

**ПЕНЗЕНСКИЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. В.Г. БЕЛИНСКОГО
ПЕНЗЕНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И
ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

ВЕНЕДИКТОВ

Алексей Александрович

**РАЗРАБОТКА БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ
НА ОСНОВЕ КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНОЙ ТКАНИ**

14.01.24 – Трансплантология и искусственные органы

03.01.04 – Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

В.И. Севастьянов

доктор биологических наук, профессор

М.Т. Генгин

Москва – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	9
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
Глава 1. Ксеноперикардальная ткань	9
1.1. Природа ксеноперикардальной ткани.....	9
1.2. Ксеноматериалы. Преимущества перед другими способами пластики.....	10
1.3. Области клинического применения ксеноперикарда.....	12
1.3.1. Сердечно-сосудистая хирургия.....	12
1.3.2. Общая хирургия.....	13
1.3.3. Травматология и ортопедия.....	15
1.3.4. Урология и гинекология.....	16
Глава 2. Биомедицинские требования к ксеноперикардальной ткани	18
2.1. Физико-механические свойства ксеноперикарда.....	18
2.2. Гистологические и гистохимические методы контроля ксеноперикарда.....	20
Глава 3. Обработка ксеноперикардальной ткани	22
3.1. Глутаровый альдегид в тканевой инженерии. Кросс-линкинг.....	22
3.2. Обзор способов обработки ксеноперикарда.....	27
II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	36
Глава 4. Материалы и методы	36
4.1. Экспериментальный материал.....	36
4.2. Определение физико-механических параметров ксеноперикарда.....	36
4.3. Исследование скорости резорбции биоматериалов на модели <i>in vitro</i>	37
4.4. Исследование местного действия биоматериалов после имплантации.....	38
4.5. Гистологическое исследование образцов биоматериала.....	39
4.5.1. Подготовка образцов к окрашиванию.....	39
4.5.2. Окраска гематоксилин-эозином.....	39
4.5.3. Окраска по Ван-Гизону-Вейгерту.....	40
4.5.4. Световая микроскопия.....	41
4.6. Экспериментальные модели для оценки функциональных свойств ксеноперикардальных биоматериалов в условиях <i>in vivo</i>	41
4.6.1. Экспериментальные животные и их содержание.....	41
4.6.2. Модель имплантации биоматериала в брюшинную стенку.....	43
4.6.3. Модель имплантации биоматериала в мочевой пузырь.....	44
4.7. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	45
Глава 5. Разработка протоколов обработки ксеноперикардальной ткани	46
5.1. Предварительная обработка и отбраковка.....	46
5.2. Методика обработки ксеноперикардальной ткани.....	46
5.3. Матрица параметров протокола обработки биоматериалов.....	51
III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	55
Глава 6. Физико-механические свойства ксеноперикардальных биоматериалов	55
6.1. Модуль упругости.....	56
6.2. Максимальная нагрузка.....	56
6.3. Напряжение при растяжении при максимальной нагрузке.....	57
6.4. Относительное удлинение при растяжении.....	58
Глава 7. Исследование скорости резорбции ксеноперикардальных биоматериалов в условиях <i>in vitro</i>	61
Глава 8. Исследование местного действия ксеноперикардальных биоматериалов после имплантации	65
8.1. Гистологическое исследование образцов группы «Контроль».....	65

8.2. Гистологическое исследование образцов «Ксеноперикардального биоматериала -I».....	71
8.3. Гистологическое исследование образцов «Ксеноперикардального биоматериала -II».....	77
Глава 9. Оценка функциональных свойств разработанных ксеноперикардальных биоматериалов в условиях in vivo.	84
9.1. Оценка функциональных свойств «Ксеноперикардального биоматериала-I»..	84
9.1.1. <i>Морфологическое исследование тканей в зоне имплантации полипропиленовой сетки</i>	84
9.1.2. <i>Морфологическое исследование тканей в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала</i>	87
9.1.3. <i>Сравнительный анализ результатов морфологического исследования тканей в зоне имплантации полипропиленовой сетки и ксеноперикардального биоматериала</i>	91
9.2. Оценка функциональных свойств «Ксеноперикардального биоматериала-II».	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98
Клинические данные применения разработанных биоматериалов	104
ВЫВОДЫ	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	110
Список сокращений	124
<i>Финансовая поддержка работы</i>	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В биологических материалах с заданными и контролируемыми характеристиками нуждаются многие технологии реконструктивной и заместительной хирургии, направленные на восполнение потери и активизацию регенераторных процессов мягких соединительных тканей организма. Медицинские имплантаты, созданные на основе синтетических искусственных материалов, имеют определенные достоинства, однако они не в состоянии повторить пространственную архитектуру и физиологическую активность биологических материалов.

Разработка технологии химической стабилизации биотканей и вопросов, связанных с тканевой инженерией при производстве имплантатов на основе тканей ксеногенного происхождения для нужд реконструктивной медицины, способствует решению многих проблем практического здравоохранения, а именно:

- повышение эффективности медицинского обслуживания населения;
- снижение сроков госпитального лечения пациентов;
- снижения уровня инвалидности и повышение «качества жизни» пациентов после хирургического лечения.

Имплантат на основе биологической ткани или материал, содержащий ее отдельные компоненты, должен обладать рядом характеристик, главными из которых являются:

- биологическая совместимость с окружающими тканями;
- физиологическая резорбция с образованием нетоксичных продуктов распада;
- контролируемая по времени скорость биорезорбции, синхронизированная по времени с процессом образования новой ткани;
- возможность фиксации биологически активных веществ на структурах биоматериала без снижения их биологической активности;
- возможность удобной и эффективной стерилизации;
- устойчивость при хранении в течение длительного времени;
- технологичность процесса изготовления при серийном производстве.

Настоящая работа направлена на разработку и исследование биоимплантатов на основе ксеноперикардальной ткани с разными физико-механическими и биологическими свойствами для различных областей реконструктивной и заместительной хирургии. Разработанные методики обработки ксеноперикардальной

ткани способны дать биоматериал с разным поведением в организме, различной скоростью биорезорбции и физико-механическими параметрами, а также возможностью заселения аутологичными стволовыми клетками или фиксацией биологически активных белковых субстанций с перспективой использования в тканевой инженерии.

Объектом исследования является ксеноперикардальная ткань крупного рогатого скота. В качестве **предмета** исследования в диссертации выступают биологические и физико-механические свойства ксеноперикардальной ткани после химико-ферментативной обработки.

Целью диссертационной работы является разработка способов обработки ксеноперикардальной ткани для получения биоимплантатов с заданными физико-механическими и биорезорбируемыми свойствами.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Найти режимы многостадийной химико-ферментативной обработки ксеноперикардальной ткани, позволяющие варьировать физико-механическими и биорезорбируемыми свойствами биоткани.
2. Провести сравнительный анализ физико-механических и биорезорбируемых свойств полученных ксеноперикардальных биоматериалов.
3. Изучить местное действие полученных ксеноперикардальных биоматериалов после имплантации в ткани животных.
4. Провести оценку функциональных свойств разработанных ксеноперикардальных биоматериалов в условиях *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспериментально установлено, что изменение параметров ключевых стадий многостадийной химико-ферментативной обработки ксеноперикарда (концентрация фермента, температура ферментативной инкубации, инкубация в средах с разным осмотическим давлением, концентрация сшивающего агента) существенно влияет на структурные свойства биоткани.
2. Показана возможность получать ксеноперикардальные биоматериалы с различной скоростью резорбции и физико-механическими характеристиками.
3. Разработана оригинальная химико-ферментативная методика обработки ксеноперикарда.

4. На основе разработанных протоколов химико-ферментативной обработки ксеноперикарда получены два вида биоматериала с заданными физико-механическими свойствами и скоростью резорбции.

5. Доказано, что независимо от режима обработки биоткани, разработанные ксеноперикардальные биоматериалы обладают высокими биосовместимыми свойствами: не вызывают реакции отторжения при имплантации, биорезорбция имплантата в условиях *in vivo* сопровождается замещением новообразованной тканью животного и процессами неоваскуляризации.

6. Активность процесса новообразования соединительной ткани в месте имплантации ксеноперикардального биоматериала через год после операции превосходит на 25% аналогичный показатель, полученный в тканях вокруг полипропиленовой сетки.

Научная новизна диссертационного исследования. Впервые показано, что изменением параметров ключевых стадий химико-ферментативной обработки ксеноперикардальной ткани (концентрация фермента, температура ферментативной инкубации, инкубация в средах с разным осмотическим давлением, концентрация сшивающего агента) можно направленно влиять на структуру и свойства биоткани. Разработаны 2 протокола обработки ксеноперикардальной ткани, позволяющие получать биосовместимые материалы с разными физико-механическими и биорезорбируемыми свойствами. Проведен сравнительный анализ физико-механических и биорезорбируемых свойств в условиях *in vitro* двух видов разработанных ксеноперикардальных биоматериалов. В экспериментах *in vivo* доказано, что независимо от выбранных режимов обработки, полученные биоматериалы не вызывают отторжения, подвергаются процессам биоинтеграции и замещаются новообразованной васкуляризованной тканью.

Теоретическая значимость исследования заключается в выявлении особенностей зависимости поведения и свойств биоматериала на основе ксеноперикардальной ткани от режима химико-ферментативной обработки.

Практическое значение работы. Разработанные протоколы обработки биоткани позволили создать два вида биоматериала, отличающихся физико-механическими и биорезорбирующими свойствами, как потенциальных имплантатов для реконструктивно-восстановительной и пластической хирургии мягких тканей.

«Ксеноперикардальный биоматериал I» характеризуется высокими показателями прочности и упругости, обладает низкой скоростью резорбции и относительно медленным замещением собственными тканями. Он может быть преимущественно использован в качестве биоматериала, замещающего поврежденные ткани, подверженные механической нагрузке, например, в реконструктивных операциях для пластики дефектов сухожильно-связочных структур, в герниопластике, гинекологии, а также в антирефлюксной хирургии.

«Ксеноперикардальный биоматериал II» с относительно низкими показателями упруго-деформативных свойств, но с большей скоростью резорбции и высокой степенью биоинтеграции, может быть преимущественно использован в качестве биоматериала, замещающего поврежденные ткани, не подверженные механической нагрузке, например, в реконструктивных операциях для протезирования твердой мозговой оболочки, укрытия культи почки, пластике мочевого пузыря и мочеточников, корпоропластике при болезни Пейрони и других операциях.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на многих российских и международных конференциях и выставках изделий медицинского назначения, в частности, на региональной научно-технической конференции «Инновационные технологии в экономике, информатике и медицине» (Пенза, 2010); научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Пенза, 2010); научно-практической конференции «Фундаментальные исследования в Пензенской области: состояние и перспективы» (Пенза, 2010); межрегиональной научно-практической конференции памяти академика Н.Н. Бурденко «Актуальные проблемы современного практического здравоохранения» (Пенза, 2010); общероссийском съезде травматологов-ортопедов России (Саратов, 2010); XVI, XVII и XVIII Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2010, 2011 и 2012); Международной выставке медицинских изделий «Medica 2011» (Дюссельдорф, 2011); Международном съезде кистевых хирургов «FESSH 2012» (Антверпен, 2012); Международном съезде сердечно-сосудистых и торакальных хирургов «The 20st annual meeting of the ASCVTS-2012» (Нуса-Дуа, 2012); Международном съезде сердечно-сосудистых и торакальных хирургов «The 26st annual meeting of the EACTS-2012» (Барселона, 2012); Международном съезде сердечно-сосудистых и торакальных

хирургов «The 21st annual meeting of the ASCVTS-2013» (Кобе, 2013), Научно-практической конференции «Инновационные имплантаты в хирургии» (Пенза, 2014).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНАЯ ТКАНЬ

Природа ксеноперикардальной ткани

Перикард – это замкнутый мешок; окружающая сердце оболочка, которая состоит из двух слоев. Ее наружный слой - фиброзный перикард со всех сторон окружает сердце, переходя в наружную оболочку отходящих от сердца крупных кровеносных сосудов. Внутренний слой перикарда - серозный перикард представляет собой закрытую со всех сторон полость серозной оболочки: ее внутренний (висцеральный) листок – эпикард вплотную прилегает к стенке сердечной мышцы, а наружный (париетальный) листок сращен с фиброзным перикардом. Между обоими листками находится щелевидная полость перикарда, в которой имеется небольшое количество жидкости, предотвращающей трение между двумя его листками во время сердечных сокращений [50].

