnkodolaino neitrofilo leukocītu skaitu eksperimenta dzīvnieku asinīs, tika konstatēta to skaita progresīva paaugstināšanās. Mēnesi pēc aortas protēzes implantācijas vidējais stabīnkodolaino leukocītu skaits paaugstinājās līdz normas intervāla augšējai robežai, bet 6 un 12 mēnešus pēc implantācijas šis radītājs pārsniedza to. Literatūrā norādīts, ka pacientiem ar garu išērijas periodu operācijas laikā, pēc tam novēro 3 reizes augstāku neitrofilo leukocītu skaitu asinīs, salīdzinot ar tiem pacientiem, kam išērijas laiks bijis īss (Gadaleta, Fantini, Silane, & Davis, 1994). Tomēr mūsu pētījumā nepierādījās išērijas ietekme uz neitrofilo leukocītu skaitu asinīs pēcoperācijas periodā.

Cilvēkiem neitrofilo leukocītu paaugstināšanās asinīs konstatēta trešajā un piektajā dienā pēc aortas rekonstruktīvām ķirurģijām (Galle et al., 2000; Ødegård et al., 2000), bet precīzu datu par neitrofilo leukocītu skaitu vēlākā pēcimplantācijas periodā mums pieejamajos avotos neizdevās atrast.

Citos pētījumos ir norādīts, ka sintētiskie protēžu materiāli spēj medītēt akūta iekaisuma procesu (Zdolsek, Eaton, & Tang, 2007), kā arī jau aortā esošs iekaisuma process (iekaisuma process, kas vērsts pret svešķermeni–protēzi) piesaista neitrofilo leukocītu migrāciju uz šo vietu, kur tie sabrūkot aktivē imūnsistēmas šūnas, kas ierosina tālāku iekaisuma kaskādes aktivāciju (Yan et al., 2016).

Mūsu gadījumā neitrofilo leukocītu paaugstināšanos asinīs suņiem 6 un 12 mēnešus pēc protēzes implantācijas vēdera aortā varētu skaidrot ar biomateriāla ietekmi uz imūnsistēmas šūnām, kā arī lokāla iekaisuma esamību protēzes sienā un protēzes sienas zemāku elasticitāti, salīdzinot ar vēdera aortas sienu, kā to norāda arī citi zinātnieki (Bhat et al., 2013; Haumer et al., 2005; Tanındı, Erkan, Alhan, & Töre, 2015; Zernecke et al., 2008).

**Minimālo, maksimālo un vidējo ( $\pm$  standartkļūda) iekaisuma un eritropoēzes rādītāju vērtības suņiem pirms aortas protēzes implantācijas/ *Minimum, maximum and mean ( $\pm$  standard error) values of inflammation and erythropoiesis in dogs before implantation of the aortic prosthesis***

Rādītāja nosaukums	Pirms implantācijas A grupa, n=5/ <i>Before implantation groupe A, n=5</i>			Pirms implantācijas B grupā n=4/ <i>Before implantation groupe B, n=4</i>		
	Min./ Min	Maks./ Max	Vidēji $\pm$ St.kļūda/ <i>Mean<math>\pm</math> St.error</i>	Min./ Min	Maks./ Max	Vidēji $\pm$ St.kļūda/ <i>Mean<math>\pm</math> St.error</i>
Kop. Leikocītu, skaits, $10^9 L^{-1}$ / <i>WBC</i> $10^9 L^{-1}$	8.70	13.40	10.38 $\pm$ 0.47	7.30	9.80	8.50 $\pm$ 0.64
Segment-kodolainie/ <i>Segmented neutrophils</i>	5.30	8.40	6.31 $\pm$ 0.36	3.23	6.86	5.10 $\pm$ 0.86
Stabiņ-kodolainie/ <i>Banded neutrophils</i>	0.17	0.32	0.24 $\pm$ 0.03	0.22	0.38	0.28 $\pm$ 0.04
Limfocīti/ <i>Lymphocytes</i>	0.96	3.35	2.00 $\pm$ 0.36	1.30	3.08	2.31 $\pm$ 0.38
Monocīti/ <i>Monocytes</i>	0.26	0.80	0.51 $\pm$ 0.09	0.39	0.60	0.49 $\pm$ 0.04
Eozinofīlie/ <i>Eosinophil neutrophils</i>	0.19	0.54	0.37 $\pm$ 0.07	0.29	0.38	0.34 $\pm$ 0.03
RBC, $10^{12} L^{-1}$	6.62	7.08	6.91 $\pm$ 0.08	6.92	8.30	7.54 $\pm$ 0.33
HGB, g $L^{-1}$	162	170	167.40 $\pm$ 1.47	164	205	180.25 $\pm$ 9.46
HCT, %	46.80	50.30	48.96 $\pm$ 0.65	47.50	58.00	51.50 $\pm$ 2.34
MCV, fl	68.20	72.60	70.92 $\pm$ 0.75	65.80	70.60	68.38 $\pm$ 1.13
MCH, pg	23.70	24.50	24.16 $\pm$ 0.14	23.50	24.60	23.83 $\pm$ 0.26
MCHC, g $L^{-1}$	332	348	341.60 $\pm$ 2.79	336	357	349.25 $\pm$ 4.59
PLT, $10^9 L^{-1}$	338	606	447.40 $\pm$ 47.48	317	365	336.50 $\pm$ 11.09
PCT, %	0.35	0.47	0.38 $\pm$ 47.48	0.29	0.34	0.30 $\pm$ 0.01

**Minimālo, maksimālo un vidējo ( $\pm$  standartkļūda) iekaisuma un eritropoēzes rādītāju vērtības suņiem eksperimenta beigās/  
*Minimum, maximum and mean ( $\pm$  standard error) values of inflammation and erythropoiesis in dogs at the end of experiment***

Rādītāja nosaukums	6 mēnešus pēc implantācijas A grupa, n=5/ <i>6 months after implantation groupe A, n=5</i>			12 mēnešus pēc implantācijas B grupa, n=4/ <i>12 months after implantation groupe B, n=4</i>		
	Min./ Min	Maks./ Max	Vidēji $\pm$ St.kļūda/ <i>Mean<math>\pm</math> St.error</i>	Min./ Min	Maks./ Max	Vidēji $\pm$ St.kļūda/ <i>Mean<math>\pm</math> St.error</i>
Kop. leikocītu skaits, $10^9 \text{ L}^{-1}$ / WBC $10^9 \text{ L}^{-1}$	9.40	12.90	11.63 $\pm$ 0.77	8.00	11.20	9.65 $\pm$ 0.67
Segment-kodolainie/ <i>Segmented neutrophils</i>	6.60	8.76	8.13 $\pm$ 0.51	5.76	7.28	6.59 $\pm$ 0.34
Stabiņ-kodolainie/ <i>Banded neutrophils</i>	0.28	0.48	0.38 $\pm$ 0.04*	0.24	0.56	0.40 $\pm$ 0.07
Limfocīti/ <i>Lymphocytes</i>	1.32	2.30	1.66 $\pm$ 0.23	0.85	2.10	1.45 $\pm$ 0.32
Monocīti/ <i>Monocytes</i>	0.47	1.03	0.71 $\pm$ 0.12	0.28	0.70	0.53 $\pm$ 0.10
Eozinofilie/ <i>Eosinophilneutrophils</i>	0.52	0.98	0.75 $\pm$ 0.10 *	0.56	0.75	0.68 $\pm$ 0.04
RBC, $10^{12} \text{ L}^{-1}$	6.17	6.62	6.47 $\pm$ 0.10*	6.75	7.96	7.09 $\pm$ 0.29**
HGB, g $\text{L}^{-1}$	146	164	159 $\pm$ 4.36*	154	176	161.25 $\pm$ 5.09
HCT, %	43.80	48.90	46.58 $\pm$ 1.28*	45.10	52.60	48.70 $\pm$ 1.95
MCV, fl	68.30	75	72.05 $\pm$ 1.51	66.10	75.70	68.90 $\pm$ 2.27
MCH, pg	23.60	25.20	24.50 $\pm$ 0.33	22.10	23.40	22.73 $\pm$ 0.28**
MCHC, g $\text{L}^{-1}$	333	360	341.25 $\pm$ 6.30	310	343	331 $\pm$ 7.25
PLT, $10^9 \text{ L}^{-1}$	430	487	458 $\pm$ 11.78	307	449	372.75 $\pm$ 30.21
PCT,%	0.32	0.42	0.37 $\pm$ 0.02	0.29	0.38	0.32 $\pm$ 0.02

\* būtiska atšķirība salīdzinot ar pirmsoperācijas periodu ( $p < 0.05$ ) /

\* a significant difference compared to the preoperative period ( $p < 0.05$ )

\*\* būtiska atšķirība salīdzinot A un B grupas rādītājus eksperimenta beigās ( $p < 0.05$ ) /

\*\* a significant difference when comparing the A and B group indices at the end of the experiment ( $p < 0.05$ )

Mūsu pētījumā mēnesi un 6 mēnešus pēc implantācijas suņiem limfocītu un monocītu skaita izmaiņas asinīs iekļāvās normas intervālā. Divpadsmit

mēnešus pēc implantācijas monocītu skaits visiem suņiem bija normas intervālā, bet limfocītu skaits suņiem H8K4571 un H9D0577 bija nedaudz zem zemākā normas rādītāja, attiecīgi 0.96 un 0.85. Cilvēkiem arī konstatēta strauja limfocītu un monocītu samazināšanās, bet šīs izmaiņas konstatētas trīs dienas pēc aortas protezēšanas operācijām (Galle et al., 2000). Uzskatām, ka, pirmkārt, limfocītu izmaiņas varētu saistīt ar organisma imunoloģisku reakciju uz protēzē izmantotajiem biomateriāliem, kā to norāda citi autori (Jones, 2008; Kzhyshkowska et al., 2015). Vienlaikus jāatzīmē, ka šiem diviem suņiem, kam novēroja samazināto limfocītu skaitu asinīs eksperimenta beigās, histoloģiskajos preparātos tika konstatēta lielāka neitrofilo leukocītu un limfocītu infiltrācija protēzes sienā, salīdzinot ar pārējiem 7 suņiem abās grupās. Paaugstināta neitrofilo leukocītu un limfocītu infiltrācija protēzes sienā parasti norāda uz infekcijas klātbūtni (Anderson & Jiang, 2017).

Uzskatām, ka mūsu pētījumā izmantotā protēze kā svešķermenis neizraisīja izteiktu limfocītu aktivāciju, jo limfocītu skaits asinīs visiem A grupas suņiem un 2 B grupas suņiem bija normas intervālā. Tomēr kombinācijā ar iespējamu infekcijas klātbūtni protēzē (iepriekš minētajiem diviem suņiem) notika izteiktāka limfocītu piesaiste protēzes sienā, tādā veidā samazinot šo šūnu skaitu asinīs.

Pirms aortas protezēšanas implantācijas un eksperimenta noslēgumā trombocītu un laikā lielāka daļa ar eritrocītiem saistīto parametru rādītāji iekļāvās normas robežās. Literatūrā tiek minēti līdzīgi dati, kur dažādu sintētisko materiālu biointegrācijas pētījumā izmantojot peles, konstatēti nemainīgi eritrocītu daudzuma un kvalitātes rādītāji (Scaglione et al., 2011). Atsevišķi tikai MCH palielināšanos pētījumā uzskatām par artefaktu (Jemeljanovs et al., 2007).

Salīdzinot asins seruma bioķīmiskos rādītājus pirms aortas protezēšanas ieoperēšanas, mēnesi pēc tās un eksperimenta beigās, atšķirības starp A un B grupām netika konstatētas ( $p > 0.05$ ) un rādītāji bija normas robežās. Vienam sunim (H9C0439) divpadsmit mēnešus pēc aortas protezēšanas implantēšanas vēdera aortā asins seruma urīnviela bija paaugstinājusies virs normas robežas līdz  $11.2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Urīnvielas paaugstināšanos asins serumā pēc vēdera aortas protezēšanas zem nieru artēriju atzarošanās vietas 10% gadījumu konstatē arī medicīnas praksē (Breckwoldt, Mackey, Belkin, & O'Donnell, 1992). Mūsu gadījumā jāņem vērā fakts, ka kreatinīna koncentrācija asins serumā minētajam sunim bija normāla, bet literatūrā klasisku nieru mazspēju raksturo ar paaugstinātu gan urīnvielas, gan kreatinīna līmeni asins serumā (Nelson & Couto, 2009). Nopietnus nieru darbības traucējumus minētajam sunim izslēdzām un urīnvielas paaugstināšanos definējām kā prerenālas izcelsmes.

### **Asins spiediena izmaiņas**

Mūsu pētījumā pirms eksperimenta sistoliskais asinsspiediens Bīglu šķirnes suņiem vidēji bija  $156.88 \pm 5.01$  mmHg un diastoliskais  $82.16 \pm 4.50$  mmHg, kas sakrīt ar zemāk minētajos pētījumos norādīto. Normāls sistoliskais asinsspiediens veseliem Bīglu šķirnes suņiem tiek minēts  $125 \pm 25$  līdz  $156 \pm 22$  mmHg un diastoliskais  $74 \pm 18$  līdz  $91 \pm 13$  mmHg (Egner et al., 2007; Klein, 2013; Pettersen, Linartz, Hamlin, & Stoll, 1988) Citā literatūras avotā veseliem Bīglu šķirnes suņiem uzrādīts augstāks asinsspiediens, proti, sistoliskais asinsspiediens  $163 \pm 19$  līdz  $165 \pm 18$  mmHg un diastoliskais  $92 \pm 12$  līdz  $96 \pm 15$  mmHg (Rattez et al., 2010).

Visā sešu mēnešu laikā pēc aortas protēzes implantēšanas sistoliskais asinsspiediens mūsu pētījumā variēja vidēji  $140.83 \pm 2.78$  līdz  $162.13 \pm 10.12$  mmHg un diastoliskais vidēji  $69.57 \pm 6.05$  līdz  $88.83 \pm 8.14$  mmHg, kas arī atbilst iepriekš minētajam veselu Bīglu šķirnes suņu normālam asinsspiedienam.

Augstākais sistoliskais un diastoliskais asins spiediens visiem suņiem mūsu pētījumā tika novērots vienu līdz trīs dienas pēc vēdera aortas operācijas, bet tas būtiski neatšķīrās no konstatētā pirms operācijas. Līdzīgi rezultāti aprakstīti pētījumā suņiem pēc mastektomijas veikšana, kur pirms operācijas sistoliskais asinsspiediens aptuveni bija 130 mmHg un diastoliskais 90 mmHg un dienu pēc operācijas būtiski neatšķīrās, jo bija attiecīgi 140 mmHg un 95 mmHg (Horta et al., 2015). Cilvēkiem pēc asinsvadu operācijām, tajā skaitā vēdera aortas rekonstrukcijām, konstatētais sistoliskais asinsspiediens 132 – 135 mmHg, arī būtiski neatšķīrās no pirms operācijas noteiktā sistoliskā asinsspiediena  $136 \pm 17$  mmHg (Sandoval et al., 2016). Līdzīgi mūsu rezultātiem, cilvēkiem pat pie 57% lielas vēdera aortas stenozes, kas radusies aneirismas rekonstrukcijas rezultātā, nenovēroja būtiskas asinsspiediena izmaiņas pēcoperācijas periodā (Ioannou et al., 2014).

## **Vēdera aortas, protēzes diametrs un maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē**

### **Aortas un protēzes diametra izmaiņas pēcoperācijas periodā**

Tiem suņiem A un B grupā, kuriem protēzes diametrs pirms operācijas bija 5.00 mm pēc sešiem mēnešiem tas bija samazinājies vidēji par  $0.36 \pm 0.27$  mm ( $p > 0.05$ ), bet tiem kam implantēja 8.00 mm diametra protēzes, to diametrs pēc sešiem mēnešiem bija vidēji samazinājies par  $1.06 \pm 0.29$  mm ( $p > 0.05$ ) (2. attēls). B grupas suņiem divpadsmit mēnešus pēc operācijas vidējais aortas protēzes diametrs nedaudz palielinājās un bija  $5.05 \pm 0.40$  mm (3. attēls) (šajā grupā implantēto aortas protēžu diametrs sākotnēji visiem suņiem bija

5.00 mm). B grupas suņiem aortas protēzes diametra izmaiņas visā 12 mēnešu pēcooperācijas periodā netika uzskatītas par būtiskām ( $p > 0.05$ ).

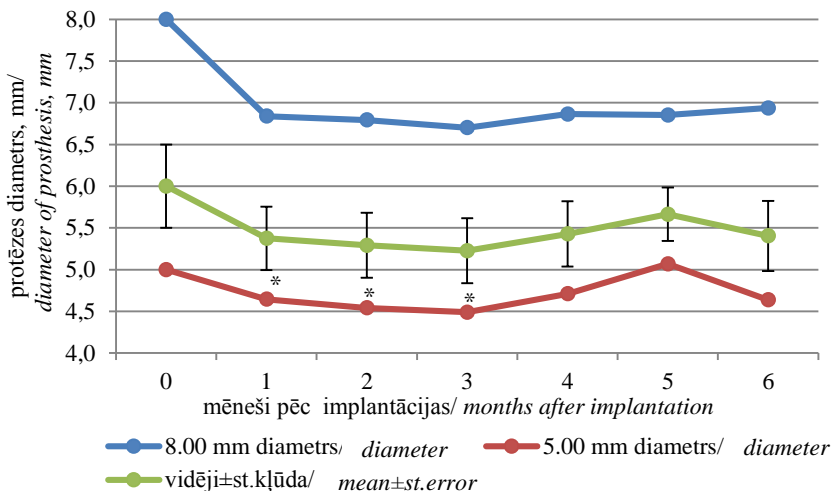
Līdzīgus rezultātus konstatējis Seifalian et al. (2003), astoņu Bīglu šķirnes suņu vēdera aortā implantējot  $5 \pm 0.04$  mm diametrā platas poliuretāna protēzes, kuru diametrs trīsdesmit sešus mēnešus vēlāk, vidēji bija  $5 \pm 0.11$  mm. Wilson et al. (1991) pētījumā, suņiem femorālajā artērijā tika implantētas ar poliesteri un poliuretānu izklātas, 4 mm diametrā platas asinsvadu protēzes, kas 12 mēnešus vēlāk nebija būtiski mainījušas savu diametru (Wilson et al., 1991). Turpretī, Sun et al. (2001) suņiem vēdera aortā implantējot heparinizētas poliestera protēzes, trīs mēnešus pēc to implantēšanas konstatēja protēžu diametra samazināšanos par  $29.9 \pm 7.0\%$ . Mūsu gadījumā trīs mēnešus pēc implantācijas tiem suņiem, kam implantēja 5.00 mm diametra protēzes, to diametrs bija samazinājies par  $10.6 \pm 4.4\%$  un attiecīgi tiem suņiem, kam implantēja 8.00 mm diametra protēzes par  $16.25 \pm 1.25\%$ .

A grupā sešus mēnešus pēc aortas protēzes implantācijas nevienam eksperimentālajam dzīvniekam ultrasonogrāfiski nenovēroja hematomas, seromas vai aneirismas veidošanos protēzē, ne arī kraniāli un kaudāli no tās esošajā vēdera aortā. B grupā diviem suņiem pēc sestā mēneša pēc operācijas tika konstatēta vienpusēja aneirisma aortas protēzes vidusdaļā.

Aortas protēzes diametra tendenci samazināties novērojām līdz trešajam pēcooperācijas mēnesim un to skaidrojam ar protēzes sienas cauraugšanu ar saistaudiem un neointīmas formēšanos uz protēzes iekšējās virsmas. Līdzīgu viedokli pauž arī citi autori norādot, ka intensīva saistaudu saviešanās, neointīmas veidošanās un uzbiezināšanās notiek pirmajā mēnesī pēc aortas protēzes implantēšanas (Boccafoschi et al., 2014; Newby & Zaltsman, 2000). Neskatoties uz implantēto protēžu diametra atšķirībām, visiem suņiem pēc operācijas protēžu diametrs bija mazāks, attiecībā pret vēdera aortas diametru ( $p < 0.05$ ), tā radot stenotisku segmentu vēdera aortā.

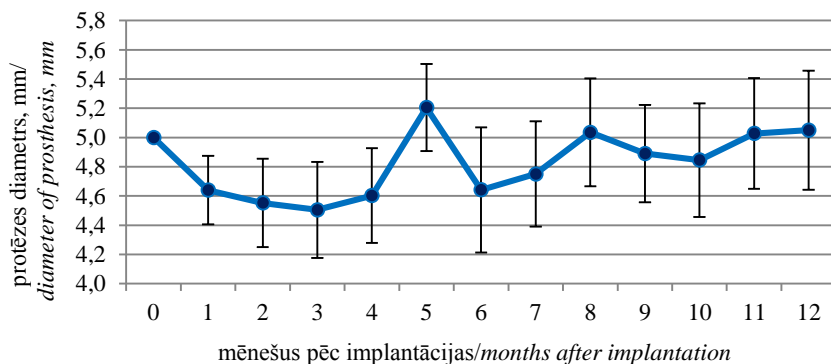
Citos eksperimentālos pētījumos suņiem aortā arī implantētas mazāka diametra poliestera vai kombinētas poliestera/ePTFE protēzes, salīdzinot ar natīvo recipienta aortu. (Marois et al., 1996; Shi et al., 1994; Sun et al., 2001; Zilla, Bezuidenhout, & Human, 2007). Zilla et al. (2007) norādījis, ka eksperimentos implantējamās protēzes diametram vajadzētu būt lielākam, kā recipienta aortas diametram. Turpretī, Salacinski et al. (2001) norāda, ja implantētās sintētiskā materiāla asinsvadu protēzes diametrs ir lielāks par tā recipienta asinsvadu, tad samazinās asins plūsmas ātrums protezētajā segmentā, veicinot neointīmas hiperplāzijas attīstību un oklūzijas risku. No otras puses, ja implantēta pārāk maza diametra protēze, veidojas fibrīna slānis, kas izklāj mākslīgās protēzes iekšējo virsmu un var kavēt tās normālu integrāciju organismā (Salacinski et al., 2001).





2. att. Astoņu un piecu milimetru platu aortas protēžu diametra izmaiņas A un B grupas suņiem 6 mēnešu periodā pēc to implantācijas vēdera aortā, (\*  $p < 0.05$ )/

*Fig 2. The changes in diameter of eight and five millimeter wide aortic prosthesis for 6 months period after its implantation in the abdominal aorta of dogs in A and B group, (\*  $p < 0.05$ )*



3. att. B grupas suņu aortas protēzes diametra dinamika ±standartkļūda 12 mēnešu laikā pēc implantācijas vēdera aortā/  
*Fig 3. The changes in diameter of the aortic prosthesis for 12 months period after its implantation in the abdominal aorta of dogs in group B*

Vēdera aortas diametrs eksperimentālajiem dzīvniekiem pirms aortas protēzes implantācijas bija robežās no 6.88 mm līdz 8.82 mm un vidēji  $7.72 \pm 0.60$  mm. Visiem dzīvniekiem pirmajos sešos mēnešos pēc operācijas novērojām vēdera aortas diametra kranīāli no protēzes palielināšanos vidēji par  $0.52 \pm 0.15$  mm ( $p < 0.05$ ). Jāatzīmē, ka statistiski salīdzinot vēdera aortas diametra izmaiņas minētajā vietā atsevišķi starp A un B grupām un starp suņiem, kam implantētas dažāda diametra protēzes, būtiskas atšķirības 6 mēnešos pēc implantācijas (salīdzinot ar pirms implantācijas noteikto vēdera aortas diametru) netika konstatētas ( $p > 0.05$ ).

B grupas dzīvniekiem 12 mēnešu pēcoperācijas periodā, arī tika konstatēta vēdera aortas diametra kranīāli no protēzes palielināšanās vidēji par  $0.53 \pm 0.25$  mm ( $p > 0.05$ ).

Līdzīgas izmaiņas vēdera aortas diametrā vērojamas arī kaudāli no protēzes visā pēc operācijas periodā. Sešus mēnešus pēc protēzes implantācijas vēdera aortas diametrs kaudāli no protēzes visiem suņiem vidēji bija palielinājies par  $0.59 \pm 0.18$  mm ( $p < 0.05$ ). Vēdera aortas diametra pieaugums sešus mēnešus pēc protēzes implantēšanas kaudāli no tās statistiski neatšķīrās suņiem ar 5.00 mm un 8.00 mm diametra protēzi ( $p > 0.05$ ). Savukārt B grupas suņiem 12 mēnešus pēc operācijas vēdera aortas diametrs kaudāli no protēzes palielinājās vidēji par  $0.83 \pm 0.28$  mm ( $p > 0.05$ ).

Mūsaprāt vēdera aortas diametra paplašināšanos kranīāli no protēzes (stenotiskā segmenta) varēja radīt paaugstināts spiediens, ko radīja nosacīta asins stāze, jo bija apgrūtināta asins ieplūšana protēzes segmentā. Literatūrā norāda, ka asinsvada dilatācija ir bieži konstatēta gadījumos, kad palielinās pieplūstošo asiņu daudzums asinsvadā (Bevan, 1997). Savukārt, vēdera aortas diametra paplašināšanās kaudāli no protēzes (stenotiskā segmenta) mēs skaidrojam ar poststenotiskās dilatācijas fenomenu, līdzīgi kā to novēro aortā kaudāli no aortas stenozes subvalvulārajā apvidū (Bonagura & Fuentes, 2015). Jāpiebilst, ka mums pieejamajos literatūras avotos, autori koncentrējās uz pašas protēzes diametra atspoguļošanu, nenorādot un neanalizējot pieguļošās aortas diametra izmaiņas.

### **Maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē aortas protēzē un vēdera aortā kranīāli un kaudāli no tās**

Maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē vēdera aortā kaudāli no *arteria renalis* atzarošanās pirms sintētiskās asinsvadu protēzes ieoperēšanas eksperimenta suņiem svārstījās robežās no 106.0 līdz 159.2  $\text{cm s}^{-1}$  un vidēji bija  $124.607 \pm 6.112$   $\text{cm s}^{-1}$ . Tas sakrīt ar citos pētījumos veselu suņu vēdera aortā konstatēto maksimālo asins plūsmas ātrumu sistolē ( $111.4 \pm 28.68$  līdz

129.2±35.23 cm s<sup>-1</sup>) (Koma et al., 2005; Riesen, Schmid, Gaschen, Busato, & Lang, 2002).

Maksimālajam asins plūsmas ātrumam sistolē aortas protēzes vidusdaļā pēcoperācijas periodā bija tendence paaugstināties. Sešu mēnešu pēcoperācijas periodā maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē protēzes vidusdaļā A grupas suņiem vidēji bija pieaudzis par 67.20±18.36 cm s<sup>-1</sup> (p<0.05) un sasniedza vidēji 183.92±13.13 cm s<sup>-1</sup>. B grupas suņiem sešu mēnešu pēc operācijas periodā maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē palielinājās par 96.97±26.39 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05) un sasniedza vidēji 238.60±19.91 cm s<sup>-1</sup>. Literatūrā norāda, ka asins vada lūmenam, samazinoties asins plūsmas ātrumam, ir tendence pieaugt (Jin, Hwang, & Cho, 2017).

Divpadsmit mēnešu pēcoperācijas periodā vidējais maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē protēzē B grupas suņiem vidēji bija palielinājies par 79.68±13.11 cm s<sup>-1</sup>, sasniedzot 214.15±15.39 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05). Arī maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē izmaiņas periodā no 6 līdz 12 mēnešiem pēc implantācijas B grupas suņu aortas protēzē nebija būtiskas (p>0.05).

Citi zinātnieki konstatējuši līdzīgu tendenci cilvēkiem, kuriem 6 mēnešus pēc edovaskulāras vēdera aneirismas rekonstrukcijas maksimālais asins plūsmas ātrums rekonstruētajā posmā bija palielinājies par 33.00 cm s<sup>-1</sup>, attiecīgi no 131.10±35.70 cm s<sup>-1</sup> līdz 164.10±23.30 cm s<sup>-1</sup> (Kadoglou et al., 2012), bet 12 mēnešus pēc līdzīgas procedūras par 41.20±3.30 cm s<sup>-1</sup> (Kadoglou et al., 2014). Mūsu rezultāti skaitliski atšķirās no minētā pētījuma, bet tas izskaidrojams ar to, ka starpība starp vēdera aortas un protēzes diametru mūsu gadījumā visticamāk bija lielāka.

Sešu mēnešu pēcoperācijas periodā A grupas dzīvniekiem maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē kraniāli no protēzes samazinājās par vidēji 9.31±17.32 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05), sasniedzot 107.41±20.58 cm s<sup>-1</sup>, bet B grupas dzīvniekiem tas samazinājās par 63.94±10.13 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05), sasniedzot 70.53±2.75 cm s<sup>-1</sup>.

Divpadsmit mēnešu pēcoperācijas periodā vidējais maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē kraniāli no protēzes B grupas suņiem vidēji bija samazinājies par 68.45±11.14 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05), sasniedzot 69.95±4.88 cm s<sup>-1</sup>. B grupā tika konstatēts, ka pirmo 6 mēnešu laikā maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē samazinājās izteiktāk, salīdzinot ar periodu starp 6 un 12 mēnešiem pēc protēzes implantācijas, bet abos gadījumos izmaiņas nebija būtiskas (p>0.05).

Sešu mēnešu pēcoperācijas periodā maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē vēdera aortā kaudāli no protēzes A grupas dzīvniekiem bija palielinājies par vidēji 71.41±35.88 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05), sasniedzot vidēji 188.13±35.71 cm s<sup>-1</sup>, bet B grupas dzīvniekiem par vidēji 117.68±29.90 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05), sasniedzot 252.15±19.67 cm s<sup>-1</sup>.

Divpadsmit mēnešu pēcoperācijas periodā vidējais maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē vēdera aortā kaudāli no protēzes B grupas suņiem bija palielinājies vidēji par  $74.07 \pm 22.74 \text{ cm s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ), sasniedzot  $212.47 \pm 16.52 \text{ cm s}^{-1}$ . B grupas suņiem maksimālajam asins plūsmas ātrumam sistolē no 6 līdz 12 mēnesim pēc implantācijas bija tendence samazināties vidēji par  $39.68 \text{ cm s}^{-1}$ , ( $p > 0.05$ ).

Mūsu gadījumā implantētās protēzes veidoja sašaurinātu segmentu vēdera aortā, un tādēļ radīja maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē samazināšanos kraniāli no protēzes un paātrināšanos kaudāli no protēzes. Asinīm plūstot, caur aortas protēzi tās ieguva plūsmas paātrinājumu, kas turpinājās arī aortā kaudāli no protēzes. Līdzīgu maksimālā asins plūsmas ātruma palielināšanos sistolē suņiem novēro kaudāli no iedzimtas aortas stenozes sirds pamatnes tuvumā (Bonagura & Fuentes, 2015; Garncarz, Parzeniecka-Jaworska, & Szalus-Jordanow, 2017).

Galvenais faktors, kas nosaka asins plūsmas ātrumu aortā, ir tās diametrs (Klein, 2013; Szatmári, Sótonyi, & Vörös, 2001). Šādu sakarību konstatējām arī mūsu pētījumā, veicot Pīrsona korelācijas analīzi. Konstatējām vidēji ciešu negatīvu korelāciju starp asins plūsmas ātrumu un aortas diametru kraniāli no protēzes un asins plūsmas ātrumu un diametra lielumu aortas protēzes vidusdaļā (attiecīgi korelācijas koeficienti  $r = -0.513$ ,  $p < 0.001$  un  $r = -0.504$ ,  $p < 0.001$ ). Vidēji cieša negatīva korelācija tika konstatēta arī starp protēzes diametru un asins plūsmas ātrumu kaudāli no tās ( $r = -0.50$ ,  $p < 0.001$ ).

Kopumā jāatzīst, ka mums pieejamajā zinātniskajā literatūrā pētījumi par asins plūsmas ātruma izmaiņām suņa vēdera aortā pēc sintētisko asinsvadu implantācijas ir maz pieejami.

## **Dzīvnieku sekcijas un makroskopiskās izmeklēšanas rezultāti protēzes vietā**

Dzīvnieku sekcijas laikā vizuāli inspicējot, vēdera dobuma orgānus četriem A grupas un visiem B grupas suņiem makroskopiskas patoloģiskas izmaiņas nekonstatējām. Arī citos līdzīga rakstura pētījumos, pēc sintētisku materiālu protēžu implantācijas vēdera aortā dažādām dzīvnieku sugām, tai skaitā suņiem, nav konstatētas makroskopiskas patoloģiskas atradnes vēdera dobuma orgānos (Bashar et al., 2002; Beygui et al., 1999; Gregory, Vercammen, Flynn, & Kibbe, 2016; Marc G Jeschke, Hermanutz, Wolf, & Köveker, 1999; Ueberrueck et al., 2005). Tomēr vienam sunim (H8J4463) sekcijā apstiprinājās rentgenoloģiskās un ultrasonogrāfiskās izmeklēšanas laikā konstatētā palielinātā loka zarna (*megacolon*). Loka zarna paplašināšanos, kā skaidro S. Gelman, varēja radīt tās inervācijas traucējumi audu traumatizācijas vai muguras smadzeņu išēmijas dēļ, aortas implantācijas laikā (Gelman, 1995).

Implantētās protēzes visiem A un B grupas suņiem bija pilnīgi inkorporējušās vēdera aortā un tās apņēma fibrozo audu kapsula. Izteiktāka un biezāk formējusies kapsula apkārt protēzēm bija B grupas suņiem. A. Kadišs savas disertācijas rezultātos apraksta līdzīgu atradni, kad implantējot poliesteru un poliuretāna asinsvadu protēzes (līdzīgas šajā pētījumā izmantotajām) suņu organismā, pēc sešiem mēnešiem apkārt protēzēm konstatēja biezu saistaudu kapsulu (Kadišs, 2005). Biezu saistaudu kapsula, kas apņēma poliesteru aortas protēzes suņiem 6 mēnešus pēc implantācijas konstatējis arī Marois et al. (1996).

Abu grupu suņiem protēzes lūmens bija brīvs ar gludu un spīdīgu iekšējo virsmu, kas norāda uz protēzes lūmena ilgstošu funkcionējoša stāvokļa saglabāšanos. Līdzīgi ziņojuši arī citi zinātnieki, piemēram, Izhar et al. konstatējis, ka 6 mm diametra segmentētā poliesteru – poliuretāna protēzes trīs mēnešus pēc to implantācijas suņa miega artērijās 100% gadījumu saglabā brīvu lūmenu (Izhar et al., 2001). Marois et al. (1996) sešus mēnešus pēc poliesteru protēzes implantācijas suņiem krūšu un vēdera aortā visos gadījumos konstatējis brīvu protēzes lūmenu un balto, gludu, spīdīgu protēzes iekšējo virsmu. Tomēr jāatzīmē, ka Ueberrueck et al. (2005) publicējis datus, ka poliesteru protēzēm, kas implantētas cūku vēdera aortā un aitu miega artērijā, 16,3% gadījumu novērota to oklūziju pēc 3 mēnešiem.