Ткань перикарда, как и ткань сухожилий, склеры, подкожной клетчатки, компактных костей и зубов, относится к разновидностям соединительной ткани в организме. Ткань перикарда представляет собой чередование поперечно и продольно расположенных слоев коллагеновых волокон. В составе этих слоев располагаются эластические волокна, которые ориентированы параллельно коллагеновым. Коллагеновые волокна обладают наибольшей прочностью и составляют жесткую матрицу биоткани. Эластические волокна, наоборот, обладают способностью к обратимым деформациям под влиянием механических воздействий: при растяжении они удлиняются, а затем, будучи освобожденными, мгновенно укорачиваются подобно резиновой ленте [58]. Доказано то, что коллагеновые и эластические волокна играют разную роль в структурах соединительной ткани и упруго-деформативные свойства ткани зависят от состояния структурных белков [67]. Межклеточное вещество, несмотря на специфическую роль каждого из своих компонентов, при осуществлении общих функций соединительной ткани, выступает как единое целое. Такое тесное единство обеспечивается общностью происхождения, химическими связями между протеогликанами, гликопротеинами, коллагеном и эластином, тесным структурным

взаимодействием всех этих элементов на всех уровнях – от молекулярного до тканевого [49].

Ксеноматериалы. Преимущества перед другими способами пластики

Материал для пластических операций в реконструктивно-восстановительной хирургии классифицируется по происхождению на несколько видов:

- аутогенный (ткань, взятая от одного организма)
- аллогенный (ткань, взятая от другого организма одного вида)
- ксеногенный (ткань, взятая от организма другого вида)
- синтетический.

С развитием производства искусственных материалов открылись новые возможности пластической хирургии соединительных тканей. Впервые имплантация синтетических материалов человеку упомянута З.С. Мироновой (Москва), которая в 1961 г. использовала лавсан (лента из полиэфира) для восстановления связочного аппарата коленного сустава у 262 пациентов и достигла при этом 91% хороших и удовлетворительных результатов [94]. Начиная с середины 70-х годов, интерес хирургов к пластике синтетическими тканями претерпел настоящий «взрыв». Это произошло после того, как FDA (орган надзора США за веществами и наркотиками) допустил использование таких материалов при определенных условиях (т.н. Salvage Cases). С 1973 г. с этой целью стали применяться ленты из пропласта (Proplast®, Vitek-Incorp), а с 1975 г. – из полифлекса (Polyflex®, Richards Manufacturing Comp.) [81]. Пластика названными материалами не приводила к клиническим хорошим результатам. Большая часть связок подвергалась разрывам либо вызывала состояния раздражения коленного сустава, что обуславливало необходимость их удаления. Экспериментальные данные также демонстрировали механическую дефектность синтетических материалов в отношении растяжимости и прочности на разрыв [75]. Позже в технике хирургического шва началось использование рассасывающихся синтетических материалов, однако сравнительные клинические и экспериментальные испытания не обнаружили значимого улучшения результатов при их использовании [67, 105]. Период полурассасывания и потери прочности материала на разрыв оказался столь коротким, что эффективность материала ставилась под сомнение [106, 108].

Не смотря на то, что большое количество исследователей ставят акцент на производство и внедрение синтетических материалов [10, 12, 15, 17, 19, 22, 29, 32], в

настоящее время практически все синтетические материалы исчезли с рынка медицинской продукции. Сегодня их применение уместно лишь в качестве механической поддержки биологической операции (защита шва, армирование аутопластики и т.д.).

С начала прошлого столетия на основе более точных анатомических и биомеханических данных предпринимались попытки оперативного восстановления целостности соединительных тканей. Наряду со швом связок, довольно быстро возникла идея заменять поврежденную структуру ксено- или аллотканью, а также искусственными материалами. Все попытки, за исключением единичных случаев, не удавались. Лишь в 70-е годы XX столетия интерес к возмещению дефектов ткани снова возрос, т.к. к этому времени показали хорошие результаты ауотрансплантаты, и одновременно на рынке искусственных материалов появились синтетические ткани, позволившие надеяться на лучшие долгосрочные исходы при их применении. Однако ожидания не оправдались. При использовании вариантов синтетики достоверно хороших длительных и даже среднесрочных результатов достигнуто не было. Напротив, часто наблюдались их разрывы, нестабильность из-за проблем крепления и реакции несовместимости, в связи с чем, немалая часть протезов подлежала удалению. К настоящему моменту эра возмещения поврежденных тканей синтетическими тканями может рассматриваться как исчерпавшая себя [25].

Помимо ауотканей для пластических целей использовали и различные алломатериалы. Основное их преимущество заключалось в отсутствии дополнительного разреза при заборе ауотрансплантатов. Так для пластических целей применялись аллобрюшина, твердая мозговая оболочка, ткань мениска и другие. Известны так же эндопротезы сухожилия, изготовленные из лиофилизированного трупного человеческого сухожилия и способ пластики дефекта сухожилия с его помощью [14]. Однако применение тканей аллогенного происхождения сопряжено с определенными трудностями: ограниченные ресурсы при получении достаточного количества исходного материала, риск заражения вирусными инфекциями, недостаточность отечественного законодательства в области забора и коммерческой реализации подобной продукции.

Аутопластика также имеет ряд серьезных недостатков, связанных с дополнительным травмированием, увеличением времени проведения операции и времени послеоперационной реабилитации пациента.

В этом отношении более перспективными оказались препараты, полученные на основе биологических полимеров животного и растительного происхождения, в особенности те из них, которые имеют общую природу с тканями организма. В последние десятилетия непрерывно растет интерес к биodeградируемым природным (биологическим) полимерам, или биополимерам (альгинаты, коллаген, желатин, хитозан, фиброины шелка, полиэфиры бактериального происхождения – полигидроксibuтираты и их сополимеры). Природные полимеры, помимо высокой степени биосовместимости с организмом, являются высокоэффективными биостимуляторами [10, 46, 48, 65]. Промежуточными продуктами биодеструкции таких материалов могут быть вещества, включаемые в метаболизм клеток, например моносахара, молочная, гликолевая, кислота, либо вещества, не метаболизируемые клетками и тканями. В последнем случае такие продукты не должны быть токсичными, а их концентрация в кровяном русле не должна превышать предельно допустимый уровень. Продуктами полной деградации биополимеров являются углекислый газ и вода.

Области клинического применения ксеноперикарда

На сегодняшний день ксеноперикардальная ткань, которая, по сути, представляет собой биополимер после обработки, находит все большее применение в реконструктивно-восстановительной хирургии, если говорить в широком понимании значения данного направления в медицине. К реконструктивно-восстановительной хирургии можно отнести следующие направления.

Сердечно-сосудистая хирургия

Ксеноперикард на протяжении уже нескольких десятилетий широко применяется в хирургии сердца и сосудов для закрытия дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородок, создания искусственных клапанов сердца, протезирования сосудов, протезирования и пластики клапанов сердца, околосердечных тканей, профилактики спаечных процессов в средостении, биопротезирования и пластики магистральных

сосудов и уже доказал свою высокую эффективность применения в этой области медицины. [1, 21, 27, 37, 52, 55, 59, 61, 64, 96,100].

В настоящее время в России существует три крупных производителя ксеноперикарда – это компания «НеоКор» (г. Кемерово) [2], Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева (г. Москва) и компания «Кардиоплант» (г. Пенза), входящая в состав группы компаний ЗАО НПП «МедИнж» — крупного российского производителя изделий медицинского назначения. Основное отличие этих продуктов – технология обработки и консервации биологической ткани. Московские и кемеровские производители ксеноперикарда ориентированы только на рынок кардиохирургии и не заинтересованы в диверсификации производства и освоении новых областей, например общей хирургии, урологии и гинекологии, нейрохирургии и других. Ксеноперикардальная пластина «Кардиоплант», которая успешно вытесняет аналоги (занимает до 65% рынка на 2013год) с рынка кардиохирургии, позволяют делать вывод о конкурентоспособности имеющейся и перспективности разрабатываемых технологий перед указанными производителями. Кроме того, начатые сотрудниками медицинского института Пензенского Государственного Университета и Центрального Института Травматологии и Ортопедии им Н.Н. Приорова экспериментальные исследования по возможности применения ксеноперикарда в разных областях реконструктивно-восстановительной хирургии говорят о перспективности данного подхода. Поэтому комплексность настоящей работы имеет высокую практическую значимость. Предлагаемые способы обработки и стабилизации биологической ткани позволяют получать продукт с индивидуальными характеристиками и свойствами для широкого применения при реконструктивных операциях.

Общая хирургия

Хирургия грыж брюшной стенки, хирургия диафрагмальных грыж, хирургическое лечение перитонита (использование ксеноперикарда для закрытия лапаростомной раны в условиях абдоминального компартмент-синдрома), реконструктивно-восстановительная хирургия внепеченочных желчных путей (использование биоматериалов для протезирования желчных протоков), укрытие паренхиматозных органов при резекции (например, укрытие культи доли печени при резекции),

укрепление зоны анастомозов при резекционных вмешательствах на пищеводе, желудке и кишечнике.

Изучение возможности применения ксеноматериалов в абдоминальной хирургии представляет собой новую главу большой научно-практической работы [4, 8, 26, 28, 36]. Пластика вентральных грыж – одна из наиболее распространённых операций и остаётся наиболее сложной проблемой современной герниологии из-за высокого числа рецидивов. В России ежегодно выполняется до 100 000 грыжесечений. При этом число операций прогрессивно растёт. Несмотря на множество работ, посвящённых различным аспектам хирургического лечения этого заболевания, проблема остаётся не разрешённой, так как до настоящего времени отсутствуют единые подходы к выбору той или иной операции, нет унифицированной всеобъемлющей классификации, принятой повсеместно, в изучении результатов лечения часто отсутствуют объективные критерии без видимости тенденции.

Низкая эффективность многочисленных аутопластических методов, используемых при грыжесечении, частые рецидивы и, как следствие этого – инвалидизация больных, обуславливают необходимость поиска новых способов лечения и новых пластических материалов. Это в полной мере относится к лечению всех видов грыж.