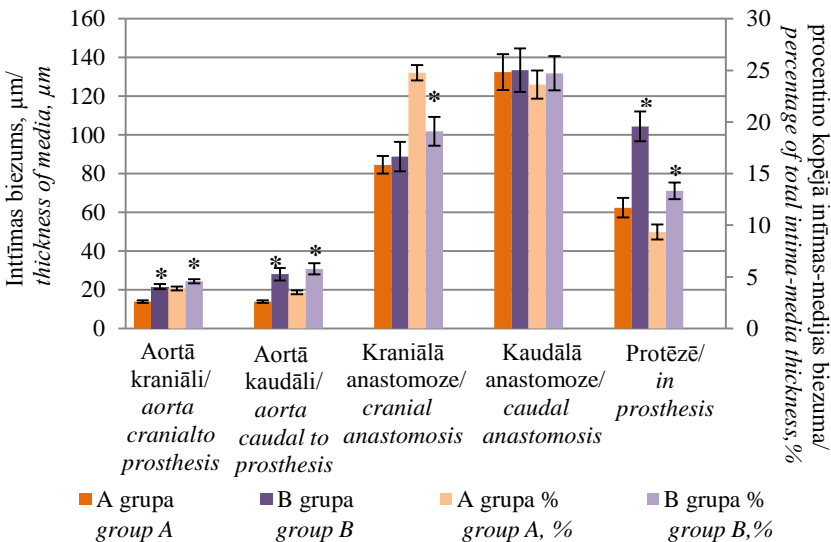
Sekcijas laikā, suņiem (H9C0439 un H9A0069) no B grupas, apstiprinājās vienpusēja aortas protēzes sienas aneirisma, ko bijām novērojuši ultrasonogrāfiski. Šiem suņiem konstatēti arī augstākie maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē rādītāji, salīdzinot ar pārējiem suņiem. Tas, iespējams, sekmēja aneirismas veidošanos protēzes sienā. Par aneirismas cēloņiem uzskata protēzes sienas stiprības samazināšanos bioloģiski aktīvā vidē (iekaisuma process) (Francesco et al., 2016) un augsta spiediena apstākļos (Nappi et al., 2016). Medicīnā aneirismas un pseudoaneirismas veidošanās pēc aortas rekonstrukcijas ar sintētiska materiāla protēzēm tiek konstatētas 6 % gadījumu (Nishida, Tabata, Fukui, & Takanashi, 2016)

## **Protēzes sienas histoloģisko izmeklējumu rezultāti**

Mūsu pētījumā A un B grupas suņu ekplantēto aortas protēžu histoloģisko preparātu izmeklējumos, neointīma vienmērīgi klāja visu protēzes iekšējo virsmu un neointīmas uzbiezinājumi bija novērojami tikai protēzes un vēdera aortas savienojuma vietās. Līdzīgi rezultāti konstatēti arī citu autoru pētījumos. Piemēram, pilnīgu poliesteru protēzes virsmas pārklāšanos ar neointīmu un tās uzbiezināšanos anastomožu vietās suņiem un cūkām konstatēta jau trīs mēnešus pēc tās implantācijas (Sun et al., 2001; Ueberrueck et al., 2005).

A grupas suņiem mūsu pētījumā neointīmas biezums kraniālajā anastomozē bija  $84.56 \pm 4.59 \mu\text{m}$ , protēzes vidusdaļā  $62.36 \pm 5.06 \mu\text{m}$ , kaudālajā anastomozē  $132.38 \pm 9.26 \mu\text{m}$  un B grupas suņiem tas bija biežāks ( $p < 0.05$ ), attiecīgi  $88.80 \pm 7.58 \mu\text{m}$ ,  $104.39 \pm 7.62 \mu\text{m}$ ,  $133.41 \pm 11.19 \mu\text{m}$  (4. attēls).

Literatūrā, līdzīgos pētījumos norādīti biežāki neointīmas mērījumi. Piemēram, Wu et al (1997) suņiem implantējot poliēstera protēzi vēdera aortā, pēc 2 mēnešiem konstatēja, ka neointīmas biezums kraniālajā anastomozē bija  $100 \mu\text{m}$ , protēzes vidū  $180 \mu\text{m}$  un kaudālajā anastomozē  $175 \mu\text{m}$  un šie rādītāji būtiski nemainījās arī pēc 3 gadiem (Wu et al., 1997). Sun et al. (2001), trīs mēnešus pēc dažādi apstrādātu poliēstera protēžu implantācijas suņu vēdera aortā, konstatējis pat līdz  $570 \pm 150 \mu\text{m}$  biezu neointīmu. Mūsu gadījumā neointīmas veidošanās vērtējama pozitīvi, jo tās biezums bija mazāk izteiktais kā iepriekš minētajos piemēros.



4. att. **Vidējās ( $\pm$ standartklūda) intīmas biezuma izmaiņas A un B grupas suņiem pēc aortas protēzes eksplantācijas dažādās vietās/**

*Fig. 4. Mean ( $\pm$  standard error) intima thickness in dogs of A and B groups after aortic prosthesis explantation in different sites*

\* būtiska atšķirība salīdzinot A un B grupu,  $p < 0.05$ /

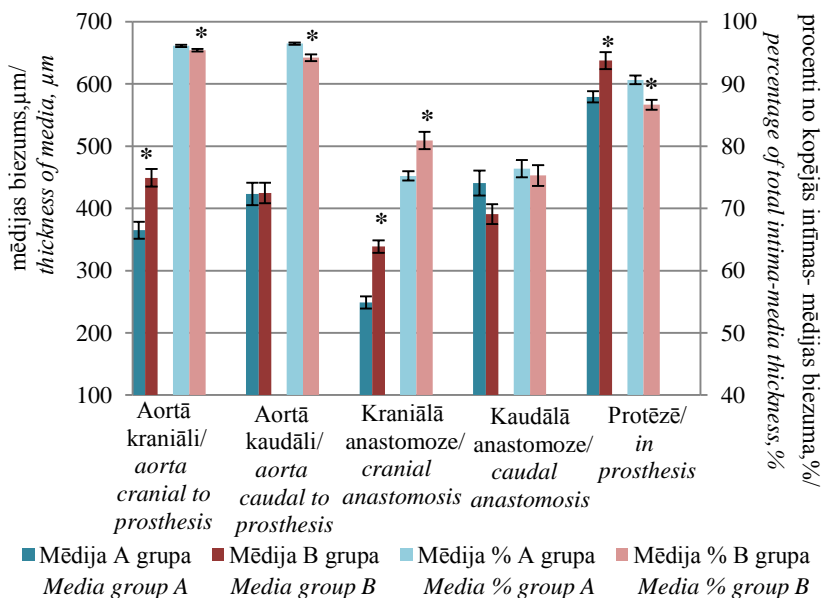
\* significant difference between group A and B,  $p < 0.05$

Mūsu pētījumā neointīmas hiperplāzijas veidošanos anastomožu vietās varēja ietekmēt izmantotais nepārtraukto šuvju veids, bet šo šuvju izmantošana, ekonomēja išēmijas un kopējo operācijas laiku. Šī iemesla dēļ arī medicīnā asinsvadu savienošanā tiek izmantotas nepārtrauktās šuves (Tiwari et al., 2003).

Mezglu šuvju lietošana attiecīgi uzrāda mazāku neointīmas hiperplāzijas veidošanos, bet ievērojami pagarina aortas un protēzes savienošanas laiku, palielinot pēcooperācijas komplikāciju risku (Lemson et al., 2000).

Implantētās protēzes sienas biezums  $\mu\text{m}$  B grupas dzīvniekiem bija būtiski lielāks, salīdzinot ar A grupas dzīvniekiem (5. attēls). Citi zinātnieki šādu atšķirību nav konstatējuši, piemēram, Seifalian A. et al (2003) būtiskas izmaiņas poli(karbonāta-urea)uretāna protēzes sienas biezumā pirms un 18 mēnešus pēc implantācijas suņu vēdera aortā nav konstatējis. Protēzes sienas biezuma palielināšanos mūsu gadījumā varēja radīt protēzes izgatavošanai izmantotais materiāls un tehnoloģija.

Abu grupu (6 un 12 mēnešus pēc implantācijas) dzīvniekiem tika konstatēta kolagēna depoziģija starp protēzes diegiem visā sienas biezumā. Līdzīga kolagēna depoziģija visā asinsvadu protēzes sienas šķērsgrīzumā novērota arī citos eksperimentos, 6 nedēļas, 18 un 36 mēnešus pēc implantācijas (de Valence et al., 2012; Mugnai et al., 2013; Seifalian et al., 2003; Wu et al., 1997).

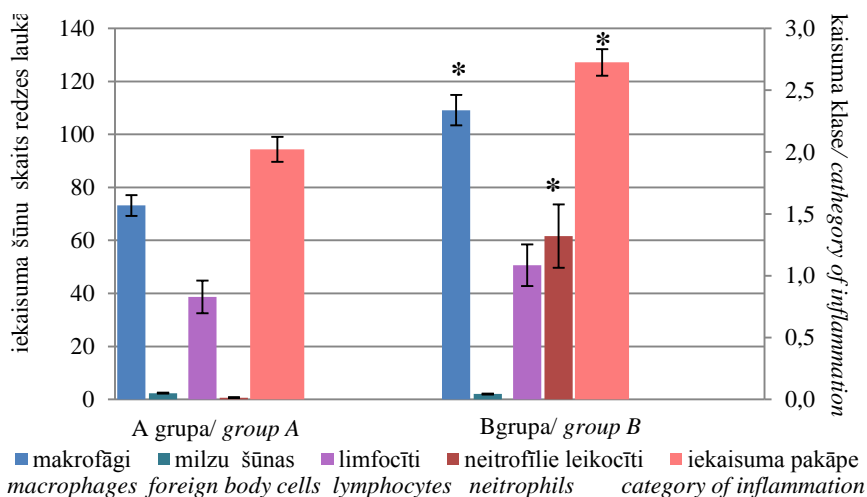


5. att. **Vidējās ( $\pm$ standartklūda) mēdijas biezuma izmaiņas A un B grupas suņiem pēc aortas protēzes eksplantācijas dažādās vietās/  
Fig 5. *Mean ( $\pm$  standard error) media thickness in dogs of A and B groups after aortic prosthesis explantation in different sites***

\* būtiska atšķirība salīdzinot A un B grupu,  $p < 0.05$ /

\* significant difference between group A and B,  $p < 0.05$

Novērtējot iekaisuma šūnu daudzumu un izvietojumu histoloģiskajos preparātos, konstatējām, ka 6 mēnešus pēc aortas protēzes implantācijas (A grupa) protēzes sienā bija viegls un vidēji smags iekaisums, bet 12 mēnešus pēc aortas protēzes implantācijas (B grupa) protēzes sienā bija smags iekaisums (6. attēls). Līdzīgi Karapinar et al. (2004) vidēji smagu iekaisumu konstatējis sešus mēnešus pēc poliuretāna asinsvadu protēzes implantācijas suņiem. Savukārt, Bashar et al. (2002) implantējot poliestera un nerūsējošā tērauda stentu suņu vēdera aortā arī pēc 12 mēnešiem konstatējis vidēji smagu iekaisumu. Tomēr daži zinātnieki izmantojot poliestera protēzes, jau agrā pēcoperācijas periodā konstatējuši arī smagu iekaisumu protēzē (Aboshady et al., 2012; Orenstein et al., 2012). Piemēram, 2 nedēļas pēc poliestera protēzes implantācijas cūku vēdera aortā, tās sienā konstatēta vidēja līdz smaga iekaisuma pakāpe (Aboshady et al., 2012). Iekaisuma intensitāti protēzes sienā mūsu gadījumā varēja ietekmēt arī protēzes sienas sastāvs un protēzes impregnēšana ar želatīnu, kā to norāda citu pētījumu rezultāti (Meyer et al., 2015; Shindo et al., 2008; Wilhelm et al., 2007).



6. att. Vidējie ( $\pm$  standart kļūda) iekaisuma šūnu rādītāji A un B grupas suņu preparātos/

Fig. 6. Mean ( $\pm$  standard error) inflammatory cell parameters in tissue slides of Dogs from group A and B

\* būtiska atšķirība starp A un B grupu,  $p < 0.05$ /

\* the significant difference between group A and B,  $p < 0.05$



A grupas dzīvniekiem starp protēzes diegiem tika konstatēta vidēji izteikta makrofāgu infiltrācija, bet B grupas dzīvniekiem makrofāgu skaits bija lielāks nekā A grupā. Savukārt svešķermeņa milzu šūnu skaits protēzes sienā A un B grupas suņiem neatšķīrās, un tām bija tendence novietoties ap sintētiskā materiāla pavedieniem. Literatūrā aprakstīta pētījumā, kur poliesterā protēzes implantēja cūku vēdera aortā, jau 2 nedēļas pēc implantācijas protēzes sienā tika konstatēta izteikta makrofāgu infiltrācija (norādīta kā ++++) un neliela milzu šūnu infiltrācija (norādīta kā +) (Aboshady et al., 2012). Arī citos līdzīgos eksperimentos ar dzīvniekiem, makrofāgu un svešķermeņa milzu šūnu klātbūtne poliesterā protēzēs konstatēta trīs mēnešus pēc to implantācijas dzīvnieku aortā, bet autori nemin makrofāgu infiltrācijas intensitāti (de Valence et al., 2012; Scott, Barth, Gaddy, & Ahl, 1994).

Literatūrā norādīts, ka makrofāgu un svešķermeņa milzu šūnu klātbūtne iekaisuma vietā starp sintētisko polimēru protēžu pavedieniem, parasti konstatējama jau pirmo 4 nedēļu laikā pēc to implantācijas un tā var turpināties mēnešiem ilgi, un tiek uzskatīta par raksturīga parādību (Sigler et al., 2005). Cilvēkiem pēc 1 – 6 gadiem eksplantētu poliesterā protēžu sienā konstatēts nozīmīgi augsts makrofāgu, svešķermeņa milzu šūnu un limfocītu skaits, norādot uz hronisku smagu un ļoti smagu iekaisumu (Olofsson et al., 1995).

A un B grupas suņu preparātos tika konstatēta vienmērīga vidēji smaga limfocītu infiltrācija starp protēzes diegiem, kā arī to sakopojumi ar augstu šūnu blīvumu protēzes sienas perifērijā. Aboshady et al. (2012) pētījumā ir konstatēts, ka vidēji smaga limfocītu infiltrācija protēzes sienā tiek konstatēta jau 2 nedēļas pēc cūku vēdera aortas protezēšanas ar poliesterā protēzi. Limfocītu infiltrāciju asinsvadu protēzē parasti novēro sākot ar pirmo nedēļu pēc implantācijas, un tā var saglabāties protēzes sienā līdz pat 50 mēnešiem pēc implantācijas (Schwartz & Henry, 2002). Mūsu pētījumā konstatēta limfocītu novietošanās protēzes sienas perifērijā sakrīt ar literatūrā aprakstīto limfocītu novietojuma raksturu asinsvadu protēžu implantācijas gadījumā un norāda uz saglabātu iekaisumu stimulējošu kairinātāju (Sigler et al., 2005).

Diviem B grupas suņiem (H9D0577, H8K4571) protēzes sienā tika konstatēta izteikta neitrofilo leikocītu infiltrācija, kas varētu norādīt uz iespējamu infekcijas klātbūtni. Par paaugstinātu neitrofilo leikocītu daudzumu protēzes sienā, kurai cēlonis bija mākslīgi inficēta protēze, ziņojis Aboshady et al. (2012). Arī Bellows et al. (2012) konstatējis palielinātu neitrofilo leikocītu skaitu bioloģiska materiāla mākslīgi inficētās protēzēs. Klīniskajā medicīnā asinsvadu protēžu infekcijas esamība pēcoperācijas periodā tiek aprakstīta 5 % gadījumu (Aboshady et al., 2012).

## Imūnhistoķīmisko marķieru pozitīvo struktūru intensitāte protēzes sienā

A grupas suņu protēzes audu preparātos IL10 pozitīvās struktūras iezīmējās salīdzinoši vienmērīgi starp protēzes diegiem makrofāgu un limfocītu infiltrācijas vietās. Redzes laukā konstatēts vidējs daudzums IL10 pozitīvo struktūru. Protēzes neointīmas slānī un saistaudu kapsulā IL10 pozitīvās struktūras iezīmējās mazākā daudzumā. B grupas suņu protēzes audu preparātos IL10 pozitīvās struktūras iezīmējās līdzīgi kā A grupā, bet tomēr to daudzums B grupā bija relatīvi mazāks nekā A grupā (7. attēls).

Par IL10 samazināšanos, implantējot termoplastiskā poliuretāna protēzes žurku vēdera aortā ziņojis arī Brodbeck et al. (2003).

A grupas suņu preparātos IL1ra pozitīvās struktūras pārsvarā iezīmējās starp protēzes diegiem. IL1ra pozitīvo struktūru daudzums bija relatīvi lielāks salīdzinot ar IL10, bet tomēr tas definēts kā vidējs pozitīvo struktūru daudzums redzes laukā. B grupas suņu preparātos IL1ra pozitīvās struktūras iezīmējās starp protēzes diegiem, un to daudzums bija relatīvi mazāks nekā A grupas dzīvnieku preparātos. IL1ra pozitīvo struktūru daudzums B grupā bija mazāks nekā IL10, bet tas joprojām tika definēts kā vidējs daudzums pozitīvo struktūru redzes laukā.

Ir noskaidrots, ka IL10 un IL1ra ekspresijas intensitāti nosaka implantēto sintētisko asinsvadu protēžu materiāla veids un pārklājuma īpašības (Brodbeck et al., 2003).

Literatūrā aprakstītajos pētījumos *in vivo* norādīts, ka IL1 ra nepietiekamība sekmē neointīmas hiperplāziju pēc asinsvadu traumatizācijas (Isoda et al., 2003; Mazighi et al., 2004; Raines & Ferri, 2005). Mūsu iegūtie rezultāti norāda uz līdzīgu sakarību, jo konstatēta vidēji cieša negatīva korelācija starp IL1ra un SMC-actīn pozitīvo struktūru daudzumu ( $r = -0.43$ ;  $p < 0.01$ ).

Mūsu pētījumā TNF- $\alpha$  pozitīvās struktūras bija salīdzinoši vienmērīgi izvietotas starp protēzes diegiem un to kūlīšiem, kā arī fibrozo audu kapsulā. Blīvāka TNF- $\alpha$  pozitīvo struktūru iezīmēšanās bija makrofāgu un limfocītu sakopojumos. A grupas preparātos TNF- $\alpha$  pozitīvo struktūru daudzums bija relatīvi līdzīgs IL1ra daudzumam un tika vērtēts kā vidējs daudzums pozitīvo struktūru redzes laukā (7. attēls). B grupas dzīvnieku preparātos konstatēts daudz TNF- $\alpha$  pozitīvās struktūras redzes laukā un ļoti daudz pozitīvo struktūru konstatēts preparātos ar augstu neitrofilo leikocītu infiltrāciju (7. attēls).

Līdzīgi, TNF- $\alpha$  būtisks pozitīvo struktūru pieaugums, protēzes sienā konstatēts mēnesi pēc poliuretāna protēzes implantēšanas žurku vēdera aortā, salīdzinot ar TNF- $\alpha$  pozitīvo struktūru daudzumu vienu nedēļu pēc minētās protēzes implantācijas (Enayati et al., 2016).

Mūsu pētījumā ar imūnhistoķīmijas metodi noteikto iekaisuma citokīnu ekspresijas daudzums parāda, ka B grupas suņiem, protēzes sienā alternatīvi

aktivēto makrofāgu producētais IL10 un IL1 ra daudzums nespēja pilnībā inhibēt klasiski aktivēto makrofāgu aktivitāti, tādā veidā arī TNF- $\alpha$  produkciju un iekaisuma procesa turpināšanos. Uz to norāda arī pozitīva vāja, bet statistiski nozīmīga korelācija starp TNF- $\alpha$  pozitīvo struktūru daudzumu un iekaisuma klasi ( $r = 0.24$ ;  $p < 0.05$ ) un TNF- $\alpha$  un makrofāgu skaitu preparātos ( $r = 0.26$ ;  $p < 0.05$ ), kā arī IL1ra vāja un negatīva, bet statistiski nozīmīga korelācija ar iekaisuma klasi ( $r = -0.25$ ;  $p < 0.05$ ) un makrofāgu vidējo skaitu preparātos ( $r = -0.30$ ;  $p < 0.01$ ).

Pastiprināta TNF- $\alpha$  atbrīvošanās no dažādu izoformu poliuretāna aktivētiem makrofāgiem konstatēta arī citā pētījumā, kurā noteikta poliuretāna ietekme uz makrofāgu aktivitāti (Ma, Petit, Yahia, Huk, & Tabrizian, 2002).

Literatūrā norāda, ka iekaisuma reakcija, proti, makrofāgu, limfocītu, milzu svešķermeņa šūnu infiltrācija, TNF- $\alpha$ , IL10 un IL1 ra sekrēcija ir raksturīga organisma imūnsistēmas reakcija, kura rodas sintētiska materiāla protēzes implantēšanas gadījumā (Anderson & Jiang, 2017; Anderson et al., 2008; Kzhyshkowska et al., 2015; Sheikh et al., 2015; Velnar et al., 2016).

Pozitīvās VEGF struktūras aortas protēzes sienā iezīmējās starp protēzes diegiem, vietām saistaudu kapsulā un tās tuvumā esošajos asins kapilāru endoteliocītos. A grupas suņu protēzēs VEGF pozitīvo struktūru daudzums redzes laukā tika vērtēts kā vidējs daudzums. B grupas suņu protēzes sienā pozitīvās VEGF struktūras iezīmējās blīvāk un tika definētas kā daudz VEGF pozitīvo struktūru redzes laukā.

Līdzīgi VEGF pozitīvo struktūru pieaugums konstatēts arī testējot termoplastiskā poliuretāna protēzes žurku vēdera aortā. (Enayati et al., 2016).

Mūsu gadījumā B grupas suņiem konstatētais VEGF pozitīvo struktūru daudzums liecina par saglabātu audu hipoksiju protēzes sienā, kā to norāda arī citi autori (Greenberg et al., 2008; Kendall & Feghali-Bostwick, 2014; Kwee & Mooney, 2015).

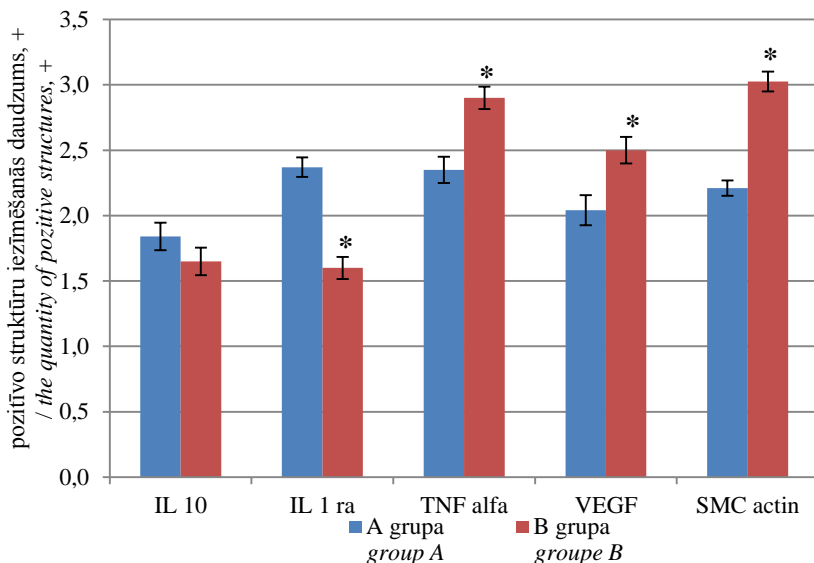
VEGF pieaugumu B grupas suņu protēzes sienā, domājams, sekmēja ne tikai lokāla hipoksija tajā, bet arī hroniskā iekaisuma process, jo daudzi zinātnieki norāda, ka VEGF sekrēciju ierosina arī iekaisuma procesā iesaistītās šūnas un citokīni (Boersema et al., 2016; Camaré et al., 2017; Carmeliet & Jain, 2011; Kwee & Mooney, 2015; Liu et al., 2014; Scaglione et al., 2011). Mūsu gadījumā starp TNF- $\alpha$  un VEGF pozitīvo struktūru daudzumu tika konstatēta pozitīva vāja, bet statistiski nozīmīga korelācija ( $r = 0.28$ ;  $p < 0.01$ ).

Ir zināms, ka VEGF ierosina arī gludo muskuļšūnu proliferāciju (Parenti, Bellik, Brogelli, Filippi, & Ledda, 2004), ko novērojām arī mūsu pētījumā kā VEGF un SMC-actin pozitīvo struktūru pozitīvu korelāciju ( $r = 0.31$ ;  $p < 0.01$ ).

Mūsu pētījumā aortas protēzes sienas preparātos SMC-actin lielākoties pozitīvi iezīmējās protēzes neointīmas pamatslānī un saistaudu kapsulā. Tika konstatēta arī pozitīva SMC-actin iezīmēšanās protēzes neointīmu sedzošo endotēlija šūnu kodolos, kā arī kapsulas tuvumā esošajos asins kapilāru

endotelociītos. A grupas suņu preparātos konstatēts vidējs daudzums SMC–actin pozitīvo struktūru redzes laukā (7. attēls). B grupas suņu aortas protēzes sienā konstatēts daudz SMC–actin pozitīvo struktūru redzes laukā (7. attēls).

Citos pētījumos SMC–actin neointīmā konstatēts jau agrāk pēc aortas protezēšanas. Piemēram, poliesterā un politetrafluoretilēna kombinētās protēzēs, kas implantētas suņu vēdera aortā, SMC–actin protēzes neointīmā nevienmērīgi iezīmējas jau 4 nedēļas pēc implantācijas (Bhattacharya et al., 2000), bet poliesterā protēzēs 8 nedēļas pēc implantācijas (Wu et al., 1997). Savukārt, žurkām četras nedēļas pēc poliuretāna protēzes implantācijas vēdera aortā, SMC–actin marķieris pozitīvi iezīmēja neointīmas pamatslāņa gludās muskuļšūnas, kā arī endotēlija šūnu kodolus, kas vienā slānī pārklāja visu



7. att. **Imūnhistoķīmisko marķieru pozitīvo struktūru daudzums aortas protēzes sienā A un B grupas suņiem, vērtējot ar semikvantitatīvo metodi**  
 Grafikā, lai attēlotu pozitīvo struktūru daudzumu, kas vērtēts ar (-), (+), (++) , (+++) un (++++) apzīmējumiem piešķirtas skaitliskās vērtības (-) = 0, (+) = 1, (++) = 2, (+++) = 3 un (++++) = 4. \* būtiska atšķirība salīdzinot A un B grupas rezultātus  $p < 0.05$

**Fig 7. The quantity of positive structures of immunohistochemical marker expression in the wall of aortic prosthesis in dogs of group A and B assessed by a semiquantitative method**

In the graph, to represent the quantity of positive structures evaluated with (-), (+), (++) , (+++) and (++++) denominations assigned numeric values (-) = 0, (+) = 1, (++) = 2, (+++) = 3 and (++++) = 4. \* The significant difference between the results of groups A and B  $p < 0.05$

neointīmu (Jeschke et al., 1999; Zhang et al., 2004). Pozitīvi vērtējam faktu, ka mūsu pētījumā šūnu kodoli, kas sedza visu protēzes iekšējo virsmu bija SMC-actin pozitīvi. Tas apliecina, ka šīs šūnas patiešām ir endotēlija šūnas, kā to aprakstījuši pētnieki Kim et al. (2014) un Ueberrueck et al. (2005). Intensīva SMC-aktin klātbūtne neointīmā varēja sekmēt neointīmas biežuma pieaugumu B grupas dzīvniekiem un liecina par gludo muskuļšūnu aktīvu proliferāciju, kā to norāda Curcio et al. (2011) un Filipe et al., (2018).

Salīdzinot imūnhistoķīmisko marķieru pozitīvo struktūru daudzumu starp A un B grupām konstatējām būtisku TNF- $\alpha$ , VEGF un SMC-actin pozitīvo struktūru daudzuma palielināšanos B grupas dzīvnieku preparātos ( $p < 0.01$ ). Savukārt IL1ra pozitīvo struktūru daudzums B grupā bija būtiski samazinājies ( $p < 0.01$ ), bet atšķirība IL10 pozitīvo struktūru daudzumā A un B grupā netika konstatēta ( $p > 0.05$ ).

Medicīnā, lai kontrolētu pret svešķermeni vērsto iekaisuma reakciju pēcoperācijas periodā, tiek izmatoti dažāda veida protēžu pārklājumi, kā arī imūnsistēmu ietekmējoši, iekaisuma reakciju inhibējoši medikamenti (Brodbeck et al., 2003; Chen et al., 2005; Chong et al., 2015; Kzhyshkowska et al., 2015; Mazighi et al., 2004). Mūsu pētījumā šādi medikamenti pēcoperācijas periodā netika izmantoti.

Noslēgumā jānorāda, ka esam veikuši plašu un kompleksu implantētās vēdera aortas protēzes ietekmes uz suņa organismu izvērtēšanu. Apkopotie klīniskās, vizuālās, histoloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti kopumā liecina par sekmīgu testētās aortas protēzes integrāciju un funkcionēšanu suņa vēdera aortā pētījuma laikā.

## SECINĀJUMI

Veicot eksperimentālu RTU ražoto inovatīva kompozīta materiāla aortas protēžu kompleksu biointegrācijas novērtējumu suņu vēdera aortā 6 un 12 mēnešus pēc šīs protēzes implantācijas secinājām:

1. Vēdera aortā implantētā protēze neradīja (klīniski konstatējamus) apasiņošanas traucējumus attiecīgajam reģionam visā pēcoperācijas laikā un neatstāja negatīvu ietekmi uz vispārējo suņu klīniskās veselības stāvokli.
2. Implantēto protēžu diametrs pētījuma laikā būtiski nemainījās, tomēr maksimālais asins plūsmas ātrums sistolē protēzes daļā, A grupas dzīvniekiem, pirmajā mēnesī pēc implantācijas būtiski palielinājās. Asins plūsmas ātrumam bija tendence pieaugt visā eksperimenta laikā, pārsniedzot fizioloģiskās normas robežvērtību, kas klasificējama kā viegla aortas stenoze.
3. Sešu un divpadsmit mēnešu laikā pēc implantācijas, aortas protēzes spēja pilnīgi inkorporēties suņu vēdera aortas segmentā un visu protēžu iekšējo virsmu sedza endotēlijs, kas anastomožu vietās bija uzbiezināts (veidojās neointīmas hiperplāzija).
4. Iekaisuma aina protēzes sienā norāda uz protēzes radīto svešķermeņa reakciju, kas pastiprinājās pieaugot pēcoperācijas laikam un raksturojās galvenokārt ar makrofāgu skaita pieaugumu. Pieaugot makrofāgu skaitam preparātos, samazinājās iekaisuma inhibējošo marķieru IL10 un IL1 ra, bet palielinājās iekaisumu veicinošā marķiera TNF- $\alpha$  ekspresija.
5. VEGF relatīvā daudzuma pieaugums 12 mēnešus pēc implantācijas apstiprina hipoksijas persistenci aortas protēzes sienā, bet SMC-actin relatīvā daudzuma pieaugums norāda uz gludo muskuļšūnu proliferatīvās aktivitātes palielināšanos protēzes sienā, pieaugot pēcoperācijas laikam.
6. Vēdera aortas protezēšana šajā pētījumā diviem suņiem komplicējās ar iespējamu infekcijas klātbūtni protēzes sienā un diviem suņiem ar aneirismas izveidi protēzes sienā, kas konkrētajos gadījumos saistāma ar maksimālā asins plūsmas ātruma sistolē paaugstināšanos protēzes daļā virs 235 cm/sek.

## IETEIKUMI PRAKSEI

1. Eksperimentālu un klīnisku ķirurģisku manipulāciju veikšanai suņu vēdera aortā, iesakām izmantot retroperitoneālu pieeju tās salīdzinoši tehniskās vienkāršības un ērtuma dēļ.
2. Veterinārmedicīnā klīniskajā praksē, veicot vēdera dobuma orgānu ultrasonogrāfisko izmeklēšanu, iesākam izmeklēt un novērtēt arī vēdera aortas diametru un maksimālo asins plūsmas ātrumu sistolē.
3. Iekaisuma procesa analīzei audu preparātos, iesakām izmantot iekaisumu medītējošu un inhibējošu citokīnu noteikšanu, lai precīzāk spriestu par iekaisuma šūnu aktivitāti un organisma spēju nomākt iekaisuma procesu.
4. Ieteicami arī turpmāki eksperimentāli pētījumi asinsvadu protēžu izpētē.

# INTRODUCTION

## Topicality of the work

Cardiovascular diseases are ones of the most commonly diagnosed diseases in humans and are often associated with the potential for premature death. This type of disease also includes abdominal aortic aneurysm (increase of the local lumen of abdominal aorta by 50%). In the human population, the incidence of aortic aneurysms in Europe is 4.8% (Li et al., 2013). In the event of a rupture, up to 75% of people can die without being able to initiate an emergency treatment (Fleming et al., 2005; Lesperance et al., 2008). Therefore, the focus in medicine is on the timely diagnosis and treatment of aortic aneurysm. The golden standard is still considered to be a surgical replacement of the abdominal aortic aneurysms with synthetic material prostheses (Bacharach et al., 2015). Despite the many years of experience in the use of synthetic polymers in vascular reconstruction, postoperative complications are still observed. They are often associated with the non-compliance of the prosthesis biomechanical qualities compared to the natural blood-vessel walls, development of neointimal hyperplasia, deformation of the prosthesis, infection, and others (Abbott et al., 1993; Kakkos et al., 2016; Sarkar et al., 2007; Vartanian & Conte, 2015). Therefore, scientists around the world are still trying to improve already existing prostheses and develop new innovative ones with the aim of minimizing the incidence of complications after the implantation. In order to introduce any developed vascular prosthesis in medicine, it is necessary to initially test it *in vitro* and *in vivo* (Byrom, Bannon, White, & C Ng, 2010; Liu, Ong, Fukunishi, Ong, & Hibino, 2018; Swartz & Andreadis, 2013).

The biomechanical properties of the synthetic vascular prostheses made at the Riga Technical University (RTU) have been extensively studied *in vitro* (Gupta & Kasyanov, 1997; Kasyanov, Ozolanta, Kadish, Ozol, & Stradin, 2001; Kasyanov, Ozolanta, Purinya, Ozols, V., 2003). Just in some fragmentary studies, in collaboration with the Latvian University of Agriculture, these prostheses have been studied for biological compatibility using experimental animals (Kanceviča, Feldmane, & Auzāns, 2004).

In the previous *in vivo* experiments in Latvia, small-diameter vascular prostheses were used, which were proposed mainly for the repair of peripheral vascular disorders. A new type of composite material for the synthetic prosthesis of the major blood vessels, including the abdominal aorta, was created at RTU. In order to use these innovative aortic prostheses in the medicine, there was an acute need for a comprehensive examination of them using experimental animals.



## **Hypothesis of the research**

The new type of aortic prostheses woven from a composite synthetic material is able to biointegrate in the organism after implantation and provide an adequate blood supply to the caudal region of the body.

## **Research theses**

1. The new composite polyester and polyurethane aortic prosthesis after implantation in the dog's abdominal aorta provides normal blood supply to the circulatory region and does not adversely affect the general health status of the animal.
2. The live tissue is able to integrate successfully into the aortic prosthesis after implantation in the dog's abdominal aorta.
3. Inherent foreign body reaction directed to synthetic polymers develops in the prosthesis wall after implantation.
4. The expression of inflammatory cytokines in the aortic prosthesis wall depends on the amount and type of inflammatory cells in it.

## **The aim of the research**

The aim of the study is to test the synthetic aortic prosthesis of a new composite material developed by the Riga Technical University for biointegration capabilities in the dog's abdominal aorta.

## **The objectives of the doctoral thesis**

1. Investigate the effect of aortic prosthesis on the general health status of dogs after implantation.
2. Determine the diameter of the dog's abdominal aorta and prosthesis and blood flow velocity at different time intervals after the implantation of the prosthesis.
3. Perform macroscopic evaluation of explanted prosthesis and analyze the microscopic tissue elements of the prosthetic wall.
4. Analyze the intensity of expression of the immunohistochemical markers characterizing the inflammation in the prosthesis wall.
5. Evaluate the activity of smooth muscle cells and the supply of oxygen in the prosthesis wall.
6. Find out the possible complications of prosthetic surgeries of abdominal aorta.

## **Scientific novelty of the research**

For the first time in Latvia, an experiment on the biointegration of an innovative synthetic aortic prosthesis, developed and produced in RTU, in a dog's abdominal aorta was carried out. As well in this study, a wide range of diagnostic methods were used to evaluate the complex implications of the implanted prosthesis on the physiological parameters of the organism.

The results of this experiment could serve as a starting point for further research in the development, testing and approbation of aortic prostheses for use in medicine and veterinary medicine.

## **Personal contribution**

1. Participation in an interdisciplinary project and studying the manufacturing technique of the aortic prosthesis used in the present study.
2. Routine daily monitoring and care of experimental animals throughout the study.
3. Assistance in all implantation operations and postoperative monitoring of animals.
4. Performing clinical trials throughout the study and obtaining samples for laboratory analysis.
5. Participation in all visual diagnostic examinations.
6. Pathological examination of the organs and the prosthetic region.
7. Collecting samples of tested aortic prostheses, macroscopic examination and sample preparation for histological and immunohistochemical examination.
8. Practical learning of histological and immunohistochemical methods and preparation of tissue specimens for histological and immunohistochemical examination.
9. Evaluation of histological and immunohistochemical tissue specimens.
10. Obtaining, analysis and statistical processing of clinical, laboratory, visual diagnostic, pathological, histological, immunohistochemical investigation results.