Сотрудниками медицинского института Пензенского государственного университета разработаны способы ненапряжной протезирующей герниопластики с использованием в качестве протеза ксеноперикардальной пластины производства ООО «Кардиоплант» при паховых и послеоперационных вентральных грыжах. Проводятся экспериментальные исследования по изучению возможности применения ксеноперикарда для укрытия культи (ран) полых органов брюшной полости и забрюшинного пространства. Для закрытия дефекта брюшной стенки при управляемой лапаростомии с целью профилактики эвентрации перфорированная ксеноперикардальная пластина использована у двух больных с распространённым гнойным перитонитом. Отмечены высокие прочностные качества материала, отсутствие адгезии прилежащих петель кишечника, стойкость материала в гнойной ране [3, 4].

Травматология и ортопедия

Ксеноперикард с недавнего времени применяется при протезировании сухожилий, укреплении связочного аппарата суставов. Под руководством профессора Митрошина А.Н. и профессора Сиваконь С.В. сотрудниками медицинского института ПГУ проведено исследование биоинтегративных свойств ксеноперикардальной пластины «Кардиоплант» для реконструктивно-восстановительных операций в травматологии и ортопедии. Исследование произведено на 15 кроликах породы «Шиншилла» в соответствии с «Правилами гуманного обращения с лабораторными животными», методическими указаниями МЗ РФ «Деонтология медико-биологического эксперимента» (1987), а так же Хельсинкской декларацией от 1975 г. с пересмотром от 1983 г. Животным под внутривенным тиопенталовым наркозом дугообразным разрезом на 1/3 голени обнажали ахиллово сухожилие, из него иссекали участок длиной 3 см., формируя дефект. В дефект имплантировали трансплантат, представляющий собой трубку, сшитую из ксеноперикарда, соответствующую диаметру сухожилия. Ушивали кожу. На конечность накладывали гипсовую повязку на 3 недели. Животным предоставляли полную свободу движений. Изучали характер тканевых перифокальных реакций на имплантацию ксеноперикардального трансплантата, изменения в ксеноперикарде с течением времени и характера его биоинтеграции, возможность прорастания соединительной ткани в просвет трубчатого трансплантата из зоны контакта с сухожилием. Через год зона имплантации трансплантата внешне мало отличается от интактной части сухожилия. Отмечается незначительное увеличение диаметра регенерата по сравнению с сухожилием. На продольных и поперечных разрезах регенерат представляет собой плотную волокнистую структуру, похожую на сухожилие. Волокна имеют желтоватый цвет. Трансплантат визуализируется не на всех участках, просвет его на всём протяжении заполнен рыхлой соединительной тканью. При микроскопии выявляется полное замещение ксеноперикарда волокнистым соединительнотканым регенератом. Материал имплантата, начиная с шести месяцев после имплантации, разрушается и замещается коллагеном. Положительные результаты экспериментального исследования позволили применить разработанный ксеноперикард в клинической практике. Сотрудниками кафедры травматологии, ортопедии и военно-экстремальной медицины медицинского института Пензенского государственного университета под руководством профессора А.Н. Митрошина и профессора

С.В. Сиваконь разработаны способы пластики поврежденных крупных и мелких сухожилий (ахиллово сухожилие, сухожилия сгибателей пальцев кисти), а так же способы укрепления связочного аппарата крупных суставов с использованием в качестве пластического материала ксеноперикардальной пластины производства ООО «Кардиоплант». Выполнены протезирующие операции у пациентов с травмой сухожильного аппарата верхней и нижней конечности. Всего выполнено 48 операций у 36 больных. Получен хороший функциональный результат в сроки до 24 месяцев наблюдения у всех оперированных пациентов [38, 39].

Урология и гинекология

Возможно применение ксеноперикарда при следующих операциях: пластика мочевыводящих путей, гинекологические слинги, укрепление мышц тазового дна, урослинги, закрытие культи почки.

Сотрудниками кафедры хирургии медицинского института Пензенского государственного университета под руководством доцента Вихрева Д.В. разработан способ резекции почки с укрытием культи пластиной модифицированного ксеноперикарда производства ООО «Кардиоплант». Техническим результатом предлагаемого способа является достижение надежного гемостаза раневой поверхности почки, регенерация соединительнотканной оболочки почки и ее паренхимы без явлений фиброза с восстановлением анатомической целостности органа.

Наиболее частыми причинами возникновения стрессового недержания мочи являются чрезмерная подвижность или смещение уретры и шейки мочевого пузыря при напряжении и/или недостаточность сфинктерного механизма, который не обеспечивает достаточного сопротивления при резких подъемах внутрибрюшного и внутрипузырного давления. Из множества описанных хирургических методов коррекции стрессового недержания мочи в настоящее время наиболее часто применяются минимально агрессивные модификации слинговых операций и использование уретральных вдавливающих средств [84, 126].

Существует широкий выбор материалов для проведения подобных операций, включающий разные биологические трансплантаты, а также синтетические материалы [34, 104, 126]. К преимуществам использования ксенотрансплантатов относятся отсутствие необходимости в дополнительном оперативном вмешательстве на больном с целью получения аутооттрансплантата, ликвидация риска заражения через чужеродный

трансплантат, минимальная частота инфекционных осложнений. Не происходит эрозирования и инкапсуляции как при использовании синтетического материала [95]. На кафедре «Хирургия» медицинского института Пензенского государственного университета под руководством профессора Митрошина А.Н. и доцента Вихрева Д.В. начаты экспериментальные и анатомические исследования возможности применения биосовместимого материала ксеногенного происхождения [6] – ксеноперикарда для пластики мочевого пузыря и выполнения слинговых операций при стрессовом недержании мочи у женщин. На базе гинекологического отделения (зав. отделением А.Б. Дементьева) областной детской клинической больницы им. Н.Ф. Филатова выполнены операции с использованием ксеноперикардальной пластины при выпадении внутренних органов у 4 больных и стрессовом недержании мочи у двух больных. Осложнений не обнаружено, получен хороший клинический эффект. В настоящее время проводится патентный поиск, готовится заявка на изобретение.

Кроме вышеуказанных областей реконструктивной хирургии возможно применение ксеноперикарда и в таких сферах как: детская хирургия (лечение пороков развития брюшной и грудной стенки, гастрошизис, омфалоцеле, врожденная диафрагмальная грыжа); торакальная хирургия (закрытие дефектов грудной стенки и укрытие культи легкого/бронха при резекции); офтальмология (восстановление стенок глазницы при травмах, ожогах и операциях, хирургическое лечение макулодистрофии, отслойки сетчатки и склеропластики); нейрохирургия (пластика твердой мозговой оболочки); хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия (косметологические операции на лицевом черепе, формирование границы между окружающей соединительной тканью и образуемым остеоидом в лунке после удаления корня зуба для последующей фиксации стоматологического импланта).

Накопленный многолетний положительный опыт применения ксеногенных материалов в сердечно-сосудистой хирургии, в частности ксеноперикарда, натолкнул ряд исследователей на проведение исследований по возможностям их использования в ряде других направлений хирургии. Однако упоминания о подобных исследованиях в отечественной литературе встречаются крайне редко [26, 28].

ГЛАВА 2. БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНОЙ ТКАНИ

Настоящая работа выполнена на базе химико-биологической лаборатории компании «Кардиоплант», входящей в состав холдинга ЗАО НПП «МедИнж» - известного российского производителя медицинских изделий. «Кардиоплант» разрабатывает и производит медицинские изделия из биоматериалов для реконструктивно-восстановительной медицины и тканевой инженерии. Настоящая работа носит резкий практический характер и является этапом разработки новых изделий. Поэтому в исследовании много внимания уделено требованиям к разрабатываемым материалам и методам оценки его действия на организм.

2.1. Физико-механические свойства ксеноперкарда

Используемые в реконструктивных операциях имплантируемые материалы должны быть не только совместимы по своим биологическим свойствам с тканями реципиента, но и обладать необходимыми физико-механическими характеристиками. Кроме того, рассмотрение физико-механических характеристик материалов (изделий медицинского назначения) – также необходимый этап оценки биологической безопасности и клинической эффективности изделия [11, 48, 53]. Такое рассмотрение имеет большое значение для заключения о соответствии предложенного материала клиническим требованиям. Установление связи физико-механических характеристик материалов, используемых в клинической практике, с их биосовместимостью и клинической эффективностью является все еще развивающейся областью исследований. Однако существуют несколько примеров того, как эти связи себя проявляют.

Среди них – биологические материалы для реконструктивных операций. Исследование их физико-механических характеристик необходимы для получения более полной информации о структуре и свойствах, а также для формулирования рекомендаций к применению материала в той или иной хирургической операции. В виду того, что ксеноперикардальная ткань находит все новое применение в хирургии, требования к этому материалу расширяются. К примеру, операции, где ксеноперикард служит заплатой и не подвергается механическим стрессам, требования к физико-механическим параметрам материала минимальны. Однако в случае использования

ксеноперикарда в травматологии и ортопедии при пластике сухожильно-связочного аппарата механические параметры трансплантата играют решающую роль.

Изучению механических свойств ксеноперикарда посвящено много работ [9, 56, 57, 72, 74, 87, 103, 114, 115, 127] и нужно заметить, что этот материал достаточно хорошо изучен. Прочностные характеристики ксеноперикардиальной ткани зависят от направленности белковых волокон. Ксеноперикард обладает достаточно выраженными анизотропными свойствами [113,115]. Прочностные характеристики у образцов, выкроенных вдоль направления волокон структурных белков, значительно превосходят прочностные характеристики образцов с поперечным направлением. Абсолютные показатели прочности и упругих свойств ксеноперикардиальной ткани не одинаковы в разных источниках. Это связано с конкретным видом и режимом обработки ткани.

При исследовании физико-механических свойств ксеноперикардиальной ткани определяют следующие основные параметры:

- максимальное напряжение/прочность на разрыв
- относительное удлинение
- модуль упругости (зависимость напряжение – относительное удлинение)

Для определения физико-механических параметров биоткани используют как простые экспериментальные механические установки [66], так и более сложные испытательные машины производства компаний «Tiratest» или «Instron» [33]. Выбор установки зависит от поставленных задач. Как правило, информации об указанных характеристиках достаточно, чтобы сделать вывод о том, что представляет собой материал и насколько адекватно он прошел цикл обработки и модификации. Однако существуют некоторые области, выдвигающие более высокие требования к материалу. Например, при разработке биологических искусственных клапанов сердца – изделия 3 класса риска, большое значение имеет степень и равномерность зашивки материала сшивающим агентом. Исследователь должен обладать информацией о глубине проникновения глутарового альдегида в ксеноперикардиальную ткань. Неравномерная зашивка коллагена (зашивка по поверхности) может привести к образованию многослойности биоматериала и, как следствие, ограничение механических свойств створок клапана при циклических нагрузках. В таких случаях упругие свойства биоткани определяются по «истинным диаграммам деформирования» [13, 35] для продольной и поперечной деформации при одноосном и однородном растяжении

образцов в предполагаемых главных направлениях анизотропии механических свойств. Исследования деформационно-упругих характеристик методом релаксационной спектроскопии помогает изучить структуру биологической ткани и установить связь с получаемыми физико-механическими характеристиками и связь их изменений в результате обработки (дубящими, сшивающими и т.п. агентами).

Из физико-химии полимеров известно, что образование дополнительных сшивок (на стадии стабилизации ксеноткань обрабатывается сшивающим агентом) в системе должно приводить к увеличению модуля упругости. Возможно поэтому, в большинстве работ в качестве критериев определения степени сшивки и исследований, пространственно сшитых структур предлагается использовать методы определения физико-механических характеристик, таких как разрушающее напряжение при растяжении, определение модуля упругости, метод релаксационной спектроскопии.