## **Structure and volume of doctoral thesis**

The doctoral thesis is summarized on 127 pages including 62 Figures and 11 Tables. It consists of annotation, introduction, literature review, material and methods, research results, discussion, 6 conclusions, theses for defense, recommendations for practice, list of references (282 sources of literature), and 12 appendices.

## MATERIAL AND METHODS

### Location and time of the research, characteristics of the research object

The study was performed at the Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Life Sciences and Technologies, from July 19, 2011 to October 30, 2012. The experiment was confirmed by the Food and Veterinary Service of the Republic of Latvia (No. of license 36).

Nine female Beagle dogs, 1 – 3 years old, weighing 8.5 – 10.75 kg were purchased from experimental animal breeding organization in France and used in this study. Throughout the study period, animals were kept in a specially adapted and reconstructed room in accordance with animal welfare requirements at the Clinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine. In the room, each animal was kept in its separate cage. In addition, all dogs were regularly taken out every day in a 64 m<sup>2</sup> fenced walk-area, in which they freely moved. Dogs were fed twice a day with Bewi Dog Basic Croc commercially produced dry food. The dietary dose was determined taking into account the body weight of the dogs and according to the manufacturer's instructions on the package. Drinking water was available *ad libitum*.

The clinical and laboratory examination of animals were carried out at the Clinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Life Sciences and Technologies. The preparation and investigation of histological and immunohistochemical samples were carried out at the Morphofunctional Laboratory of the Preclinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine of the Latvia University of Life Sciences and Technologies, Laboratory of Morphology of the Institute of Anatomy and Anthropology of the Riga Stradiņš University, Institute of Pathology of the Riga Stradiņš Hospital, Department of Morphology and Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Liege.

During the doctoral studies, a new structure of composite material aortic prosthesis, developed at the Riga Technical University Biomaterials and Biomechanics Institute in the Biotechnological Research Laboratory, was tested. Aortic prostheses were made using weaving technology and biocompatible with the surrounding tissue, inert, non-toxic and mechanically compatible polyester and polyurethane complex yarns. The prostheses were made by using three interconnected layers of hollow thread (Lukyanchikov & Kantsevicha, 2010a, 2010b). Using threads of different lengths in tissue yarns, pores of different sizes (from 1.0 to 3.0 mm) were formed in the aortic prosthesis wall, which better ensure the unorganized ingrowth of live tissue in unorganized form. In order to improve the rheological properties of this prosthesis, they were impregnated in a vacuum at 90 °C with a biologically

active composition (10 – 11% gelatin and 12 – 14% glycerin) (Lukyanchikov & Kantsevicha, 2010a, 2010b).

## **Scheme of the study**

In a clinical trial, 9 female, 1 to 3 years old Beagle dogs were used. To find out the structural (endothelium, connective tissue, smooth muscle growth, etc.) and functional (blood flow to the prosthesis, etc.) changes in the integration process of the aortic prostheses during the time period, the experimental animals were divided into two groups:

- Group A – 5 animals in which the aortic prosthesis was implanted for 6 months;
- Group B – 4 animals in which the aortic prosthesis was implanted for 12 months.

A full clinical, laboratory, and visual diagnostic examination were performed in all dogs before the implantation of aortic prosthesis. The innovative aortic prostheses of 5.00 to 8.00 mm in diameter and 9.00 mm to 20.00 mm in length were retroperitoneally implanted in the abdominal aorta in animals of both groups. A regular daily general clinical examination of operated animals was performed after surgery and an ultrasonography examination of aortic prosthesis and measurement were performed once a month till the end of the study. In six dogs (five from group A, one from group B), blood pressure was measured before surgery and once a month in six consecutive months after surgery. Before euthanasia, a full clinical, laboratory and visual diagnostic examination was repeatedly carried out in all dogs.

Animals from group A were euthanized 6 months after implantation of the artificial blood vessel, and animals from group B - 12 months after surgery. After euthanasia, an autopsy and inspection (research) of abdominal aortic prosthesis region were performed. Then, the prosthesis segment was resected and samples were in a neutral 10% formalin solution. Slides were made from the obtained samples for histological and immunohistochemical analysis.

## **Examination and manipulations performed of experimental animals for evaluation of general state of health before and after surgery**

All animals used in the experiment after being brought to the Faculty of Veterinary Medicine were quarantined and observed during 1 month. Before the operation, all animals were clinically examined in accordance with the generally accepted principles (Jemeljanov, Manevich, & Dūrītis, 2007; Mccurnin & Bassert, 2006; Nelson & Couto, 2009). In each dog, a blood sample from the vein of the forelimb (*v. cephalica humeri*) was collected for laboratory examination.

To verify that the internal organs are clinically healthy in all dogs, an ultrasonography and x-ray examination of the chest and abdominal cavity was performed using a common methodology (Mattoon & Nyland, 2014).

All dogs were deprived of food for twelve hours and drinking water for five hours before the surgery.

The dogs were weighed shortly before surgery and body temperature, respiratory rate and pulse rate were recorded in the operation protocol. Antibiotics enrofloxacin (Enroxil 5 mg 100 mL<sup>-1</sup> or 10 mg 100 mL<sup>-1</sup>), in dosage of 5 mg kg<sup>-1</sup> were injected intramuscularly according to the body weight of the dogs. Non-steroidal anti-inflammatory drug meloxicam (Loxicam) 0.2 mg kg<sup>-1</sup> were administered orally. For premedication 0.1 mg 100 mL<sup>-1</sup> atropine sulphate in dosage of 0.02 mg kg<sup>-1</sup> and 1 mg 100 mL<sup>-1</sup> acepromazine maleate in dosage of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> were administered intramuscularly. For induction of anesthesia 0.5 mg 100 mL<sup>-1</sup> diazepam in dosage of 25 mg kg<sup>-1</sup> and 10 mg 100 mL<sup>-1</sup> ketamine in dosage of 10 mg kg<sup>-1</sup> were administered intravenously. During the operation, an inhalation anesthetic isoflurane was administered.

After surgery, all dogs received 5 mg 100mL<sup>-1</sup> or 10 mg 100mL<sup>-1</sup> enrofloxacin in dosage of 5 mg kg<sup>-1</sup> and meloxicam in dosage of 5 mg kg<sup>-1</sup> once a day for seven days according to the body weight. Tramadol hydrochloride "Tramadol" 4 mg kg<sup>-1</sup> has been used 2 – 3 times per day for five days. Twice a day wounds were cleaned with 3 mg 100 mL<sup>-1</sup> hydrogen peroxide or sodium chloride 0.9 mg 100 mL<sup>-1</sup> solution or povidone iodine solution. Sutures were removed after 14 days.

In the first week of the postoperative period, each animal was clinically examined on a regular basis twice a day. Later, the general clinical examination was performed once a day. The following parameters have been evaluated: the posture and gait, temperament, appetite, water drinking, defecation, urination, body temperature, respiratory rate, heart rate, mucous membranes, capillary refilling time. In order to assess whether implanted aortic prosthesis had an effect to the movement activity and amplitude, these parameters were regularly evaluated, especially in the caudal part of the body and in the hind limbs.

### **Examination of Blood Samples**

Blood samples were obtained according to aseptic principles from the front limb vein (*v. cephalica humeri*). For a hematological examination, 2 mL of blood were collected in a "Standard Monovette" tube containing an anticoagulant EDTA. For the serum biochemical examination, 3 – 5 mL of blood were collected in a "Standard Monovette Serum" tube. The tubes were labeled and stored in the refrigerator for maximum of 4 hours till the examination.

The hematological examination of the blood samples were performed by using the "BC – 2800 Vet autohematology analyzer" produced by the company "Mindray". The following parameters were defined: total white blood cell count  $10^{12} \text{ L}^{-1}$ , total red blood cell count (RBC)  $10^{12} \text{ L}^{-1}$ , hemoglobin (HGB)  $\text{g L}^{-1}$ , hematocrit (HCT) %, mean corpuscular volume (MCV) fl, mean corpuscular hemoglobin (MCH) pg, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)  $\text{g L}^{-1}$ , platelet count (PLT)  $10^9 \text{ L}^{-1}$ , thrombocytocrit PCT,%. The leukocyte formula (leukogram) was determined by microscopy of the blood specimen prepared and colored with Diff Quik colors in the laboratory of the Clinical Institute.

The biochemical analysis of blood serum was performed by Johnson & Johnson Company Orth–Clinical Diagnostics device "Vitros Chemistry System DT6011". The following parameters were determined for general health status evaluation in the pre- and postoperative controls of experimental animals: urea, creatinine, total bilirubin, total protein, albumin, ALAT, ASAT, alkaline phosphatase, alpha-amylase.

### **Radiological and ultrasound examination of animals**

Before the implantation of the aortic prosthesis and before euthanasia of dogs, the abdominal cavity in all of them was examined using ultrasonography according to the generally accepted methodology (Mattoon & Nyland, 2014), and by using the PHILIPS HD 11 ultrasound system (Model No.:MCMD02AA, manufactured at Sronno, Italy) with 3.5 to 7.5 MHz sectorial probe.

Before the implantation of the aortic prosthesis and before euthanasia of the dogs, they were x-ray examined by using the PHILIPS COSMOS BS device. Radiographs have been performed for the general health status control of the thoracic and abdominal organs. Chest and abdominal radiographs were made in each dog in the lateral and dorso-ventral position. The chest radiographs were made using parameters of 48 kV and 3.20 mAs, and the radiographs of the abdominal cavity – 46 kV and 5.00 mAs (Thrall, 2013).

### **Blood pressure examination of experimental animals**

Systolic and diastolic blood pressure were measured using the High Definition Oscillometry (HDO) device. The animal was placed in a comfortable position in a quiet room. To reduce the effect of stress on the blood pressure measurement results, about five minutes were allotted until the dogs got used to the new conditions. Measurements were done with the first size dog cuff (as indicated in the manual attached to the device) by putting it around the base of the tail. During the measurement, the part of the body with the cuff was placed on the heart level (+/- 10 cm) (Egner, Carr, & Brown, 2007). Five measurements were obtained in one examination time and the average was calculated for the use of subsequent statistical calculation. Blood pressure measurements were obtained before surgery and once a month during 6 months after surgery.

### **Surgery Technique**

The aortic prosthesis implantation in the abdominal aorta was done using retroperitoneal approach during the surgery. Animals were positioned on the operating table in the right lateral recumbency. Surgery area – starting from the last left rib region to the hip joint level and from the lumbar vertebrae to the *linea alba* was prepared according to the generally accepted principles of aseptic technique. A horizontal 10 – 12 cm long skin cut was done parallel to the lumbar vertebrae below the longest dorsal muscle (*M. longissimus dorsi*) and caudally from the last left rib. Next, abdominal external oblique muscle (*M. obliquus externus abdominis*), internal abdominal oblique muscle (*M. obliquus internus abdominis*) and abdominal transverse muscle (*M. transversus abdominis*) were cut to access the abdominal aorta without cutting peritoneum. An average of 5.00 – 6.00 cm long abdominal aortic segment was dissected from the surrounding connective tissue. The manipulations with abdominal aorta were performed between the point of the branching of the renal arteries (*aa. renales*) and the point of aortic bifurcation into the common iliac arteries (*aa. iliaca communis*).

The blood flow in the abdominal aorta was stopped with two vascular clamps, about 3 to 4 cm from each other. After that, a perpendicular cut to the longitudinal axis of the aorta was done and some of its segment dissected, and RTU manufactured aortic graft was implanted. The diameter of the implanted prosthesis in group A was 5.00 mm in two dogs, and 8.00 mm in three dogs, while in group B it was 5.00 mm in all dogs. The length of the implanted prosthesis was from 9.00 mm to 20.00 mm. The diameter of the prosthesis was adjusted to the diameter of the resected aorta. Three minutes before this action, heparin was administered intravenously. Then clamps one after another were

removed, by controlling bleeding from the anastomoses. In case of bleeding from the connection place between aortic wall and prostheses, extra sutures were used to provide tightness. Aortic and graft ends were sutured with unabsorbable thread 'Premilene' 7/0, muscles and subcutaneous tissues with absorbable thread 'Serafit' 2/0, but the skin with 'Supramide' 3/0 thread. It should be noted that aortic prosthetic surgery in dogs was performed in conjunction with a medical microsurgery specialist.

## **Determination of diameter and the peak blood flow velocity in systole in abdominal aorta and prosthesis**

Ultrasound imaging was performed using a Philips HD11 device (Model No.: MCMD02AA, Soronno, Italy). A linear transducer 3.5 – 7.5 MHz (Philips L12-3, Bothell, WA 98041 USA) was used for assessment of measurements of the peak blood flow velocity in systole and aortic and prosthesis diameter.

The diameter of the abdominal aorta and its prosthesis, as well as the peak blood flow velocity in systole, were determined in the lumbar region. In order to facilitate the investigation, animals received intramuscular injection of acepromazine maleate 0.1 mg per kg of body weight.

Ultrasonography of the abdominal aorta segment was performed in all dogs, 3 days before surgery and once a month postoperatively till the end of the study period. The constant localization of the assessment was between the point of the branching of the renal arteries and the point of aortic bifurcation into the common iliac arteries. During the ultrasound examination, dogs were placed in the right lateral recumbency. Before surgery, the blood flow velocity of the abdominal aorta was measured at one site, but after the surgery - at three sites: cranially and caudally from the aortic prosthesis and in the middle of aortic prosthesis (Figure 1). The cross-section diameter measurements of the abdominal aorta were done at the same site simultaneously with velocity measurements (Figure 1).

Measurements of the blood flow peak systolic velocity were taken using pulsed-wave Doppler in real-time B-mode imaging. The angle of probe was corrected to obtain the view of the longitudinal axis of the blood flow (Bonagura & Fuentes, 2015). Three random peaks were used to determine the mean values. To measure the diameter of the abdominal aorta and aortic prosthesis, cursors were placed in the middle of the aortic and aortic prosthesis wall for 2D imaging. The complementary transverse diameter of the aorta section was examined by M-mode.



## **Animal euthanasia, autopsy and macroscopic examination of aortic prosthesis**

All animals from group A were euthanized 6 months after the implantation of the aortic prosthesis, and all animals from group B – after 12 months. Before the euthanasia, a complete clinical examination, blood sampling and analysis, ultrasonographic and X-ray examination were performed in all dogs according to the methods described above.

During the complete anesthesia (see Chapter 1.3), dogs were euthanized administering Dorminal (active substance – Na pentobarbital) 200 mg kg<sup>-1</sup> intravenously according to the animal body weight.

After euthanasia, an incomplete necropsy was carried out for macroscopic evaluation of internal organs and surgery area. Then, the aortic prostheses (including the parts of abdominal aorta cranially and caudally from prosthesis) were explanted. The explanted prosthetic segments, according to Ueberrueck et al. (2005), were evaluated for prosthesis lumen permeability, intensity of neointimal formation, intensity of formation of connective tissue capsule, adhesions, neoplasms, possible deformations of the aortic prosthesis.

The explanted aortic prostheses were evaluated according to the following scheme:

1) Prosthetic lumen:

- lumen is free;
- lumen is partially blocked (due to neointimal hyperplasia, clots or other factors);
- lumen is completely blocked (due to neointimal hyperplasia, clots or other factors).

2) Degree of neointima formation:

- neointima covers the entire surface of the prosthetic lumen;
- neointima partly covers the surface of the prosthetic lumen.

3) Formation of the connective tissue capsule:

- connective tissue capsule completely covers the prosthesis, pronounced connective tissue formation;
- connective tissue capsule completely covers the prosthesis, medium connective tissue formation;
- connective tissue capsule partly covers the prosthesis, poorly defined connective tissue formation

(Ueberrueck et al., 2005).

The diameter, length of prosthesis and thickness of the prosthetic wall was measured using the electronic sliding caliper LIMIT (accuracy 0.01 mm). After that, the resected segments of abdominal aorta (including prosthesis) were

immediately placed in a 10mg 100mL<sup>-1</sup> neutral formalin solution to obtain samples for histological and immunohistochemical examination.

## **Microscopic examination of the explanted aortic prosthesis**

### **Tissue preparation for microscopic examination**

For microscopic examination, one original sample was obtained from each dog and fixed in 10 mg 100mL<sup>-1</sup> neutral formalin solution for at least 4 days at room temperature. Subsequently, each sample of prosthesis was transversally cut in the middle point; therefore, cranial and caudal parts of the original sample were obtained. Each of these parts consisted of a half of aortic prosthesis, anastomosis and a part of the normal abdominal aorta. Then, each cranial and caudal sample were cut in half in the longitudinal direction. Next, from each dog, one cranial and one caudal sample were dehydrated in the tissue processor (TISSUE-TEK II) and locked in paraffin blocks using a standardized histological preparation procedure (Kiernan, 2008) so that the two longitudinal edges of the prosthesis and vessel were directed on the cutting surface of the paraffin block. In all, 18 tissue samples from the experimental dogs were locked in paraffin blocks. Then, 5 µm thick cuttings were obtained from each sample piece using the SLEE CUT 5062 microtome and placed in a warm water bath. Subsequently, the tissue sections were put on degreased slides (two cuts on each slide) and dried at 38 °C for 24 h.

### **Histological examination of tissue slides**

The hematoxylin and eosin (H & E), and Van Gieson staining methods were used to prepare the tissue slides for evaluation of the overall histological profile, inflammatory cells and connective tissue infiltration. Of each dog, two slides from the cranial and two from the caudal sample parts were stained with both methods mentioned above. Tissue specimens were stained according to the generally accepted H & E, Van Gieson staining protocols (Kiernan, 2008). In total, 144 tissue cuts were prepared for histological examination and evaluated, 72 of which were stained with hematoxylin and eosin, and 72 tissue cuts using the Van Gieson method.

Histological slides were investigated with Leica CTR 500 multifunctional microscope with Leica DFC 490 camera. A synchronized computer program Image-Pro Plus 6.1 was used to obtain images of tissue slides and provide examination and measurements.

H & E slides have been evaluated for a general histological overview of tissue incorporation. Cell infiltration was evaluated at 400x of magnification. The intensity of inflammation was determined under supervision of a qualified

specialist of pathological anatomy based on the degree of intensity and location of macrophages, lymphocytes, foreign body giant cells and neutrophil leukocyte infiltration.

According to that, a marking grade from 1 to 4 was used:

- 1 – mild inflammation,
- 2 – moderate to severe inflammation,
- 3 – severe inflammation,
- 4 – very severe inflammation.

(Bellows, Wheatley, Moroz, Rosales, & Morici, 2012; Jayanth et al., 2015; Orenstein, Saberski, Kreutzer, & Novitsky, 2012; Pierce et al., 2009).

An inflammatory cell count was also established. Inflammatory cells were counted in five representative, randomly selected fields of view with an average area of  $71,404 \pm 79.06 \mu\text{m}^2$ . To evaluate inflammatory cells, visual fields were selected between prosthetic threads or near them. Macrophages, lymphocytes, giant cells of a foreign body, neutrophil leukocytes were counted at 400x of magnification.

In tissue slides, the intensity of capillary formation in the prosthesis wall was also determined. Capillaries were counted in five randomly selected fields of view at 200x of magnification (Bashar et al., 2002; de Valence et al., 2012; Jeschke, Hermanutz, Wolf, & Köveker, 1999). Researchers of the present study also evaluated the amount of connective tissue and fibers in the prosthesis wall and capsule.

In the tissue slides, stained with Van Gieson method the dominant type of connective tissue and its proliferation intensity was evaluated. The thickness of the media, intima/neointima and connective tissue capsules were measured in  $\mu\text{m}$  in three to five fields of view. In each field of view, at least five measurements were performed (Jeschke 1999, Valence 2012). The thickness of the media was measured at 10x magnification in the abdominal aorta cranially from the prosthesis, caudally from prosthesis, in the cranial and caudal prosthesis – abdominal aortic anastomosis, as well as in the middle of synthetic prosthesis. Intima and connective tissue capsule were measured at analogue sites as media, using 400x magnification. The thickness of the media in the aorta and anastomoses was measured as the distance between the innermost and outermost elastin layers. The thickness of the media in the prosthesis was measured as the distance between the border of neointima and the border of connective tissue capsule (directed closer to the prosthesis filaments) (Bashar 2002). Thickness of neointima in the middle of the prosthesis was measured as the distance from the neointimal luminal surface to the synthetic filaments of the prosthesis (Zippel et al., 2008). To exclude the influence of the histological cut plane on media and intima/neointima thickness, the measurements of media

and intima/neointima were also expressed as a percentage of total media and intima/neointima thickness.

### **Immunohistochemical examination of tissue slides**

The tissue sections intended to detect immune reactive structures were put onto slides with silicone surface (Histo Bond®) to provide better tissue adhesion to the slide during the reaction. Then the slides were dried at for 44 ° C for 12 h.

The following immunoreactive structures have been identified in this study:

- 1) Smooth muscle cell actin (Dako Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4, code M0851; Daco Cytomation, Denmark) to identify neointimal cells and their proliferation.
- 2) Interleukin 1 receptor antagonist (IL1ra (Q-19)): sc-8481, Santa Cruz Biotechnology, Inc. United States) to identify the intensity of IL 1 $\alpha$  and IL1  $\beta$  cytokines, since IL1 ra binds to both of the mentioned interleukins.
- 3) Tumor necrosis factor  $\alpha$  (Rabbit polyclonal to TNF- $\alpha$  antibody, No. orb7100, Biorbyt, England) to determine one of the strongest inflammatory cytokine in the region of aortic prosthesis.
- 4) Interleukin 10 (Rabbit polyclonal to IL10 antibody, nr.orb100193, Biorbyt, England) to evaluate the intensity of the anti-inflammatory cytokine that also promotes sclerotization in the tissue.
- 5) Vascular endothelial growth factor (Rabbit polyclonal to VEGF antibody, No. orb11554, Biorbyt, England) to determine ischemia, revascularization in prosthetic tissue.

For immunoreactive cell identification the universal streptavidin-biotin method and a set of reagents for this purpose (LSAB + System-HRP, Dako, K0679, Daco Cytomation, Denmark) was used (Boenish et al., 2001). Initially, deparaffinization and hydration of the slides were performed in the line of alcohol; then, the slides were washed with TBS buffer (Tris Buffered Saline, pH 9.0, Dako, S3001) for 10 min. Subsequently, the slides were placed in a container with Target Retrieval buffer solution, pH 9, Dako S2367 and twice heated with microwaves (total 5 min, 450 W) for release of epitopes, thereby enhancing the binding of the antibody to the antigen. After heating, the slides were cooled for 30 min and rinsed twice with 5 ml TBS buffer. Then, each tissue cut was treated with 150  $\mu$ L 3 mg 100 mL<sup>-1</sup> hydrogen peroxide (Peroxidase Block, Dako, K0679) and kept for 10 min at room temperature. Further, the slides were rinsed with distilled water, drained, and primary antibodies were applied on each tissue cut, which were incubated 30 or 60 minutes, according to the manufacturer's instructions. The titers used for primary antibodies and the incubation time are shown in Table 1. For antibody dilution, a special solution for this purpose has been used – Dako Antibody

Diluent, S0809. After incubation of the primary antibodies, the tissue slides were washed by TBS buffer twice for 5 min. Subsequently, biotin-related secondary antibodies (LSAB + System-HRP Kit Biotinylated link, Dako, K0679) were applied to the tissue cuts and incubated for 30 min. After that, the slides were washed with TBS buffer for 5 min and streptavidin was applied (LSAB + System-HRP kit Streptavidin-HRP, Dako, K0679) and incubated for 30 min; then, the slides were washed with TBS buffer for 5 min. Next, a chromogenic system (20 µL of DAB Chromogen + 1mL DAB + Substrate buffer solution, Dako, K0679) was applied to the tissue slides for visualization of antibody-antigen complex, and then rinsed with tap water. In the end, the tissue cell nuclei were stained with Harry hematoxylin (2–3 min). In tissue slides, the positive structures were visualized as brown color structures in the nuclei of the cells, in the cytoplasm or in the interstitial space.

For a negative control the identical tissue were used, but during immunohistochemical procedure described above, an antibody diluent (Dako Antibody Diluent, S0809) was used instead of the primary antibody.

The positive immunoreactive structures in the tissue slides were identified and their relative amount was determined using a semi-quantitative census method according to M. Pilmane.

The intensity of positive structures was determined using the following graduation:

- (-) – there are no positive structures in the field of vision,
  - (+) – mild quantity of positive structures in the field of vision,
  - (++) – moderate quantity of positive structures in the field of vision,
  - (+++)
  - (++++)
- (Pilmane et al., 1998).

In total, 90 tissue slides were prepared and analyzed for immunohistochemical examination.

## **Biometric processing of the obtained data**

The obtained statistical data processing was performed using Microsoft Exel and SPSS (Version 23). All descriptive statistical calculations (minimum and maximum value, average, standard deviation, and standard error, median) were made. For comparison of physiological parameters, blood laboratory results and ultrasound examination results (abdominal aorta and prosthetic lumen diameter, blood flow rate) before implantation of the aortic prosthesis and after the surgery Wilcoxon test was used, but for comparing the above mentioned results between the groups, the Mann-Whitney Test was used.

The Mann–Whitney Tests was also used to compare the results of microscopic examination of the tissue between 6 and 12 months groups. Differences were considered to be significant if  $p < 0.05$  (Arhipova & Bălița, 2006).

A Pearson correlation analysis was performed to find out the relationship between the parameters obtained in this study. The interpretation of the Pearson correlation coefficient  $r$  was performed according to the following scale (Evans, 1996):

- 0.0 – 0.19 very weak,
- 0.20 – 0.39 weak,
- 0.40 – 0.59 medium,
- 0.60 – 0.79 strong,
- 0.80 – 1.0 very strong.

## RESULTS OF THE RESEARCH AND DISCUSSION

### Outcome of the prosthetic surgery of abdominal aorta

During the experiment, nine dogs successfully underwent implantation of the innovative aortic prosthesis in the abdominal aorta by using the retroperitoneal approach. Average total aortic prosthesis implantation surgery time was 3 hours and 21 minutes. The shortest operation was done in two hours and forty minutes but the longest was four hours and four minutes. All operations were carried out without complications. After the operations, the wounds healed without complications and the skin sutures were removed after 14 days.

T. Ueberrueck has published data that the prosthetic surgery of abdominal aorta in pigs using laparotomy access was performed on average in  $62.8 \pm 10.4$  minutes (Ueberrueck et al., 2005). Regarding medical practice, it has been found that abdominal aortic reconstruction lasted, on average  $198 \pm 41$  minutes for a laparotomy approach and  $141 \pm 21$  minutes for a retroperitoneal technique (Butler et al., 1993). During these operations, the blood flow in the abdominal aorta was interrupted from  $74 \pm 13$  to  $104 \pm 46$  minutes (Butler et al., 1993).

In our case, the time of ischemia (the time when the blood flow in the abdominal aorta was interrupted between the renal arteries and bifurcation of abdominal aorta) ranged from 21 minutes to 1 hour and 6 minutes and on average was  $41 \pm 4$  minutes. The induced ischemia during the operation on the abdominal aorta did not result in significant changes in the general state of health.

At the end of the experiment, in one dog (H8J4463) an enlarged colon (*megacolon*) was discovered. The possible cause of that finding may have been innervation disorders caused by a relatively long ischemia time (52 minutes) in the abdominal aorta during implantation. However, dog H8J4485, who had the longest period of ischemia (66 minutes) in the abdominal aorta, had no such intestinal pathology. Krause et al. (1997), notes that complications in dogs occur more often when blood flow of the abdominal aorta is interrupted above the renal artery branching point. In humans, the interruption of the blood flow in the abdominal aorta under the renal artery branching point from 30 to 50 minutes is considered to be safe and does not lead to renal failure, or to paraplegia and paresis due to spinal cord disturbances (Gelman 1995; Krause et al., 1997; Wahlberg et al., 2002).

In our study, no significant complications were observed during the postoperative period. Therefore, we consider that the development of postoperative complications after this kind of surgery does not depend solely on the length of the ischemic time in the aorta, but the causes of the complications are multi-factorial and could include both the time of ischemia and the

cardiovascular system's ability to tolerate abdominal aortic ischemia, as well as tissue damage at the surgical wound site and other factors.

## **General state of health of experimental animals before and after the operation**

At the beginning of the experiment all the dogs were recognised as clinically healthy.

One day after abdominal aortic surgery all the dogs showed decreased physical activity, which in our opinion is because of slight pain after surgical tissue cutting. Appetite, thirst, urination and defecation during the postoperative period were normal and species specific. Similar information has been found in other studies, which state that a decrease in activity after surgical treatment is connected with pain reaction (Afshar et al., 2017; Sharkey, 2013). Decrease in physical activity one day after aortic prosthetic reconstruction in dogs has also been observed by Muste et al. (2008), while pigs in the same study showed decreased activity, as well as decreased appetite and thirst for as long as a week after aortic surgery.

In our study dogs showed a fast return of physical activity on the second day after surgery and it stayed like this until the end of the study. This indicates a successful outcome of the surgery, as well as the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs meloxicam and tramadol that were used, which have also shown efficacy in dogs in other studies (Afshar et al., 2017; Minto, Rodrigues, Steagall, Monteiro, & Brandão, 2013).

After the implantation of aortic prosthesis, all the dogs in both groups showed no coordination disorders throughout the study. Similar results were obtained in other studies of aortic prosthetic reconstruction where dogs were used (Bhattacharya et al., 2000; Muste et al., 2008; Seifalian et al., 2003; Wu et al., 1997). Meanwhile in studies with sheep, shortly after abdominal aortic surgery paraplegia or paresis of the hind legs were observed (Beygui et al., 1999; Soula et al., 2001).

### **Physiological indicators of the dogs**

The average body temperature of the dogs the day before aortic prosthesis implantation was  $38.23 \pm 0.19$  °C. Five minutes after abdominal aortic surgery the average body temperature of the dogs was  $34.19 \pm 0.34$  °C (the lowest 32.8; the highest 36.1 °C), but in the next 24 hours the temperatures went back to normal and were on average  $38.30 \pm 0.18$  °C (the lowest 37.5; the highest 39.2 °C).



These temperature changes match the data shown in literature during and after anaesthesia for soft tissue surgery in dogs (Afshar et al., 2017; Fayyaz, Kerr, Dyson, & Mirakhur, 2009; Ferreira et al., 2015; Srithunyarat et al., 2016).

On the third day, one month after the surgery and on the day of euthanasia average body temperature of the dogs was  $38.42\pm 0.09$  °C,  $38.62\pm 0.10$  °C and  $38.38\pm 0.11$  °C respectively. Individual temperature changes of the dogs during this study were within the normal reference range. There was no statistically significant difference between group A and B body temperatures ( $p>0.05$ ).

In humans it has been found that after using woven polyester prosthesis in abdominal aortic reconstruction body temperature rose on average by  $1.6\pm 0.7$  degrees Celsius for one to four days after surgery (Voûte et al., 2012). In our study no such temperature rises were observed during any time in the postoperative period.

The heart rate of the dogs before and after the surgery, as well as during the postoperative period was within the reference range. On the day of the surgery the average heart rate was  $107.2\pm 8.10$  beats per minute (the lowest 82; the highest 140), but five minutes after aortic prosthesis implantation –  $111.2\pm 5.2$  beats per minute (the lowest 82; the highest 132). One day after the surgery the average heart rate was  $99.9\pm 7.5$  beats per minute (the lowest 72; the highest 140), one month after the surgery –  $114.4\pm 6.4$  beats per minute (the lowest 80; the highest 140) and on the day of euthanasia –  $103.1\pm 5.5$  beats per minute (the lowest 68; the highest 124).

Fayyaz et al. (2009) observed that heart rate for dogs with isoflurane inhalation anaesthesia was  $119\pm 30$  beats per minute and  $93\pm 9$  beats per minute after losing blood of  $30\text{ mL kg}^{-1}$  and it stayed within the reference range throughout the study. Gelman (1995) points out that normal heart rate shortly after aortic prosthetic operations shows a dog's ability to compensate arterial hypotension.

There was no statistically significant difference between the heart rates of dogs in groups A and B ( $p>0.05$ ).

Mean respiratory rate throughout the study ranged from  $29.8\pm 2.5$  breaths per minute before the surgery to  $18.2\pm 3.7$  breaths per minute five minutes after aortic prosthesis implantation. One day and one month after the surgery and on the day of euthanasia, mean respiratory rate of the dogs was  $28.7\pm 1.7$ ,  $28.4\pm 1.9$  and  $27.3\pm 3.0$  breaths per minute respectively. Individual respiratory rates of the dogs throughout the study did not exceeded 40 breaths per minute. It should be noted that the lowest respiratory rate of the dogs was observed during implantation of the aortic prosthesis. Also, two dogs (H9A0069 and H9D0577) had very low respiratory rates shortly after the surgery – 7 and 8 breaths per

minutes respectively, but the next day it normalized and were 36 and 28 breaths per minute respectively.

The reason for such a decrease in the respiratory rate could be because of a physiological response to the anaesthesia. Decreased respiratory rates during and shortly after anaesthesia have been noted in other studies as well and most commonly are associated with the suppressive effects of the anaesthetic on the respiratory centre, as well as a decrease in the circulation system's functions (Grimm, Lamont, Tranquilli, Greene, & Robertson, 2015).

There was no statistically significant difference between the respiratory rate of the dogs in groups A and B throughout the study ( $p>0.05$ ), or between the respiratory rate of the dogs in the pre- and postoperative period ( $p>0.05$ ).

### **Laboratory tests, results and interpretation**

The results of inflammatory and erythropoiesis blood tests of the dogs in groups A and B prior to the implantation of aortic prosthesis are summarized in table 2 and table 3. The average total white blood cell count in the blood of the dogs in groups A and B was within the reference range throughout the study. In literature data can be found that dogs with polyester prosthetics in their aorta have normal white blood cell counts 6 months after the surgery (Marois et al., 1997). Our results are similar to the aforementioned, since 6 and 12 months after abdominal aortic prosthesis total white blood cell count of the dogs was close to the white blood cell count of the same dogs before the surgery. This might show the ability of the dog's body to control and localize inflammation created by the implanted polyester – polyurethane prosthesis in the aorta. On the contrary, in humans there is tendency, similar to the body temperature, to increase white blood cell count in the first 3 days after abdominal aortic surgeries, when compared to the white blood cell count before the surgery (Galle et al., 2000; Moulakakis et al., 2013).

When analysing the amount of band neutrophils in the blood of the dogs, a progressive increase in their number was observed. One month after the implantation of the aortic prosthesis, the mean number of band neutrophils reached the upper limit of the normal reference range and exceeded it 6 and 12 months after the surgery. Patients with a long ischemic period during surgery develop a 3-fold increase of neutrophil count, when compared with those with shorter ischemic period (Gadaleta, Fantini, Silane, & Davis, 1994). In our study we did not find such an effect of ischemia on neutrophil count in the blood of the dogs in the postoperative period.

In humans, increases in neutrophil counts were found on the third and fifth day after reconstructive aortic surgery (Galle et al., 2000; Ødegård et al., 2000), but more accurate data on the neutrophil count in the later post-implantation period was not found in the sources available to us.

Other studies have indicated that synthetic prosthesis materials are able to mediate acute inflammation (Zdolsek, Eaton, & Tang, 2007). Furthermore, inflammation in the aorta caused by a prosthesis as a foreign body attracts neutrophils to the site, where they collapse and activate immune cells, which trigger further activation of the inflammation cascade (Yan et al., 2016).

In our study, increases in the neutrophil counts in the blood of the dogs 6 and 12 months after the implantation of aortic prosthesis, could be explained by the impact of the biomaterial on immune cells, as well as the presence of local inflammation in the wall of the prosthesis and the lower elasticity of the prosthesis wall when compared with the wall of the abdominal aorta (Bhat et al., 2013; Haumer et al., 2005; Tanındı, Erkan, Alhan, & Töre, 2015; Zerneck et al., 2008).

In our study, 1 and 6 months after the aortic prosthesis implantation lymphocyte and monocyte counts in the blood of the dogs was within the reference range. Twelve months after the implantation monocyte counts in the blood of the dogs was within the reference range, while lymphocyte counts in the blood of dogs H8K4571 and H9D0577 was slightly below the lower norm, 0.96 and 0.85 respectively. In humans, rapid decreases in lymphocyte and monocyte counts have been observed three days after aortic prosthetic surgery (Galle et al., 2000). We believe that changes in leucocyte counts could be related to immunological responses of the body to the biomaterials used in prostheses, as indicated by other authors as well (Jones, 2008; Kzhyshkowska et al., 2015). At the same time, it should be noted that histological preparations of the two dogs which experienced decreased blood lymphocytes at the end of the experiment, showed higher infiltrations of neutrophil leukocytes and lymphocytes in the wall of the prostheses when compared with the other 7 dogs in both groups. Increased infiltration of neutrophil leukocytes and lymphocytes in the wall of a prosthesis usually indicates the presence of infection (Anderson & Jiang, 2017).