2.2. Гистологические и гистохимические методы контроля ксеноперикарда

Помимо контроля физико-механических свойств ксеноперикарда для контроля качества обработки биоткани используются гистологические и гистохимические методы исследований и контроля структур соединительных тканей, изучение физико-механических свойств, анализ содержания солей Ca^{2+} . Ниже в таблице 1 приведен обзор гистологических и гистохимических методов контроля качества ксеноперикардальной ткани.

Таблица 1 – Гистологические и гистохимические методы контроля структур соединительных тканей

Метод окрашивания	Структура ткани	Результат окрашивания
Окраска гематоксилин-эозином	Клеточные элементы	Ядра приобретают сине-фиолетовый цвет, цитоплазма - желтовато-розовый цвет.
Окраска по методу Ван-Гизона	Коллагеновые волокна	Коллагеновые волокна окрашиваются в ярко-красный цвет
Окраска орсеином	Эластические волокна	Эластические волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-красный цвет; остальные структуры - в слабо-розовый цвет.
Окраска гематоксилин-пикрофуксином	Эластические и коллагеновые волокна, ядра	Эластические волокна окрашиваются в жёлтый цвет, коллагеновые волокна - в красный цвет;

	клеток	ядра клеток - окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет.
Окраска по методу Маллори	Коллагеновые волокна и другие структуры	Коллагеновые волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-синий цвет; многие другие структуры (ядра, эритроциты) - в оранжевый или красный цвет.
Импрегнация серебром	Коллагеновые волокна, ядра клеток	Коллагеновые волокна - коричневый, ядра клеток - светло-коричневый.
метод Вейгерта (резорцин-фуксином)	Эластические волокна	При окраске они приобретают черно-синий цвет
Выявление кальция, модификация по Мак-Ги-Расселу	Ca ²⁺	Отложения кальция окрашиваются в оранжево-красный цвет, остальные структуры в розовый
Метод Косса • выявление карбоната кальция путем обработки пирогалловой кислотой и едким натром	Ca ²⁺	Участки, содержащие карбонат кальция, окрашиваются в бурый цвет
• выявления фосфата кальция путем импрегнации раствором нитрата серебра и гипосульфитом натрия	Ca ²⁺	Участки, содержащие фосфат кальция, окрашиваются в черный цвет
Реакция с толуидиновым синим.	Гликозаминогликаны	Изменение окраски с синей на фиолетовую и красную.

ГЛАВА 3. ОБРАБОТКА КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНОЙ ТКАНИ

3.1. Глутаровый альдегид в тканевой инженерии. Кросс-линкинг

Использование глутарового альдегида (ГА) в качестве фиксатора биопротезов [97, 107] и матриц доставки лекарств пересматривается. До сих пор изучается химизм образования поперечных сшивок ГА [92] и его влияние на биологические функции ряда протезов, таких как ткань клапанов сердца, сосудистые трансплантаты, заплаты из ксеноперикарда, трансплантаты сухожилий и матриц доставки лекарств [82].

ГА является важным реагентом в области биомедицины, широко используется в качестве сшивающего агента для подготовки биопротезов, таких как клапаны сердца, сосудистые трансплантаты, эластические хрящи, ксеносухожилия и искусственная кожа, для фиксации клеток, иммобилизации ферментов и для сшивки белков и полисахаридов в препаратах контролируемой доставки препаратов. С появлением исследований, посвященных консервирующим свойствам ГА в 1969 г., реагент был успешно использован при подготовке биопротезов клапанов сердца. За последние 45 лет тысячи пациентов получили биоклапаны, фиксированные в ГА. Крупнейшие мировые компании («Edwards Lifesciences», «Medtronic», «Sorin Group», «Vascutek Terumo Company» и другие) и по сей день используют ГА в качестве стабилизатора биоткани для изготовления биотрансплантатов и даже живой ткани во время проведения операции [80]. Такая ткань искусственного клапана сердца гарантирует пациенту высокое качество жизни.

ГА-сшивки в коллагеновых тканях значительно снижают скорость биорезорбции ткани, что делает её биосовместимой и нетромбогенной при сохранении анатомической целостности, прочности и гибкости. Другие альдегиды являются менее эффективными в формировании химически, биологически и термически стабильных поперечных связей. Ткани, сшитые ГА сохраняют упруго-деформативные свойства структуры фибриллярного коллагена, что делает их пригодными для биопротезирования. Среди альдегидов, которые могут быть использованы для сшивки белковой матрицы, ГА имеет преимущество, т.к. он реагирует достаточно быстро, может охватывать различные расстояния между молекулами белка, а также может вступать в реакцию с большим количеством доступных аминогрупп в молекуле. Это приводит к более плотно сшитой структуре. ГА используется чаще всего в качестве сшивающего агента, нежели любой

другой реагент, поскольку это дешевле, доступнее и он легче растворяется в воде. Водные растворы альдегида состоят из смеси свободного альдегида, моно- и дигидратированных молекул ГА, мономерных и полимерных циклических гемиацеталей и др, ненасыщенных полимеров. В растворе свободный ГА, циклический гемиацеталь (б) и олигомеры (с) находятся в равновесии друг с другом (Рис. 1).

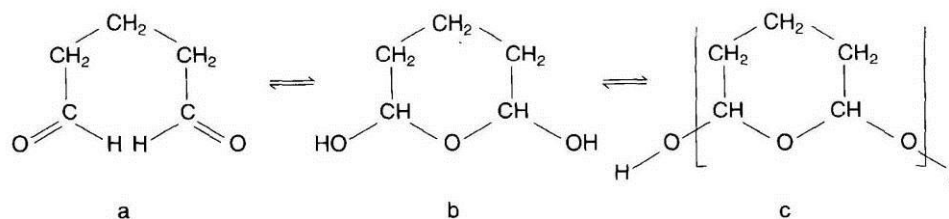


Рисунок 1 – Равновесие глутарового альдегида в водном растворе

Содержание свободного альдегида в растворе ГА как правило, не более чем 4%. Скорость полимеризации ГА в водном растворе зависит от концентрации, pH и температурных циклов. Водный ГА может полимеризоваться при щелочных pH до выхода непредельных продуктов (Рис. 2).

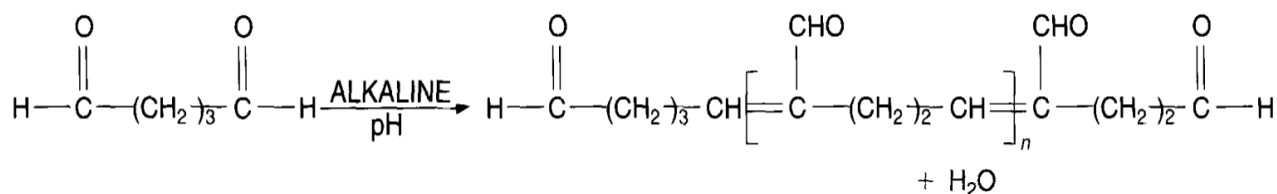


Рисунок 2 – Полимеризация водного раствора ГА в щелочной среде

Химизм сшивки ГА. Реакции полимеризации ГА с первичными аминами показана на Рис. 3, которая также подтверждается данными ИК и УФ спектроскопии. Поперечные сшивки в меж- и внутримолекулярных взаимодействиях образуют ковалентные связи. Это может происходить двумя путями: формирование основания Шиффа по реакции альдегидной группы с аминогруппой лизина или гидроксизина (Рис. 3) или альдольной конденсации между двумя соседними альдегидами. Связь основания Шиффа не очень стабильна, в то время как продукт альдольной конденсации стабилен. ГА не только взаимодействует с аминогруппами, но также может реагировать с карбокси-, амидо- и другими группами белков.

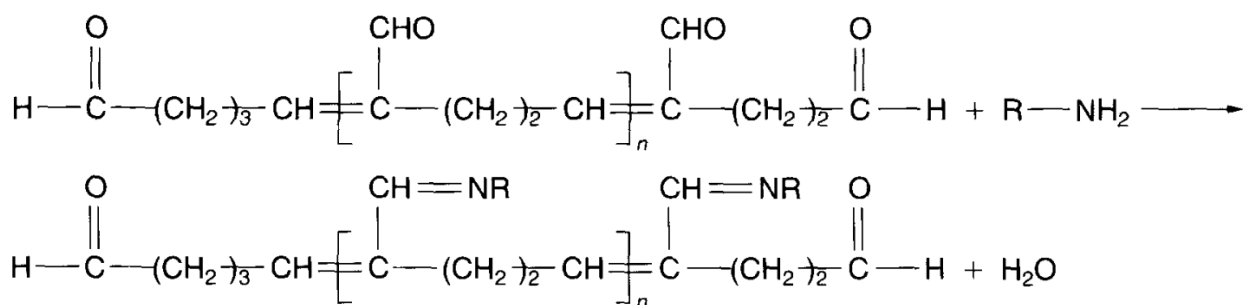


Рисунок 3 – Реакция полимеризации ГА с первичными аминами

Ряд активности ГА с определенными соединениями выглядит следующим образом: первичные амины > пептиды > гуанидины > вторичные амины > гидроксильные группы. По сравнению с формальдегидом и другими альдегидами, поперечные сшивки являются более стабильными, т.к. ГА вступает в реакцию с белками, такими как альбумин и коллаген, в том числе и мукополисахаридами, в том числе, гепарином. Механизм сшивки глутаровым альдегидом молекул коллагена (кросс-линк) представлен на Рис.4.

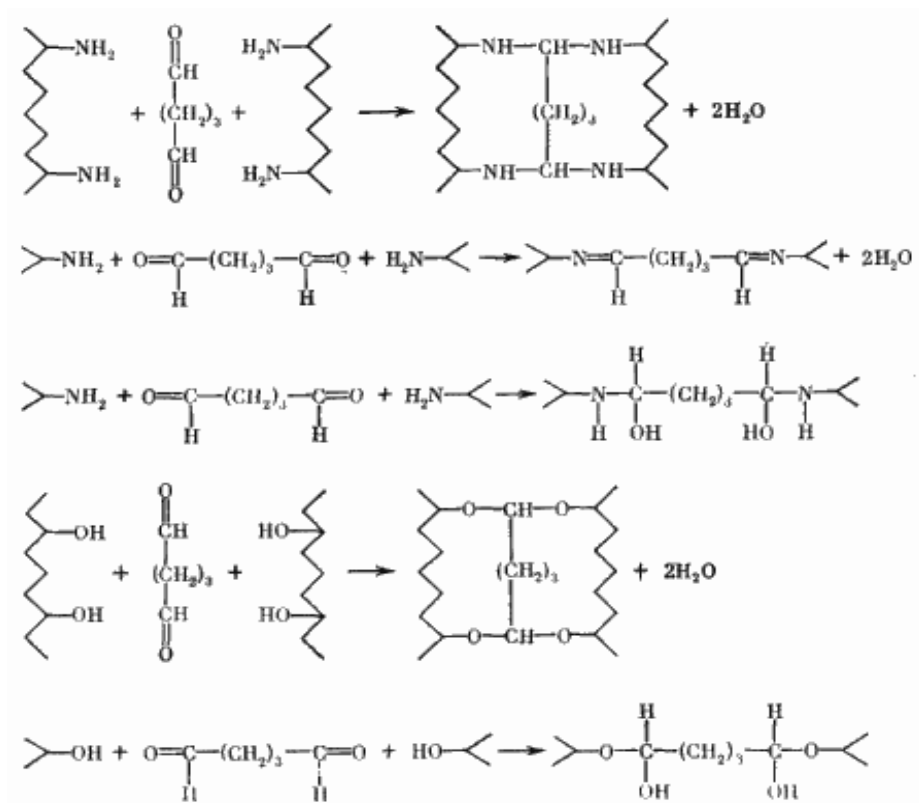


Рисунок 4 – Механизм сшивки глутаровым альдегидом молекулы белка

ГА широко используется в качестве сшивающего агента для изготовления клапанов из ткани бычьего перикарда или обработки свиных аортальных комплексов и клапанов [85, 86, 93, 97, 98]. За последние 45 лет эти клапаны были имплантированы тысячам пациентов с очень высокой степенью клинического успеха. По сравнению с механическими клапанами, клапаны, обработанные ГА, имеют то преимущество, что они являются биосовместимыми, нетромбообразующими и не разрушают клетки крови, то есть не требуют антикоагулянтной терапии после имплантации. Ткань клапанов также обладает хорошими гемодинамическими свойствами, аналогичными свойствам живой ткани. Использование ГА оказалось успешным в снижении механической и структурной деградации клапанов, а также в снижении послеоперационной инфекции. Стабилизация ГА выполняет следующие функции:

- 1) является эффективным стерилизатором в комбинации с выдержкой в формальдегиде после фиксации,
- 2) уменьшает антигенность белка соединительной ткани,
- 3) влияет на механические свойства ткани.