We believe that the prosthesis used in our study did not create a pronounced activation of the lymphocytes as a foreign body, since lymphocyte counts in the blood of all the dogs in group A and 2 dogs in group B were within the reference range. However, for the two dogs mentioned previously, a possible presence of infection in the prosthesis could create a pronounced attachment of lymphocytes to the wall of the prosthesis, thus reducing lymphocyte count in the blood.

Before aortic prosthesis implantation and at the end of the experiment, thrombocyte and erythrocyte counts and erythrocyte parameters were within the reference range. Similar data is provided in the literature, where the use of mice in a biointegration study of different synthetic materials revealed a constant amount and quality of erythrocyte parameters (Scaglione et al., 2011).

An increase in only MCH in the study is considered an artifact (Jemeljanovs et al., 2007).

When comparing the blood serum biochemical parameters before the operation of the abdominal aorta, one month after and at the end of the experiment, differences between groups A and B were not detected ( $p > 0.05$ ) and the values were within the reference range. Twelve months after the implantation of the aortic prosthesis in the abdominal aorta, one dog (H9C0439) had elevated blood serum urea above the reference range:  $11.2 \text{ mmol L}^{-1}$ . In medical practice, in 10% of the cases which had prosthesis implantation in the abdominal aorta below the renal artery pruning site, increases in urea in blood serum have been observed (Breckwoldt, Mackey, Belkin, & O'Donnell, 1992). In our case, we must take into account the fact, that the creatinine concentration in the blood serum was normal for the dog aforementioned. In the literature, classical renal insufficiency is characterized by an increased level of both urea and creatinine in the blood serum (Nelson & Couto, 2009). Therefore, we rule out severe renal impairment for this dog and define urea elevation as of prerenal origin.

### **Changes in the blood pressure**

In our study, prior to the experiment, mean systolic blood pressure in the Beagle breed dogs was  $156.88 \pm 5.01 \text{ mmHg}$  and mean diastolic was  $82.16 \pm 4.50 \text{ mmHg}$ , which coincides with those indicated in the studies below. Normal systolic blood pressure in healthy Beagle dogs is considered  $125 \pm 25$  to  $156 \pm 22 \text{ mmHg}$  and diastolic  $74 \pm 18$  to  $91 \pm 13 \text{ mmHg}$  (Egner et al., 2007; Klein, 2013; Pettersen, Linartz, Hamlin, & Stoll, 1988). In another source of literature, healthy dogs of the Beagle breed showed higher blood pressure: systolic blood pressure  $163 \pm 19$  to  $165 \pm 18 \text{ mmHg}$  and diastolic  $92 \pm 12$  to  $96 \pm 15 \text{ mmHg}$  (Rattez et al., 2010).

Throughout the six months after the implantation of the aortic prosthesis, the mean systolic blood pressure in our study varied from  $140.83 \pm 2.78$  to  $162.13 \pm 10.12 \text{ mmHg}$  and the diastolic mean was  $69.57 \pm 6.05$  to  $88.83 \pm 8.14 \text{ mmHg}$ , which corresponds to the normal blood pressure of the healthy Beagle breed dogs mentioned above.

The highest systolic and diastolic blood pressure in all the dogs in our study was observed one to three days after the operation of the abdominal aorta, but it did not differ significantly from that detected before the surgery. Similar results for dogs were reported in a study where mastectomy was performed – before the surgery systolic blood pressure was  $130 \text{ mmHg}$  and diastolic  $90 \text{ mmHg}$  and one day after the surgery they did not differ significantly –  $140 \text{ mmHg}$  and  $95 \text{ mmHg}$  respectively (Horta et al., 2015). In humans, systolic blood pressure of  $132 - 135 \text{ mmHg}$  after blood vessel operations, including reconstruction of the abdominal aorta, did not differ significantly from the pre – surgical systolic

blood pressure of  $136\pm 17$  mmHg as well (Sandoval et al., 2016). Similarly to our results, people with up to 57% of abdominal aortic stenosis, resulting from the reconstruction of aneurysm, did not show significant changes in blood pressure after the surgery (Ioannou et al., 2014).

## **Diameter of abdominal aorta and prosthesis and peak blood flow velocity in systole**

### **Changes in the diameter of the abdominal aorta and prosthesis in the postoperative period**

In dogs from both groups, which had the prosthesis with a diameter of 5.00 mm before the surgery, the prosthesis diameter narrowed by  $0.36\pm 0.27$  mm ( $p>0.05$ ) six months after the surgery, meanwhile in dogs which had the prosthesis with a diameter of 8.00 mm before the surgery, the prosthesis diameter narrowed by  $1.06\pm 0.29$  mm ( $p>0.05$ ) six months after the surgery (Figure 2). Twelve months after the surgery dogs in group B (all the dogs in this group had an aortic prosthesis of 5.00 mm implanted) had the mean diameter of the aortic prosthesis increase slightly to  $5.05\pm 0.40$  mm (Figure 3). Changes in the diameter of the aortic prosthesis for the dogs in group B during the 12 month postoperative period were not considered significant ( $p> 0.05$ ).

Similar results were observed by Seifalian et al. (2003), following the implantation of  $5\pm 0.04$  mm wide polyurethane prostheses in the abdominal aorta of eight Beagle dogs – thirty six months later mean diameter was  $5\pm 0.11$  mm. In study by Wilson et al. (1991), in femoral arteries of dogs, polyester and polyurethane-plated 4 mm diameter wide vascular prostheses were implanted and their diameter did not significantly change 12 months later (Wilson et al., 1991). However Sun et al. (2001), after implantation of heparinised polyester prostheses in the abdominal aorta of dogs, found a decrease in the diameter of the prosthesis by  $29.9\pm 7.0\%$  three months after the surgery. In our study, three months after the implantation, in dogs with prosthesis of 5.00 mm diameter the prosthesis narrowed by  $10.6\pm 4.4\%$ , but in dogs with prosthesis of 8.00 mm the prosthesis narrowed by  $16.25\pm 1.25\%$ .

In group A, six months after the implantation of the aortic prosthesis, the formation of a hematoma, seroma or aneurysm were not observed, neither in the prosthesis, nor cranial or caudal from the prosthesis in the abdominal aorta of the experimental dogs. Meanwhile, in group B two dogs had developed a unilateral aneurysm in the middle of an aortic prosthesis.

The tendency of the aortic prosthesis to decrease in diameter was observed until the third postoperative month, and it could be explained by the filling of the prosthesis wall with connective tissue and the formation of the neointima

on the inner surface of the prosthesis. A similar view is expressed by other authors stating that intense formation and thickening of connective tissue and neointima occur in the first month after the implantation of the aortic prosthesis (Boccafoschi et al., 2014; Newby & Zaltsman, 2000). Despite the differences in the diameter of prostheses implanted, the diameter of all prostheses after surgery was smaller in relation to the diameter of the abdominal aorta ( $p < 0.05$ ), thus creating a stenotic segment in the abdominal aorta.

In other studies, smaller diameter polyester or combined polyester/ePTFE prostheses have been implanted in the dogs when compared to the diameter of the aorta of the native recipient (Marois et al., 1996; Shi et al., 1994; Sun et al., 2001; Zilla, Bezuidenhout, & Human, 2007). Zilla et al. (2007) has pointed out that the diameter of the prosthesis implanted should be greater than the diameter of the recipient's aorta. However, Salacinski et al. (2001) states that if the diameter of the synthetic prosthesis implanted is greater than the recipient's blood vessel, the blood flow velocity in the prosthetic segment decreases, contributing to the development of hyperplasia of neointima and the risk of occlusion. On the other hand, if a prosthetic implant of too small diameter is implanted, a fibrin layer is formed that spreads on the inner surface of the artificial prosthesis and may hinder its normal integration into the body (Salacinski et al., 2001).

The diameter of the abdominal aorta for experimental dogs before implantation of the aortic prosthesis ranged from 6.88 mm to 8.82 mm and was on average  $7.72 \pm 0.60$  mm. For dogs in both groups, during the six month postoperative period, the diameter of abdominal aorta cranial from the prosthesis increased on average by  $0.52 \pm 0.15$  mm ( $p < 0.05$ ). It should be noted that in the six month period after implantation there was no statistically significant difference in the diameter of the abdominal aorta cranial from the prosthesis between groups A and B separately, and between dogs with implants of different diameter prostheses (when compared with the diameter of the abdominal aorta prior to implantation) ( $p > 0.05$ ).

In group B, in the 12-month period after the surgery, the diameter of abdominal aorta cranial from the prosthesis increased on average by  $0.53 \pm 0.25$  mm ( $p > 0.05$ ).

Similar changes can also be seen in the diameter of the abdominal aorta caudal from the prosthesis in the postoperative period. For dogs in both groups six months after the surgery the diameter of abdominal aorta caudal from the prosthesis had increased on average by  $0.59 \pm 0.18$  mm ( $p < 0.05$ ). The increase in the diameter of abdominal aorta caudal from prosthesis six months after the implantation was not statistically different between dogs with prosthesis of 5.00 mm and 8.00 mm diameter ( $p > 0.05$ ). Meanwhile, in group B, 12 months after surgery, the diameter of the abdominal aorta caudal from prosthesis increased on average by  $0.83 \pm 0.28$  mm ( $p > 0.05$ ).

In our opinion, the expansion of the abdominal aorta cranial from the prosthesis (the stenotic segment) could have been caused by the increased blood pressure caused by the blood stasis due to the difficulty of blood entering the prosthesis. Literature indicates that blood vessel dilatation is often found in cases of increased blood supply to the blood vessels (Bevan, 1997). Meanwhile, the expansion of the abdominal aorta caudal from the prosthesis (the stenotic segment), is explained by the phenomenon of poststenotic dilation, as is evident in the aorta from the aortic stenosis in the subvalvular region (Bonagura & Fuentes, 2015). It should be noted that in the literature available to us, the authors focused on reflecting the diameter of the prosthesis itself without specifying or analysing changes in the aortic diameter cranial and caudal to the prosthesis.

### **Peak blood flow velocity in systole in the aortic prosthesis and the abdominal aorta cranial and caudal from the prosthesis**

The peak blood flow velocity in systole in the abdominal aorta caudal from *arteria renalis* before the implantation of the synthetic vascular prosthesis varied from 106.0 to 159.2 cm s<sup>-1</sup> and was on average 124.607±6.112 cm s<sup>-1</sup>. This coincides with the peak blood flow velocity in systole in the abdominal aorta of healthy dogs found in other studies (111.4±28.68 till 129.2±35.23 cm s<sup>-1</sup>) (Koma et al., 2005; Riesen, Schmid, Gaschen, Busato, & Lang, 2002).

The peak blood flow velocity in systole in the middle part of the aortic prosthesis had the tendency to increase in the postoperative period. In the six month period after the surgery, peak blood flow velocity in systole in the middle of the prosthesis for the dogs in group A had increased by 67.20±18.36 cm s<sup>-1</sup> (p<0.05) and was on average 183.92±13.13 cm s<sup>-1</sup>. Meanwhile, for the dogs in the group B peak blood flow velocity in systole increased by 96.97±26.39 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05) and was on average 238.60±19.91 cm s<sup>-1</sup>. Literature suggests that a narrowing of a vessel lumen increases blood flow velocity (Jin, Hwang, & Cho, 2017).

In the twelve month postoperative period the peak blood flow velocity in systole in the middle of the prosthesis for the dogs in group B had increased by 79.68±13.11 cm s<sup>-1</sup> and was on average 214.15±15.39 cm s<sup>-1</sup> (p>0.05). Changes in the peak blood flow velocity in systole six to twelve months after the implantation in group B dogs were not significant either (p>0.05).

Other studies have found a similar tendency in humans, where 6 months after the reconstruction of an endovascular abdominal aneurysm, peak blood flow velocity in systole at the reconstructed segment had increased by 33.00 cm s<sup>-1</sup> (from 131.10±35.70 cm s<sup>-1</sup> to 164.10±23.30 cm s<sup>-1</sup> respectively) (Kadoglou et al., 2012) and by 41.20±3.30 cm s<sup>-1</sup> 12 months after a similar

procedure (Kadoglou et al., 2014). Our results differed numerically from this study, but this was due to the fact that the difference between the abdominal aorta and the diameter of the prosthesis used in our study was probably higher.

In the six month postoperative period, peak blood flow velocity in systole in the abdominal aorta cranial to the prosthesis decreased in group A on average by  $9.31 \pm 17.32 \text{ cm s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ) and was  $107.41 \pm 20.58 \text{ cm s}^{-1}$ , but in group B it decreased on average by  $63.94 \pm 10.13 \text{ cm s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ) and was  $70.53 \pm 2.75 \text{ cm s}^{-1}$ .

In the twelve month postoperative period peak blood flow velocity in systole in the abdominal aorta cranial to the prosthesis decreased in group B on average by  $68.45 \pm 11.14 \text{ cm s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ) and was  $69.95 \pm 4.88 \text{ cm s}^{-1}$ . In group B it was concluded, that the decrease in peak blood flow velocity in systole was greater during first 6 months after the surgery than in the 6 to 12 month postoperative period, but in both cases changes were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

In the six month postoperative period peak blood flow velocity in systole in the abdominal aorta caudal to the prosthesis increased in group A on average by  $71.41 \pm 35.88 \text{ cm s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ) and was  $188.13 \pm 35.71 \text{ cm s}^{-1}$ , but in the group B it increased on average by  $117.68 \pm 29.90 \text{ cm s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ) and was  $252.15 \pm 19.67 \text{ cm s}^{-1}$ .

In the twelve month postoperative period peak blood flow velocity in systole in the abdominal aorta caudal to the prosthesis increased in group B on average by  $74.07 \pm 22.74 \text{ cm s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ), and was  $212.47 \pm 16.52 \text{ cm s}^{-1}$ . In group B dogs, the peak blood flow velocity in systole from 6 to 12 months after implantation had a tendency to decrease by an average of  $39.68 \text{ cm s}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ).

In our case, implanted prostheses formed a narrowed segment in the abdominal aorta, and therefore caused a decrease in the peak blood flow velocity in systole cranial from the prosthesis and an increase caudal from the prosthesis. As the blood flowed through the aortic prosthesis, it obtained a flow-rate acceleration, which continued in the aorta caudal from the prosthesis. A similar increase in the peak blood flow velocity in systole for dogs is observed caudal from congenital aortic stenosis near the basis of the heart (Bonagura & Fuentes, 2015; Garncarz, Parzeniecka-Jaworska, & Szalus-Jordanow, 2017).

The main factor determining the blood flow velocity in the aorta is its diameter (Klein, 2013; Szatmári, Sótonyi, & Vörös, 2001). We also found such a correlation in our study using correlation analysis of Pearson. We found a moderate negative correlation between blood flow rate and aortic diameter cranial from the prosthesis and between peak blood flow velocity in systole and aortic diameter in the middle of the prosthesis (correlation coefficients:  $r = -0.513$ ,  $p < 0.001$  and  $r = -0.504$ ,  $p < 0.001$  respectively). Moderate negative



correlation was also found between the diameter of the prosthesis and the peak blood flow velocity in systole caudal from the prosthesis ( $r = - 0.50$ ,  $p < 0.001$ ).

In general, it must be noted that in the scientific literature available to us, studies on changes in blood flow rates in a dog's abdominal aorta after synthetic blood vessel implantation are scarce.

## **Necropsy of the dogs and macroscopic examination of the prosthesis**

During necropsy of the dogs, no macroscopic pathological changes were found in the abdominal organs of four dogs in group A and all the dogs in group B. In other studies of a similar nature, after the implantation of synthetic prostheses in the abdominal aorta, there were no macroscopic abnormal findings in the abdominal organs of various animal species, including dogs (Bashar et al., 2002; Beygui et al., 1999; Gregory, Vercammen, Flynn, & Kibbe, 2016; Marc G Jeschke, Hermanutz, Wolf, & Köveker, 1999; Ueberrueck et al., 2005). However, one dog (H8J4463) showed an increased size of the colon (*megacolon*) detected during X – ray and ultrasonographic examination made earlier. According to S. Gelman, the enlargement of the colon may have been caused by nerve damage due to tissue trauma or spinal cord ischemia during the implantation of the aortic prosthesis (Gelman, 1995).

Implanted prostheses for all dogs in groups A and B were completely incorporated into the abdominal aorta and were surrounded by a fibrous tissue capsule. A more pronounced and thicker capsule was detected around the prosthetics for group B dogs. A. Kadišs, in his dissertation, describes a similar finding when, after six months of implantation of polyesters and polyurethane vascular prostheses (similar to those used in this study), thick capsules of connective tissue were found around the prostheses (Kadišs, 2005). A thick connective tissue capsule that enclosed a polyester aortic prosthesis 6 months after the implantation has also been detected in dogs by Marois et al. (1996).

In both groups of dogs, the prosthetic lumen was empty with a smooth and glossy inner surface, indicating that the prosthetic lumen had sustained functioning status. Similarly, other scientists, such as Izhar et al. (2001) found that three months after the implantation of 6 mm diameter segmented polyester polyurethane prostheses in the carotid arteries of dogs, the lumen of the prosthesis stayed free in 100% of cases (Izhar et al., 2001). Marois et al. (1996), six months after implantation of polyester prostheses in the thoracic and abdominal aortas of dogs, found the lumen free and a white, smooth, shiny internal surface of the prosthesis in all the dogs. However, it should be noted that Ueberrueck et al. (2005) has published data on polyester prostheses implanted in the abdominal aorta of pigs and in the carotid arteries of sheep,

which shows that in 16.3% of cases three months after the implantation occlusion of the prostheses was observed.