Концентрации ГА, которые используют для обработки ткани клапанов колеблется от 0,2 до 0,6%. Более низкие концентрации альдегидов являются неэффективными стерилизаторами, особенно в отношении некоторых видов микобактерий. Более высокие концентрации альдегидов могут сделать ткань слишком жесткой. Условия фиксации, такие как чистота, концентрация, температура, pH и степень воздействия альдегида определяют тип и степень сшивки и в результате конечные свойства материала.

Хотя метод изготовления ткани клапанов с использованием ГА, как правило, удовлетворителен, были и неудачи. Возможные причины неудач заключаются в следующих основных моментах — разрыв поперечных связей, поглощение белков плазмы, гидролиз коллагена коллагеназой, механические поломки фибрилл коллагена и иммунологические реакции. Однако нет никаких доказательств того, что можно было бы отнести эти проблемы к методу сшивания ткани с использованием ГА. Водные растворы ГА являются сложными, способными претерпевать различные типы реакций. Все подобные реакции с участием ГА могут способствовать изменению качества фиксации. Поэтому нужны более фундаментальные исследования по методам фиксации белков с использованием ГА для выяснения природы реакций, которые могут пролить свет на причины выхода из строя ткани клапанов. Соединения полиэпоксидов активно

используются как агенты, образующие в ткани поперечные сшивки. Они, как сообщается, обеспечивают более выраженный антикальциевый эффект по сравнению с ГА. Непосредственная роль ГА в процессе кальцификации является неопределенной, поэтому преждевременно делать вывод, что эпоксисоединения будут работать лучше, чем ГА, не правильно.

Сшивки ГА не могут быть пригодны для материалов, где происходит взаимодействие и инфильтрации в толщу клеток и для обработки хирургических ран такие материалы не годны. С другой стороны, если определенные коллагеновые структуры остаются нетронутыми после имплантации в ткань, то отказ имплантатов вследствие клеточного вторжения может быть предотвращен путем сшивки ГА.

Также в некоторых работах [68, 89] было изучено влияние сшивки ГА на иммунологический ответ. Антигенность ткани перикарда, фиксируемой в 0,2% ГА и в 1% ГА, изучали на кроликах. Было обнаружено, что ткани, более сильно сшитые ГА, показали меньше антигенности.

ГА, будучи универсальным сшивающим агентом, имеет большое значение в подготовке биологических протезов. Излишне говорить, что остаточный ГА в имплантатах вреден, и достаточно, проявляя осторожность, удалить непрореагировавший ГА до имплантации, чтобы снизить токсичность. Аминокислоты, такие как L-глутаминовая кислота и глицин были использованы, чтобы нейтрализовать остаточный ГА, а также активные концы альдегида в ткани матрицы после сшивания. Эти альдегид-обработанные материалы показали низкую цитотоксичность в клетках в культуре. Эти результаты также были обнаружены в методах по эндотелизации ткани *in vivo*. Эффективность промывки биопротезов и важность носителей были должным образом подчеркнуты в литературе, это устранило бы по крайней мере первичный цитотоксический эффект ГА. Различные методы фиксации были изучены для того, чтобы преодолеть некоторые из неблагоприятных последствий сшивания ГА на механические свойства ткани. Они показали очень обнадеживающие результаты. Были подготовлены ГА-фиксированные ткани с механическими свойствами напоминающие натуральные ткани. Однако наличие таких методов, которые смогли бы преодолеть такие проблемы, как разрыв и кальциноз биопротезов, в долгосрочной перспективе еще предстоит выяснить.

Были предложены альтернативные методы зашивки ткани, чтобы преодолеть некоторые из проблем, как считается, связанных со сшиванием ГА. Полиэпоксиды, глицерол, карбодиимиды, и т.д. были изучены в качестве сшивающих агентов вместо ГА. Обработка полиглицидиловым эфиром и сшивка ГА, как сообщается, механически эквивалентны при изготовлении биопротезов из бычьего перикарда. Хотя створка свиного аортального клапана, фиксированная полиглицидиловым эфиром, показала меньше кальцификации, чем ГА-фиксированные имплантаты в исследованиях подкожным оперированием, они также показали не очень хорошие результаты в сопротивлении ферментативной деградации. Таким образом, у ГА-фиксированных биопротезов, похоже, много достоинств по сравнению с недостатками, которые связаны с этим реагентом в качестве потенциального сшивающего агента. Более фундаментальные исследования по химии сшивки белка с использованием ГА может пролить свет на некоторые проблемы, связанные, как считается в настоящее время, с этим реагентом [82].

3.2. Обзор способов обработки ксеноперикарда

На сегодняшний день среди биосовместимых материалов несколько обособленно стоят материалы ксеногенного происхождения. Связано это, прежде всего, с малым числом научных исследований, посвященных изучению возможности применения данных материалов в различных отраслях хирургической практики. Имеющиеся же наработки носят локальный характер, поскольку возможность проведения данных исследований обусловлена близостью производства данных материалов, прежде всего, для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

Ксеноперикардальная ткань является широко используемым материалом для изготовления различных биопротезов (биопротезов клапанов, моностворок, кондуитов, пластических материалов, биопротезов сосудов большого диаметра и т.д.). Существуют различные химико-ферментативные методы обработки ксеноперикарда. Основной целью всех методов модификации является создание ткани, обладающей рядом свойств, таких как :

- иммуноинертность,
- высокая резистентность биологической ткани к кальцификации,
- минимальный риск тромбоемболий,
- сохранение структуры коллагеновых волокон,

- высокая плотность поперечной сшивки коллагена,
- возможность имплантации пациентам молодого и даже детского возраста,
- высокая гемосовместимость,
- хорошее моделирование в месте имплантации,
- нулевая хирургическая порозность,
- прочностные деформативные характеристики, сопоставимые с таковыми тканей в месте его применения,
- минимально выраженные адгезивные свойства,
- устойчивость к инфекции и способность к эндотелизации.

Типичные недостатки имплантатов из биологического материала – склонность их к биорезорбции или кальцификации; возможное проявление нежелательных иммунных реакций; опасность инфицирования. В ряде регионов использование биологических ксеноматериалов затруднено из-за социальных и религиозных особенностей.

Распространенным риском при длительном применении имплантатов из биотканей является склонность к кальцификации – образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в объеме имплантируемых изделий. Это огромная проблема для всех разработчиков МИ. Как правило, это приводит к потере функциональных свойств имплантатов и необходимости реоперации. Различают внутреннюю и внешнюю локализацию отложений. При внутренней локализации для биотканей характерно внутрифибрилярное, при наружной – межфибрилярное отложение и отложение на поверхности. Иногда они связаны с образованными при взаимодействии имплантата со средой организма структурами: тромбами, капсулой псевдоинтимы. Кальцификация биоматериалов представляет собой сложный и многостадийный процесс. Поэтому для его исследования привлекают различные физические, биомеханические, иммунологические методы, используют эксперименты как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*.

Применение практически любой методики обработки ксеноперикарда преследует цель полного удаления из биоматериала клеточных элементов, водорастворимых белков и концевых теллопептидов коллагена, как основных антигенов, и сохранение фибриллярных белков (коллаген и эластин), не нарушая при этом их тинкториальных свойств [20], а также последующую антикальциевую обработку биоматериала. Поэтому

в этой работе обзор методов модификации ткани и способы её антикальциевой обработки будут рассмотрены вместе.

Наиболее часто встречается ксеноперикард, обработанный глутаровым альдегидом [31, 63, 98, 112, 124].

Методы химической обработки биоткани для изготовления биопротезов с использованием глутарового альдегида защищены патентами на изобретение [44, 116]. Ткань обрабатывается ГА, приготовленном на различных видах буферных растворов, например, на фосфатном (pH=7.4) или более распространенном HEPES-буфере (pH=7.4) с последующей стабилизацией поверхностно-активными веществами. Основная цель использования поверхностно-активных веществ в данной технологии - профилактика кальцификации биоткани. В качестве поверхностно-активных веществ, ингибиторов кальциноза в данном случае используют додецилсульфат натрия, лаурил-сульфат натрия, тритон X-100 и другие. Они легко проникают в биоткань, сорбируются на коллагене и протеогликанах, способствуют разрушению межмолекулярных связей, за исключением ковалентных, и образованию дополнительных свободных аминогрупп. Ингибирующее действие SDS на процессы кальциноза биоткани связывают с активацией фиксации ионов кальция из среды с образованием защитного кальциевого слоя и с его способностью удалять из биоткани кислые фосфолипиды [88].

Клетки или их фрагменты животного-донора биоматериала могут инициировать реакции иммунного отторжения имплантата в организме реципиента. С целью предотвращения иммунологических реакций необходимо удалить все клетки или их фрагменты из биопротеза на этапе его приготовления. Данная цель достигается частично путем использования глутаральдегида в процессе фиксации ткани, путем отмывки тканей на начальном этапе обработки дистиллированной водой или гипотоническими растворами, что приводит к лизису клеток.

Продолжительность работы имплантатов из биоматериалов, обработанных глутаральдегидом, ограничена процессами биодеградации компонентов биоматериала под действием протеолитических ферментов организма реципиента. В то время как резорбция коллагеновых волокон биопротеза предотвращается благодаря образованию поперечных сшивок при обработке глутаральдегидом, волокна эластина подвержены ферментативной деградации, что приводит к уменьшению срока службы имплантата. Установлено, что добавление танниновой кислоты (tannic acid) к системе на стадии

фиксирования глутаральдегидом может существенно повышать устойчивость волокон эластина к ферментативной деградации [78, 79].

Использование глутаральдегида для фиксации и стерилизации имплантатов из биоматериалов имеет и побочный эффект, обусловленный высокой токсичностью данного вещества. Для снижения токсического эффекта глутаральдегида используют следующие подходы:

- а) нейтрализация глутаральдегида;
- б) использование в качестве стерилизующего агента и раствора для хранения имплантата нетоксичных систем [118, 119, 121];
- в) использование в качестве агента для фиксации менее токсичных соединений (Ultifix-метод [73]).