During the necropsy, in two dogs (H9C0439 and H9A0069) from group B, a unilateral aneurysm of the aortic prosthesis wall was confirmed, which was also detected ultrasonographically earlier. These dogs also had the highest maximum blood flow rate in systole when compared to other dogs. This probably contributed to the formation of the aneurysm in the wall of the prosthesis. The causes of aneurysms include a reduction in the strength of the prosthesis wall in a biologically active medium (inflammation process) (Francesco et al., 2016) and in high pressure conditions (Nappi et al., 2016). In medicine, the development of aneurysms and pseudoaneurysms after aortic reconstruction with synthetic material prosthesis are found in 6% of cases (Nishida, Tabata, Fukui, & Takanashi, 2016).

## **Histological examination of the prosthesis**

In our study, when histologically examining the prostheses of dogs in both groups, neointima was smoothly covering the internal surface of the prosthesis and a thickening of neointima was observed only in the joints of the prosthesis wall with the abdominal aorta. Similar results were found in other authors' studies. For example, complete covering of prosthesis wall with neointima and its thickening in the anastomotic sites in dogs and pigs have been observed three months after the implantation (Sun et al., 2001; Ueberrueck et al., 2005).

In group A, the thickness of the neointima in cranial anastomosis was  $84.56 \pm 4.59 \mu\text{m}$ , in the middle of the prosthesis  $62.36 \pm 5.06 \mu\text{m}$  and in caudal anastomosis  $132.38 \pm 9.26 \mu\text{m}$ . Dogs in group B had a thicker layer of neointima ( $p < 0.05$ ):  $88.80 \pm 7.58 \mu\text{m}$ ,  $104.39 \pm 7.62 \mu\text{m}$ ,  $133.41 \pm 11.19 \mu\text{m}$  respectively (Figure 4).

In literature, similar studies show thicker measurements of neointima. For example, Wu et al (1997) implanted polyester prostheses in the abdominal aorta of dogs and after 2 months found the thickness of the neointima in the cranial anastomosis was  $100 \mu\text{m}$ , in the middle of the prosthesis  $180 \mu\text{m}$  and in the caudal anastomosis  $175 \mu\text{m}$  and these indices did not change significantly after 3 years (Wu et al., 1997). Sun et al. (2001) has detected up to  $570 \pm 150 \mu\text{m}$  thickness of neointima three months after the implantation of various polyester prostheses in the abdominal aorta of dogs. In our case, the formation of neointima should be considered positively, since its thickness was less pronounced than in the examples above.

In our study, the formation of hyperplasia of neointima in the anastomotic sites could be influenced by the type of continuous sutures used, but the use of these sutures was necessary in saving total surgery time and thus decreasing the

time of ischemia. For this reason, when connecting blood vessels, continuous sutures are used in medicine (Tiwari et al., 2003). The use of knot sutures shows a lesser degree of hyperplasia of neointima, but significantly increases the time of joining the aorta and prosthesis, thus increasing the risk of postoperative complications (Lemson et al., 2000).

The thickness of the prosthesis wall in  $\mu\text{m}$  for group B dogs was significantly higher when compared to group A dogs (Figure 5.). Other scientists have not detected this kind of difference. For example, Seifalian A. et al (2003) found there were no significant differences in the thickness of the wall of poly (carbonate–urea) urethane prostheses during 18 months after implantation in the abdominal aorta of dogs. An increase in the thickness of the prosthetic wall in our case could have been caused by the material and technology used to make prostheses.

In dogs in both groups (6 and 12 months after the implantation) a collagen deposit between prosthetic threads across the wall thickness was detected. A similar collagen deposit in the entire cross-sectional area of the vascular prosthesis has also been observed in other experiments 6 weeks, 18 and 36 months after the implantation (de Valence et al., 2012; Mugnai et al., 2013; Seifalian et al., 2003; Wu et al., 1997).

When evaluating the amount and location of inflammatory cells in histological preparations, we found that 6 months after implantation of the aortic prosthesis (group A), there was mild and moderate inflammations in the wall of the prostheses, but after 12 months (group B) a severe inflammation in the wall of the prostheses (Figure 6). Similarly, Karapinar et al. (2004) detected moderate inflammation six months after implantation of polyurethane vascular prostheses in dogs. However, Bashar et al. (2002) even after 12 months of implanting a polystyrene and stainless – steel stenting in the abdominal aorta of a dog found only moderate inflammation. Conversely some scientists found a severe inflammation in polyester prostheses early in the postoperative period (Aboshady et al., 2012; Orenstein et al., 2012). For example, 2 weeks after implantation of a polyester prosthesis in an abdominal aorta of a pig, a medium to severe degree of inflammation in the wall was detected (Aboshady et al., 2012). The intensity of inflammation in the prosthesis wall, in our case, could also be affected by the composition of the prosthesis wall and impregnation of the prosthesis with gelatin, as indicated by the results of other studies (Meyer et al., 2015; Shindo et al., 2008; Wilhelm et al., 2007).

Group A showed a moderate macrophage infiltration between the prosthetic threads, but the number of macrophages in group B animals was higher than in group A. In contrast, the number of foreign body giant cells in the prosthetic wall did not differ between the dogs in groups A and B, and foreign body giant cells had a tendency to gather around the threads of synthetic material. In a different study, where polyester prostheses were implanted in the abdominal

aorta of pigs, pronounced macrophage (indicated as +++) and small foreign body giant cells infiltration (indicated as +) were detected in the wall of prostheses 2 weeks after implantation (Aboshady et al., 2012). In other similar experiments with animals, the presence of foreign body giant cells and macrophages in polyester prostheses were detected three months after implantation in the aortas of the animals, but the authors did not mention the intensity of macrophage infiltration (de Valence et al., 2012; Scott, Barth, Gaddy, & Ahl, 1994).

It has been shown in literature that the presence of macrophages and foreign body giant cells in the area of inflammation between the synthetic polymer threads is usually detected within the first 4 weeks after implantation of a prosthesis. The presence of mentioned cells between the synthetic polymer threads can last for months, and is considered to be a characteristic phenomenon (Sigler et al., 2005). In humans, 1 to 6 years after implantation of polyester prostheses, there was a significant increase in the number of macrophages, foreign body giant cells and lymphocytes in the wall of the prostheses, indicating chronic, severe and very severe inflammation in the prosthesis wall (Olofsson et al., 1995).

A and B group dogs' preparations showed steady, moderate lymphocyte infiltration between prosthetic threads, as well as lymphocyte aggregations with high cellular density in the periphery of the prosthesis wall. Aboshady et al. (2012) found that moderate lymphocyte infiltration in the prosthesis wall is detected as early as 2 weeks after the implantation of the polyester prosthesis in the aorta of a pig. Lymphocyte infiltration in the vascular prosthesis is usually observed from the first week after implantation and may remain in the prosthesis wall for up to 50 months after implantation (Schwartz & Henry, 2002). In our study, the lymphocyte localization in the periphery of the wall coincides with the location of the lymphocytes described in the literature in the case of implantation of vascular prostheses and indicates a preserved inflammatory stimulant (Sigler et al., 2005).

Significant neutrophil leukocyte infiltration was observed in two dogs in group B (H9D0577, H8K4571), which could indicate the possible presence of infection. Aboshady et al. (2012) reported an increase in the amount of neutrophils in the prosthesis wall caused by an artificially infected prosthesis. Bellows et al. (2012) has also found an increase in the number of neutrophils in a prosthesis artificially infected with biological material. In clinical medicine, the presence of infection of vascular prostheses in the postoperative period is described in 5% of cases (Aboshady et al., 2012).

## **The intensity of the positive structures of the immunohistochemical markers in the prosthesis wall**

In group A prostheses tissue, the positive structures of IL10 were observed relatively evenly between prosthetic threads in macrophage and lymphocyte infiltration sites. A moderate quantity of IL10 – positive structures were detected in the field of view. In the layer of neointima of the prosthesis and in the connective tissue capsule, the positive structures of IL10 were less pronounced. In group B prosthesis tissue, the distribution of positive structures of IL10 were similar to those of group A, but their quantity in group B was relatively lower than in group A (Figure 7).

The decrease in IL10 by implantation of thermoplastic polyurethane prosthesis in the abdominal aorta of a rat has also been reported by Brodbeck et al. (2003).

In group A prostheses, IL1ra–positive structures predominantly appeared between prosthetic threads. The quantity of IL1ra–positive structures was relatively higher compared to IL10, but, nevertheless, IL1ra expression was defined as a moderate quantity of positive structures in the field of view. In group B prostheses, the positive structures of IL1ra appeared between prosthetic threads and were relatively less in quantity than in group A. The quantity of positive structures of IL1ra in group B prostheses was lower than IL10, but IL1ra expression was still defined as a moderate quantity of positive structures in the field of view.

It has been shown that the intensity of expression of IL10 and IL1ra is also determined by the type and coating properties of implanted synthetic vascular prosthesis material (Brodbeck et al., 2003).

*In vivo* studies describe that IL1ra deficiency promotes hyperplasia of neointima after vascular injury (Isoda et al., 2003; Mazighi et al., 2004; Raines & Ferri, 2005). Our results show a similar connection as there was a moderate negative correlation between the amount of positive IL1ra and SMC–actin positive structures ( $r = - 0.43$ ;  $p < 0.01$ ).

In our study, the positive structures of TNF– $\alpha$  were relatively evenly spread between prosthetic threads and their bundles, as well as in the capsule tissue. The higher quantity of positive structure of TNF– $\alpha$  was in the aggregates of macrophages and lymphocytes. In group A prostheses, the quantity of positive structures of TNF– $\alpha$  were relatively similar to that of IL1ra and were evaluated as a moderate quantity of positive structures in the field of view (Figure 7). In group B prostheses, a severe quantity of TNF– $\alpha$  positive structures were detected in the field of view and it was a significant increase compared to that found in group A prostheses ( $p < 0.05$ ) (Figure 7). Very severe quantity of

positive structures were found in preparations with high neutrophil leukocyte infiltration.

Similarly, a significant increase in the severe quantity of positive structures of TNF- $\alpha$  in the wall of the prosthesis was observed one month after the implantation of the polyurethane prosthesis in the abdominal aorta of a rat, when compared to the positive structures of TNF- $\alpha$  one week after implantation of the prosthesis (Enayati et al., 2016).

In this study the expression of the pro- and anti-inflammatory cytokines in the prostheses of dogs from group A was equal. This may indicate that the immune system has the capacity to suppress the inflammation by inhibiting the pro-inflammatory cytokines and the classical activation of macrophages. Six months after implantation, the inflammation in the prosthesis wall was sufficiently suppressed by anti-inflammatory cytokines. However, at 12 months, the inflammatory activity was more pronounced as found by the decrease in anti-inflammatory cytokines and an increase in pro-inflammatory cytokines.

This is also indicated by the positive and statistically significant correlation between the quantity of positive structures of the TNF- $\alpha$  and the inflammation class ( $r = 0.24$ ;  $p < 0.05$ ) and between the TNF- $\alpha$  and the number of macrophages in the prostheses tissue ( $r = 0.26$ ;  $p < 0.05$ ), as well as negative weak, but statistically significant correlation between quantity of positive structures IL1ra and inflammation class ( $r = - 0.25$ ;  $p < 0.05$ ) and between an average amount of macrophages in the prostheses tissue ( $r = - 0.30$ ;  $p < 0.01$ ).

Increased release of TNF- $\alpha$  from polyurethane activated macrophages has also been shown in another study that determined the effect of polyurethane on macrophage activity (Ma, Petit, Yahia, Huk, & Tabrizian, 2002).

The literature shows that the inflammatory response, namely macrophages, lymphocytes, giant foreign cell infiltration, TNF- $\alpha$ , IL10 and IL1ra secretion, is a characteristic reaction of the immune system, resulting from the implantation of a synthetic material prosthesis (Anderson & Jiang, 2017; Anderson et al., 2008; Kzhyshkowska et al., 2015; Sheikh et al., 2015; Velnar et al., 2016).

Positive structures of VEGF in the prostheses wall in bough groups were between synthetic threads, occasionally in the connective tissue capsule and adjacent blood capillary endotheliocytes. In group A prostheses, the quantity of VEGF positive structures in the field of view was assessed as moderate. In group B, positive VEGF structures were denser and defined as close to severe quantity of VEGF positive structures in the field of view.

Similarly, an increase in VEGF positive structures was also found by testing the thermoplastic polyurethane prosthesis in the abdominal aorta of a rat (Enayati et al., 2016).

In our case, the amount of VEGF positive structures found in group B dogs prostheses suggests the ongoing tissue hypoxia in the prosthesis wall, as other authors point out as well (Greenberg et al., 2008; Kendall & Feghali-Bostwick, 2014; Kwee & Mooney, 2015).

The increase in VEGF in the group B dogs prostheses is believed to have been promoted not only by localized hypoxia, but also by the chronic inflammation process in the prostheses wall, as many scientists point out that VEGF secretion is also triggered by inflammatory cells and cytokines (Boersema et al., 2016; Camaré et al., 2017; Carmeliet & Jain, 2011; Kwee & Mooney, 2015; Liu et al., 2014; Scaglione et al., 2011). In our case, between the positive structures of TNF- $\alpha$  and VEGF, we found a positive weak but statistically significant correlation ( $r = 0.28$ ;  $p < 0.01$ ).

It is known that VEGF also promotes smooth muscle cell proliferation (Parenti, Bellik, Brogelli, Filippi, & Ledda, 2004), which was observed in our study as a positive correlation between the quantity of VEGF and SMC-actin positive structures ( $r = 0.31$ ;  $p < 0.01$ ).

In our study, SMC-actin in the aortic prostheses wall mostly appeared in the basal layer of the neointima and in the capsule of connective tissue. Positive marking of SMC-actin was also found in the endothelial cell nuclei of the neointima, as well as in capillary endotheliocytes near the capsule. In group A, a moderate quantity of SMC-actin positive structures in the field of view was found (Figure 7), while in group B the quantity of SMC-actin positive structures in the field of view found was determined as severe (Figure 7).

Other studies have found SMC-actin in the neointima soon after aortic prosthetic surgery. For example, in the combined prosthesis of polyester and polytetrafluoroethylene implanted in the abdominal aorta of a dog, the SMC-actin positive structures in the neointima of the prosthesis was unevenly visible 4 weeks after implantation (Bhattacharya et al., 2000), but in the polyester prosthesis – 8 weeks after implantation (Wu et al., 1997). However in rats, 4 weeks after the implantation of the polyurethane prosthesis in the abdominal aorta, the smooth muscle cells of the basal layer of the neointima, as well as the nucleus of the endothelial cells which covered the neointima in one layer, were SMC-actin positively marked (Jeschke et al., 1999; Zhang et al., 2004). We evaluate positively the fact that in our study the nucleus of cells that covered the entire inner surface of the prosthesis were SMC-actin positive. This confirms that these cells are indeed endothelial cells, as described by researchers Kim et al. (2014) and Ueberrueck et al. (2005). The intense presence of SMC-actin in the neointima could have contributed to an increase in the thickness of the neointima of prostheses in dogs in group B and suggests active proliferation of smooth muscle cells, as described by Curcio et al (2011) and Filipe et al., (2018).

When comparing the quantity of positive structures of immunohistochemical markers detected in aortic prostheses wall between groups A and B, we found a significant increase in the positive structures of TNF- $\alpha$ , VEGF and SMC-actin in prostheses wall of dogs in group B ( $p < 0.01$ ). However, the quantity of IL1ra positive structures in group B prostheses was significantly smaller ( $p < 0.01$ ), and a significant difference in the amount of IL10 positive structures in groups A and B was not observed ( $p > 0.05$ ).

In medicine, various types of prosthetic coatings, as well as immunosuppressive and inflammation inhibiting drugs, are used to control post-surgical inflammatory response to a foreign body (Brodbeck et al., 2003; Chen et al., 2005; Chong et al., 2015; Kzhyshkowska et al., 2015; Mazighi et al., 2004). In our study, such medications were not used in the postoperative period.

To conclude, a comprehensive and complex evaluation of the effects on the body of abdominal aortic prostheses implanted in dogs has been performed. The combined results of clinical, visual, histological and immunohistochemical investigations generally indicate a successful integration and functioning of the aortic prostheses tested in the abdominal aorta of dogs during the study.



## CONCLUSIONS

By performing an experimental evaluation of the biointegration of the aortic prosthetic composite material produced by RTU in the dog's abdominal aorta 6 and 12 months after the implantation of this prosthesis, we conclude:

1. The implanted prosthesis in the abdominal aorta did not cause (clinically detectable) vascular disturbances to the region throughout the postoperative period and did not adversely affect the overall clinical status of the dogs.
2. The diameter of the implanted prostheses did not change significantly during the study, however, the peak blood flow velocity in systole in the prosthesis in group A dogs, significantly increased during the first month after implantation. Blood flow velocity in the prosthesis tended to increase throughout the experiment, exceeding the limit of physiological rate, which could be classified as mild aortic stenosis.
3. During the six and twelve month period after the implantation, the aortic prosthesis was able to fully incorporate into the abdominal aortic segment of the dogs and the internal surface of all prostheses was covered by an endothelium that was thickened in the anastomotic sites (hyperplasia of neointima developed).
4. Inflammation in the wall of the prosthesis indicated a reaction by the organism to the foreign body, which increased in the postoperative period and was characterised mainly by an increase in the number of macrophages. With increasing numbers of macrophages in the tissues of the prosthesis, the quantity of inflammation inhibiting markers IL10 and IL1ra decreased, but the expression of the inflammatory marker TNF- $\alpha$  increased.
5. The increase in relative quantity of VEGF 12 months after implantation confirms the persistence of hypoxia in the aortic prosthesis wall, while the increase in the relative amount of SMC-actin indicates an increase in the smooth muscle cell proliferative activity in the prosthesis wall.
6. In this study, abdominal aortic prosthetics surgery for two dogs was complicated with the possible presence of infection in the prosthesis wall and for two dogs aneurysms formed in the prosthesis wall, which in these two specific cases was associated with an increase in the peak blood flow velocity in systole in the prosthesis above 235 cm/sec.

## **RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE**

1. For experimental and clinical surgical manipulation in the dog's abdominal aorta, we recommend using a retroperitoneal approach due to its relatively technical simplicity and ease of use.
2. In veterinary medicine, when using ultrasonographic examination of the abdominal organs, we suggest investigating and evaluating the diameter of the abdominal aorta and the maximum blood flow rate in the systole.
3. For the analysis of the inflammatory processes in tissues, we recommend the use of inflammation mediating and inhibiting cytokines to judge the activity of inflammatory cells and the ability of the body to suppress the inflammation process more precisely.
4. Further experimental studies on vascular prosthesis are recommended.