В целом, нужно сказать, что помимо всех преимуществ, отрицательные эффекты традиционных методов обработки биоматериала ГА хорошо известны [72, 70, 99, 111], так же как и известны методы борьбы с этими недостатками. Учитывая это обстоятельство, минусы использования ГА не влияют на потребность в широком применении этого реагента в биомедицине.

Так же в литературе описаны способы обработки биоткани с целью подавления ее минерализации путем контактирования ткани с водным раствором четвертичной аммонийной соли, в составе которой есть, по крайней мере, один из алкильных радикалов, содержащих 7-15 атомов углерода (Авт. св. СССР 4405327, МКИ 6 А 61 F 2/24, 1983). Недостатком этого способа является тот факт, что обработка раствором четвертичной аммониевой соли лишь экранируют поверхность биоткани, ограничивая, таким образом, доступ минеральных (кальциевых и фосфатных) соединений, а при малейшем нарушении этого "экрана" процесс минерализации развивается. Кроме того, отсутствие ферментативной обработки не обеспечивает снижения иммуногенности.

Ферментативная обработка биоткани необходима для разрушения клеточных элементов (иммуногенных компонентов). В 1988 г. был описан способ подготовки биоткани для ксенопротезирования путем ферментативной обработки террилитином в фосфатном буферном растворе (из расчета 30 протеолитических единиц на 1 г веса влажной ткани ПЕ/г) в течение 4 ч при 43°C, последовательной отмывки в кислотном растворе (20 г лимонной кислоты, 100 г хлорида натрия и 1 л воды), в 1 М растворе гидрокарбоната натрия и растворах хлорида натрия, выдержки в многократно

заменяемом растворе глутарового альдегида в буферном растворе с возрастающей концентрацией и стерилизации (Авт. св. СССР 1398855, МКИ 6 А 61 F 2/24, 1988). Недостатками данного способа являются высокая концентрация фермента, вызывающая разрушение коллагеново-эластической основы биоткани, высокая температура ферментативной обработки, что может привести к снижению активности фермента, а также использование фосфатного буферного раствора в качестве растворителя фермента и лимонной кислоты для создания кислой среды при отмывке, что приводит к образованию нерастворимых фосфатов и цитратов и дальнейшей минерализации биоткани.

В целях уменьшения расхода фермента и предотвращения минерализации биоткани данный метод был модернизирован и описан в патенте РФ № 2197818 [45]. Сущность способа состоит в том, что биоткань для ксенопротезирования перед ферментативной обработкой выдерживают в течение 15-72 ч в гипертоническом растворе хлорида натрия 1-10%-ной концентрации, обрабатывают ферментом в боратном буферном растворе при 32-37⁰С, отмывают сначала в 0.6-6%-ном растворе уксусной кислоты, затем в растворе гидрокарбоната натрия и растворах хлорида натрия, выдерживают в многократно заменяемом растворе глутарового альдегида в буферном растворе с возрастающей концентрацией и стерилизуют. Так же биоматериал, может быть, подвергнут ферментативной обработке с целью удаления конкретных иммуногенных факторов (антигенов), представленных преимущественно соединениями на основе углеводов.

В US Patent Application № 6696060 [123] рекомендовано использование гликозидаз (например, альфа-галактозидазы) для удаления углеводных остатков и использование протеиногликанразрушающих факторов (гиалуронидазы, хондроитиназы АВС) для разрушения протеогликанов.

В современной научной литературе часто встречаются методы обработки ксеноперикарда, основанные на обработке биоткани 2-5%-ным раствором диглицидилового эфира этиленгликоля с последующей обработкой раствором гепарина с концентрацией не менее 100 МЕ/мл (Пат. РФ 2008767 С1, МКИ 6 А 01 N 1/00, 1994), диэпоксисоединениями [51, 52, 59, 60, 62].

Такая обработка придает ксеноперикарду высокую прочность, сохраняя при этом его естественную пластичность, биосовместимость и отсутствие кальциевой

дегенерации, что характерно для всех биопротезов, традиционно обработанных глутаровым альдегидом [63, 61].

Есть мнение, что замена глутарового альдегида на диэпоксид способствует значительному снижению кальцификации у взрослых пациентов (до 0,1% от общего количества имплантаций) [2]. Однако у детей раннего возраста частота развития кальцификации биопротезов остается высокой даже при использовании эпоксидной консервации. Кальцинозу подвержено до 20% от имплантированных биопротезов [30]. Основными факторами, приводящими к кальцинозу сердечных клапанов, изготовленных на основе биоматериалов, являются: а) наличие фосфолипидов; б) наличие остаточных или непрореагировавших молекул глутаральдегида в тканях биопротеза.

Эффективная экстракция фосфолипидов и холестерина из ткани может быть достигнута путем предварительной обработки (до фиксации ГА) биоматериала 80% этанолом (рН раствора 7,4) в течение 24 часов [71] либо путем использования в процессе фиксации ткани смеси [122] из фиксирующего агента (глутаральдегид, формальдегид, эпоксида, карбодииимиды, диизоционаты), денатурирующего агента (этанол, изопропиловый спирт, ацетон, эфиры с небольшой алкильной цепью, кетоны, мочевины) и поверхностно-активного вещества (SDS, Triton X-100, Triton X-114, Igepal, Nonidet P40). В US Patent №6479079 [120] приведены примеры экстракции липидов спиртовыми смесями различного состава (низшие спирты, высшие спирты, многоатомные спирты, органические растворители) при повышенной температуре из бычьего перикарда.

С целью нейтрализации непрореагировавших молекул глутаральдегида биоматериал после стадии фиксации обрабатывают 0,01 – 0,5 М раствором глицина [US Patent 20030068815 Sterilized xenograft tissue]. Другие способы нейтрализации и детоксикации глутаральдегида: а) обработка фиксированного биоматериала уразолом (urazole) в 0,1 М ацетатном буфере при рН 4,5 и температуре 37⁰С в течение 7 дней [112] б) обработка гомоцистеиновой кислотой (homocysteic acid) [124]; азотсодержащими веществами (амины, гетероциклы, аминокислоты) [128].

Кроме того, в US Patent 4648881 [117] уделяется большое внимание составу буферов, используемых для транспортировки, хранения, промывки и фиксации тканей. В частности на всех этапах обработки биоматериала предлагается избегать

использования буферов, в состав которых входит фосфат, поскольку авторами обнаружено, что в таком случае кальцевание биоматериалов значительно снижено. Авторами найдено, что наиболее пригодным для обработки биоматериалов является буфер 0,002 – 0,05 М HEPES с pH 7,1 – 7,5 (наиболее оптимальный 0,02 М HEPES с pH 7,3). Авторами рекомендовано использование буферов, в состав которых вместо фосфата входят борат, карбонат, какодилат, а также буферов MOPS, PIPES. Авторы сообщают также, что использование в процессе обработки биоматериалов солей двухвалентных металлов (магния, бария, стронция, меди, цинка), являющихся конкурентами кальция за места связывания в ткани, ведет к снижению кальцификации имплантатов. Согласно данному патенту свиные клапаны, доставленные в 0,02М HEPES с pH 7,3, зафиксированные в 0,02М HEPES с pH 7,3 + 0,25% MgCl₂ + 0,625% глутаральдегид, отмытые в 0,02М HEPES с pH 7,3 + 0,26% MgCl₂, стерилизованные в 0,02М HEPES с pH 7,3 + 0,26% MgCl₂ + 4% формальдегид, отмытые и сохраненные в 0,02М HEPES с pH 7,3 + 0,26% MgCl₂ + 0,625% глутаральдегид, демонстрировали значительное снижение кальциноза опытах с лабораторными животными.

Значительное снижение уровня кальциноза биопротезов сердечных клапанов было показано в лабораторных исследованиях, в которых в процессе фиксации тканей использовался хелатообразующий агент – ЭДТА [110]. С помощью электронной лучевой томографии было показано, что у некоторых пациентов удалось уменьшить обызвествленные атеросклеротические бляшки с помощью применения комбинации этого хелатора и антибиотика тетрациклина [90].

Было установлено большое сходство между процессом кальцификации клапана, особенно аортального, и процессом кальцификации при атеросклерозе.

Предотвращение кальцификации ГА-фиксированного бычьего перикарда показано при обработке биоткани 40% раствором октандиола [103]. В работе [76] продемонстрировано снижение кальциевой дегенерации бычьего ГА-фиксированного перикарда с помощью хелатора TREN без какого-либо влияния на его долговечность.

Несмотря на разногласия в научном сообществе, некоторое количество современных работ посвящены методу антикальциевой обработки с использованием лимонной кислоты. Кроме декальцифицирующего действия, щелочные цитраты также имеют некоторые другие полезные свойства, такие как предупреждение образования кристаллов кальция [83, 101, 102, 109, 125], регулирование метаболизма кальция и

некоторые противовоспалительные свойства [91], что дает авторам работ основание рассматривать щелочные цитраты в качестве бойцов передовой линии в борьбе по удалению и/или предотвращению кальцификации на нативных человеческих клапанах сердца [69].

Так же перспективными в плане подавления кальций-связывающей активности биоткани представляются фармакологические препараты из группы дифосфонатов. Дифосфонаты являются регуляторами обмена кальция и используются при различных его нарушениях. Данные соединения подавляют преципитацию фосфата кальция из растворов, блокируют его трансформацию в гидроксиапатит, предотвращая тем самым его кристаллизацию.

В настоящее время синтезированы уже три поколения фармпрепаратов данного класса; в том числе, отечественный Ксидифон. Для иммобилизации на биоматериал оптимальным следует считать препарат второго поколения Аредиа, выпускаемый компанией «Новартис» и зарегистрированный в России.

По химической структуре это – 3-амино-1-оксипропилидендифосфоновая кислота, боковая аминогруппа которой может быть использована для образования связи со свободной группой диэпоксида, не вступившей в реакцию поперечной сшивки (так называемая *masking group*). Именно этот механизм был использован в исследованиях 80-х годов, выполненных как зарубежными, так и отечественными учеными. Эти работы доказали антикальциевую эффективность ковалентной иммобилизации аминоксодержащих дифосфонатов на биоматериалы, консервированные глутаральдегида так же на эпоксиобработанный перикард. Биоматериал, модифицированный дифосфонатом, исследовали путем световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону [30].

Итак, литературные данные пестрят информацией о том, насколько разные подходы могут быть к проблеме обработки ксеноткани. Это говорит о том, что в настоящее время, несмотря на активное изучение данной проблемы, единого решения не существует, и поиск ответа на этот вопрос продолжается.

Таким образом, современные медицинские технологии позволяют дистанционно выполнять сложнейшие оперативные вмешательства, оказывать высокотехнологичную лечебную и диагностическую помощь, которая несколько лет назад казалась просто фантастикой. Однако, не смотря на все достижения медицинской науки, остаются

проблемы, которые были актуальны как во времена Гиппократов, так и в настоящее время. Это проблемы восстановления или полного замещения органов и тканей человека.

На сегодняшний день биоматериалы на основе мягких тканей ксеногенного происхождения нашли наибольшее применение в реконструктивно-восстановительной хирургии в силу очевидных преимуществ перед имплантатами другой природы. Одним из самых распространенных среди таких биоматериалов является модифицированный ксеноперикард. Он на протяжении нескольких десятилетий успешно применяется в сердечно-сосудистой хирургии для закрытия дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородок, создания искусственных клапанов сердца, протезирования магистральных сосудов и т.д. Накопленный положительный опыт применения ксеноперикарда в сердечно-сосудистой хирургии натолкнул ряд исследователей на проведение тестов по возможности его использования в других направлениях хирургии.

В силу того, что область клинического применения ксеноперикарда расширяется, растут и требования к этому материалу. Если раньше исследователей интересовала биоткань, пригодная только для кардиохирургии с узким спектром требований, то сегодня хирургам нужен биоматериал с самыми разными физико-механическими и биорезорбируемыми параметрами.

Настоящее исследование позволит пролить свет на вопросы обработки ксеноперикарда с целью получения «интеллектуальных» имплантатов с заданными характеристиками и является частью большой научно-исследовательской работы по созданию медицинских изделий нового поколения.

II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1. Экспериментальный материал

Экспериментальный материал: реактивы производства компаний «Sigma-Aldrich Chemie GmbH» (Германия) и «Panreac Química SA» (Испания), перикардальная ткань телят и быков, забранная у здоровых животных с ОАО МПК «Пензенский» в соответствии с требованиями международных стандартов серии ISO 9001 и ISO 22442 и доставленная в химико-биологическую лабораторию в течение не более 3 часов в изотермических контейнерах («Campingaz» вертикальный 30 л.) в физиологической изотонической среде с аккумуляторами холода.

4.2. Определение физико-механических параметров ксеноперикарда

Исследование зависимости «напряжение — относительное удлинение» для определения модуля упругости проводилось на экспериментальной установке. Для исследования выбирались однородные по толщине образцы ткани перикарда, толщина ткани определялась микрометром не менее чем в 10 точках, на ткани выбирались участки одинаковой толщины, после чего из нее специальным приспособлением вырубались образцы шириной 2 мм и длиной 20-30 мм. Образцы закреплялись в зажимах таким образом, чтобы рабочая часть образца составляла 18-20 мм. Используемая установка позволяла оценивать ряд физико-механических свойств образцов при их нахождении в физиологическом растворе. Во время проведения измерений образцы помещались в 0,9% раствор хлорида натрия (физиологический раствор). Расчет сечения растянутого образца выполняли с учетом его несжимаемости. Образцы представляли собой прямоугольные параллелепипеды, объем которых определялся путем произведения трех измерений. В результате удлинения образца при приложении нагрузки, увеличивается высота параллелепипеда, и уменьшается площадь поперечного сечения. Формула для расчета поперечного сечения:

$$S = (l_0 \cdot h \cdot a) / (l_0 + \Delta l)$$

l_0 – начальная длина образца, мм

h – толщина образца (0,25-0,4 мм)

a – ширина образца (в условиях эксперимента 2 мм.)

Δl – удлинение образца при приложении нагрузки, мм

Исследования проводились в диапазоне температур от 20 до 24°C.

Все исследования зависимости напряжения – относительное удлинение проводили в области упругих деформаций.

В этой области зависимость относительного удлинения от напряжения описывается законом Гука:

$$\frac{\Delta l}{l_0} = \frac{\sigma}{E}$$

Где σ - напряжение Па, рассчитываемое по формуле: $\sigma = \frac{F}{S}$, где

F- приложенная сила, Н;

S – площадь поперечного сечения, м²;

E – модуль упругости, Па.

Область упругих деформаций определяли по следующим признакам: если после каждого цикла нагружение-снятие нагрузки, образец мгновенно восстанавливал свои первоначальные размеры, то данная область относилась к области упругих деформаций. Модуль упругости определяли по тангенсу угла наклона прямых в координатах напряжение – относительное удлинение.

Исследование остальных физико-механических характеристик экспериментального материала определяли на испытательной машине «Instron Biopuls 3342 (0,5 кН)» с анализом следующих параметров: максимальная нагрузка, напряжение при растяжении при максимальной нагрузке, относительное удлинение при растяжении.

4.3. Исследование скорости резорбции биоматериалов на модели *in vitro*

Исследование скорости резорбции материала определяли на модели *in vitro*. Определяли время резорбции образцов ксеноперикарда в боратном буферном растворе (рН=7,4). Испытание окислительной деструкции матриц проводили в реактиве Фентона (рН=7,4). Последний содержит 100 мкмоль/л сульфата железа (Fe²⁺) и 1 ммоль/л 3 % H₂O₂. Образцы высушивали до постоянной массы при 70-85°C. Измеряли массы с точностью до 0,0001 г, затем погружали в модельную среду, инкубировали при 37°C и извлекали по прошествии 2, 4, 12 недель. Образцы снова высушивали и взвешивали. Резорбцию образцов, сопровождающуюся уменьшением массы, отмечали, взвешивая образцы на сроках 2, 4 и 8 недель. Частота смены среды: 1 раз в 3 дня.

4.4. Исследование местного действия биоматериалов после имплантации

Работа выполнена на базе вивария ФГБОУВПО «Пензенской государственной сельскохозяйственной академии» под руководством профессора Г.И. Боряева. Эксперименты на животных (крысах линии Wistar) выполнены с соблюдением всех правил асептики, в соответствии с международными и Российскими принципами и нормами, регламентированными приказами МЗ СССР № 176 от 12.08.1977, № 1179 от 10.10.1983, № 267 МЗ РФ от 19.06.2003, Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным (1964), Европейской конвенцией по биоэтике (1996), основами законодательства РФ (1993). Была использована биологическая модель для изучения тканевой реакции на имплантируемый материал и процесса его биоинтеграции в эксперименте на мелких лабораторных животных — крысах. Морфологические особенности подкожной жировой клетчатки человека и крыс сходны по некоторым параметрам. Общими являются: рыхлая соединительнотканная основа, ячеистое строение, плотность кровеносных сосудов. К достоинствам операций на мелких лабораторных животных можно отнести экономичность и возможность выполнения операций в сравнительно небольшом помещении, без привлечения дополнительных средств и специалистов.

Эксперимент проводили на самцах крыс, породы Wistar, массой 220-260г. Животных содержали на стандартной лабораторной диете. За 24 часа до проведения оперативного вмешательства животные не получали пищи. Перед процедурой имплантации удаляли шерсть с поверхности кожи крыс. Экспериментальную биологическую модель создавали путем имплантации образцов испытуемых материалов под кожу в область межлопаточного пространства подопытным животным. Область имплантации характеризуется малой подвижностью подлежащих анатомических образований. Кроме того, область межлопаточного пространства является одной из наименее доступных для самого животного, таким образом, вероятность его вмешательства в экспериментальный процесс сводится к минимуму. Операцию проводили в стерильных условиях, под эфирным наркозом. Подкожные карманы формировали с помощью стерильного заостренного шпателя. Разрез закрывали рассасывающейся нитью. Рану обрабатывали антисептиком и закрывали клеем медицинским БФ-6.

4.5. Гистологическое исследование образцов биоматериала

Исследования проводились в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации». Тканевую реакцию и изменение структуры биоматериала после имплантации изучали методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилин-эозином и по Вейгер-Ван-Гизону.

4.5.1. Подготовка образцов к окрашиванию

Образцы биоткани фиксировались в нейтральном 5% формалине не менее чем на 24 часа. После фиксации из образца в произвольном порядке иссекался фрагмент размером 10x10 мм и помещался в емкость с проточной водой не менее чем на 6 часов. Затем для обезвоживания образцы обрабатывались спиртом с возрастающей концентрацией (50% и 60% по 4-6 часов; 70%, 80% и 90% по 8-12 часов; в 2-х порциях 100% спирта по 12-24 часов). Обезвоженные образцы помещались в чистый хлороформ на 1-1,5 часа с двукратной сменой хлороформа. Затем куски помещались в смесь хлороформа с парафином (1:1) при температуре 37⁰С, на 3-6 часов. После пропитывания куски выкладывались в силиконовую форму и заливались парафином. С парафинового блока с помощью микротом МЗП-01 «Техном» делали срезы толщиной 5-7 мкм. Срезы фиксировали на предметном стекле. Перед окрашиванием гистологические стекла с целью депаранификации погружали в две порции ксилола на 2-4 минуты в каждой порции. Для удаления ксилола стекла погружали в спирты нисходящей концентрации: 96% - на 2-3 минуты, 70% - на 2 минуты. Остатки спирта удаляли погружением стекла в дистиллированную воду на 2 минуты.

4.5.2. Окраска гематоксилин-эозином

Окраска предполагает использование основного красителя гематоксилина, окрашивающего базофильные клеточные структуры (ядро, рибосомы, РНК-богатые участки цитоплазмы) ярко-синим цветом, и спиртового красителя кислого эозина Y, окрашивающего эозинофильные структуры клетки (цитоплазма) красно-розовым цветом.

После извлечения стекла из дистиллированной воды на срез при помощи пипетки наносили 5-7 капли гематоксилина и выдерживали в течение 1-2 минут. После удаления гематоксилина стекло помещали под проточную воду на 2 минуты. После этого стекло помещали в эозин на 2-3 минуты. Для обезвоживания препарат помещали в растворы с возрастающей концентрацией спирта: 70% спирт – быстро 5-10 секунд; 96% спирт – в течение 2 минут. После обезвоживания стекло на 2 минуты погружали в ксилол. После ксилола препарат накрывали покровным стеклом. На окрашенный срез наносили 1-2 капли бальзама с последующим укрыванием его покровным стеклом.

4.5.3. Окраска по Ван-Гизону-Вейгерту

Метод окраски микропрепаратов в гистологии, предназначенный для изучения структуры соединительной ткани. Красителем служит смесь кислого фуксина и пикриновой кислоты, причем первый компонент окрашивает коллагеновые волокна в ярко-красный цвет, а второй придает прочим структурам ткани жёлтую окраску. В результате окраски ядра клеток приобретают чёрный цвет, коллаген — красный, другие тканевые элементы (включая мышечные волокна и эритроциты) — желтые, фибрин — жёлтый или оранжевый.

Высушенные гистологические стекла с целью депаранификации погружали в две порции ксилола на 2-4 минуты в каждой порции. Для удаления ксилола стекла погружали в спирты нисходящей концентрации: 96% - на 2-3 минуты, 70% - на 2 минуты. Остатки спирта удаляли погружением стекла в дистиллированную воду на 2 минуты. Наносили на срез 10 капель раствора йодной кислоты, оставили на 5 мин. Поместили срезы в раствор Вейгерта, закрыли контейнер (предотвращение испарения этанола) и инкубировали ночь. Промывали срезы в дистиллированной воде. Наносили на срез 10 капель дифференцирующего кислотного буфера, оставили на 10 мин. Затем наносили на срез 10 капель железного гематоксилина Вейгерта 1 и добавили 5 капель железного гематоксилина Вейгерта 2, оставили на 10 мин. Подсиняли образцы в проточной воде в течение 10 мин. Затем наносили на срез 10 капель пикрофуксина по Ван-Гизону, оставили на 7 мин. Быстро (2-3 сек) промывали срезы в дистиллированной воде. Для обезвоживания препарат помещали в растворы с возрастающей концентрацией спирта: 70% спирт – быстро 5-10 секунд; 96% спирт – в течение 2 минут. На окрашенный срез наносили 1-2 капли бальзама с последующим укрыванием его покровным стеклом.

4.5.4. Световая микроскопия

Полученные гистологические стекла с помощью микроскопа изучали в проходящем свете. С помощью цифровой фотонасадки изготавливали микрофотографии препарата. Микроскопические исследования для изучения местного действия после имплантации проводились согласно ГОСТ Р ИСО 10993 6-2009. Гистологические срезы изучали с использованием микроскопа Zeiss Imager A1 (Zeiss). Изображения получали с помощью камеры AxioCam Mrc 5 (Zeiss).

4.6. Экспериментальные модели для оценки функциональных свойств ксеноперикардальных биоматериалов в условиях *in vivo*

4.6.1. Экспериментальные животные и их содержание

В качестве экспериментальных животных для оценки функциональных свойств ксеноперикардальных биоматериалов были выбраны кролики породы Шиншилла массой до 3,5 кг. Выбор именно этих животных для модели имплантации биоматериала в брюшную стенку обусловлен наличием хорошо выраженной апоневротической структуры по средней линии брюшной стенки (Рис. 5), в отличие от лабораторных крыс, у которых апоневроз наружной косой мышцы живота выглядит как тонкая, трудно препарлируемая соединительно-тканная структура.



Рисунок 5 – Передняя брюшная стенка экспериментального животного (по краям рассечения – четко выраженный апоневроз)

Имплантация биоматериала в этом случае могла быть крайне затруднительной, что повлияло бы на достоверность результатов оценки функциональных свойств. Выбор экспериментальных животных для модели имплантации биоматериала в мочевой пузырь обусловлен размерами лабораторных животных. Мочевой пузырь лабораторной крысы слишком мал.

Исследования были проведены в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1987г.); федерального закона «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997г.; приказа № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г. ("Об утверждении Правил лабораторной практики") и требованиями «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986г.). Акклиматизация животных в виварии испытательного центра ЗАО НПП «МедИнж» проходила в течение 14 суток. Во время этого периода все животные оставались здоровыми. Кроликов содержали в стандартных условиях, в просторных металлических клетках с вентилируемым дном. Лабораторные животные содержались на стандартной диете. Микробиологический статус кормов соответствует ГОСТ Р 51849-2001 «Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных» и не оказывает негативного влияния на результаты проводимого теста. Для питья использовали фильтрованную водопроводную воду в стандартных питьевых бутылочках. Микробиологический статус воды соответствует СанПиН 2.1.4.1074-01 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения». Доступ к воде и корму свободный. В качестве подстилки использовали древесные опилки лиственных пород. В комнате содержания животных поддерживали постоянные условия окружающей среды: температура 18-22°C, относительная влажность 50-65%, 12-ти часовой цикл освещения и 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час. Температуру и влажность регистрировали и документировали раз в день.

4.6.2. Модель имплантации биоматериала в брюшную стенку

Оценку функциональных свойств биоматериала «КБ-1» проводили на модели протезирования брюшной стенки. В качестве экспериментального животного были выбраны 15 половозрелых кроликов-самцов породы Шиншилла массой до 3,5 кг. Таким образом, была создана модель имплантации исследуемого ксеноперикардального биоматериала, максимально приближенную к условиям протезирования брюшной стенки человека. Материалом сравнения в эксперименте была полипропиленовая сетка «Линтекс», производства г. Санкт - Петербург, широко применяемый синтетический препарат для укрытия дефектов соединительной ткани после грыжесечения. По окончании эксперимента проводили сравнительную оценку результатов имплантации синтетического материала и ксеноперикардального биоматериала. Перед имплантацией было выбрито операционное поле. Кожу была обработана раствором йодопирона и 70% раствором этилового спирта. Животных подвергали общей анестезии методом масочного эфирного наркоза по открытому контуру. Выполняли срединный продольный разрез передней брюшной стенки и подлежащих тканей длиной 5 см. Тупым путем препаровали ткани передней брюшной стенки до апоневроза наружной косой мышцы живота. Апоневроз рассекали в продольном направлении и помещали между его листками подготовленные имплантаты размером 2x2 см (Рис. 6).

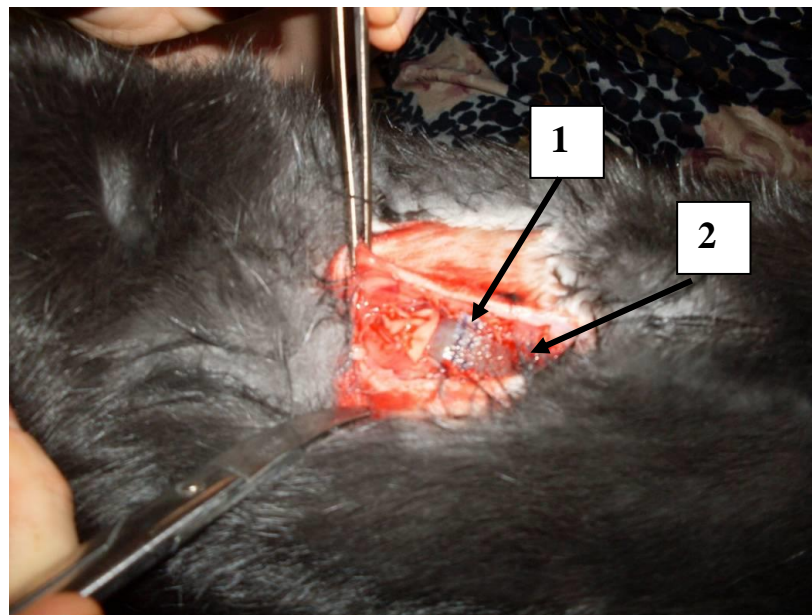


Рисунок 6 – Имплантация ксеноперикардального биоматериала (1) и полипропиленовой сетки (2) между краями рассеченного апоневроза кролика

Имплантаты подшивали к окружающим тканям с использованием полипропиленовой нити «Premilene» 5/0 (BBraun). Ушивание рассеченной ткани передней брюшной стенки выполняли непрерывным швом рассасывающейся нитью «ПГА» 5/0 (МедИнж). Кожу в области операционной раны обрабатывали раствором йода. Мягкие ткани вокруг зоны операции инфильтрировали раствором антибиотика широкого спектра действия (цефазолин) из расчета 0,01 г на 100 г веса животного. Из состояния наркотического сна кролики выходили через 15-20 минут после прекращения подачи эфира. В послеоперационном периоде животных содержали в виварии на стандартном пищевом режиме. Проводилось наблюдение за состоянием операционных ран. Осложнений в раннем послеоперационном периоде выявлено не было. Из эксперимента животных выводили путем передозировки эфира через 3, 6 и 12 месяцев после операции. Из зоны имплантации полипропиленовой сетки и ксеноперикарда получали по 4 образца ткани размером 5x5 мм, которые помещали в 10% раствор нейтрального забуференного формалина, затем проводили гистоморфологическое исследование. Гистологическое исследование проводили по описанной ранее методике. Светооптическое исследование окрашенных срезов проводили с помощью микроскопа фирмы «Carl Zeiss» под увеличением от 40 до 400 раз. Морфометрическое исследование выполняли с использованием фотографической насадки к микроскопу «Axioskop». В препаратах, полученных при вшивании в переднюю брюшную стенку кроликов ксеноперикардального биоматериала и полипропиленовой сетки, посредством программ «Axiovision» и «Image Tool v.3.0» подсчитывали: количество фибробластов и фиброцитов, относительную площадь коллагеновых и эластических волокон, относительную площадь волокон ксеноперикардального биоматериала. Кроме того, подсчитывали площадь коллагеновых и эластических волокон с серозной и фиброзной сторон ксеноперикардальной пластины (окраска срезов по Ван-Гизону-Вейгерту).

4.6.3. Модель имплантации биоматериала в мочевого пузырь

Оценку функциональных свойств биоматериала «КБ-II» проводили на экспериментальной модели «in vivo» (протезирования дефекта мочевого пузыря) на четырёх половозрелых кроликах-самцах породы шиншилла массой до 3,5 кг. Перед имплантацией было выбрано операционное поле. Кожу была обработана раствором

йодопирона и 70% раствором этилового спирта. Животных подвергали общей анестезии методом масочного эфирного наркоза по открытому контуру. Эксперимент включал размещение ксеноперикардального биоматериала (лоскуты размером 1x1 см) в теле мочевого пузыря. Причем серозной стороной биоматериал моделировали в просвет пузыря, фиброзной – к брюшине. Биоматериал фиксировали рассасывающимся шовным хирургическим материалом со средним сроком рассасывания нитью Safil 3/0 колющей иглой HS1/2 17 мм. Кожу в области операционной раны обрабатывали раствором йода. Из состояния наркотического сна кролики выходили через 20-25 минут после прекращения подачи эфира. В послеоперационном периоде животных содержали в виварии на стандартном пищевом режиме. Проводилось наблюдение за состоянием операционных ран экспериментальных животных. Осложнений в раннем послеоперационном периоде выявлено не было. Выведение животных из опыта производили через 6 и 12 месяцев. Гистологическому исследованию по описанной выше методике подвергались микропрепараты, изготовленные из фрагментов стенки мочевого пузыря, содержащих имплантат. Изучали основные морфологические параметры тканевой реакции.

4.7. Статистическая обработка экспериментальных данных

Полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Office Excel. Проводили вычисление среднего значения, стандартного (среднеквадратичного) отклонения и стандартной ошибки среднего. Оценку среднего и уровень значимости различий между средними значениями каждой из экспериментальных групп и контроля оценивалась по критерию Стьюдента (t).

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛОВ ОБРАБОТКИ КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНОЙ ТКАНИ

5.1. Предварительная обработка и отбраковка

Лоскуты ксеноперикардиальной ткани после доставки в лабораторию были подвержены предварительной обработке и отбраковке. Каждый лоскут аккуратно обрезали ножницами, отделяли перикардиальные связки и удаляли остатки жировой ткани. Перикард с выраженными дефектами (неравномерная толщина, царапины, складки, вмятины, бляшки и т.д.) отбраковывали. Затем лоскуты подвергались выдерживанию в течение 24 часов в гипертонической среде возрастающей концентрацией для очистки от крови и экстракции водорастворимых белков.

5.2. Методика обработки ксеноперикардиальной ткани

За основу разработки взят способ подготовки биоткани для ксенопротезирования, описанный в Патенте РФ № 2197818. Обработка ксеноперикарда с целью получения биоматериала для имплантируемых изделий – многостадийный процесс. Сущность способа состоит в том, что биоткань после выдерживания в гипертонических растворах подвергается обработке протеолитическим ферментом. Подобранные условия действия фермента (температура, рН, концентрация) позволяют сохранить фибриллярные белки и полностью разрушить клеточные элементы, которые после инактивации фермента и инкубации в средах с разным осмотическим давлением удаляются из ткани вместе с водорастворимыми белками и концевыми теллопептидами коллагена, являющиеся основными носителями антигенности. При этом архитектоника и тинкториальные свойства коллагена и эластина сохраняются. После химико-ферментативной обработки материала проводится структурная стабилизация ткани раствором глутарового альдегида. ГА-сшивки в коллагеновых тканях значительно снижают скорость биорезорбции биоткани, что делает её биосовместимой и нетромбогенной при сохранении анатомичной целостности, прочности и гибкости. В итоге после химико-ферментативной модификации и структурной стабилизации полученный биоматериал представляет собой биополимер из структурных белков. Общая схема получения бесклеточного материала из ксеноперикардиальной ткани представлена на Рис. 7.

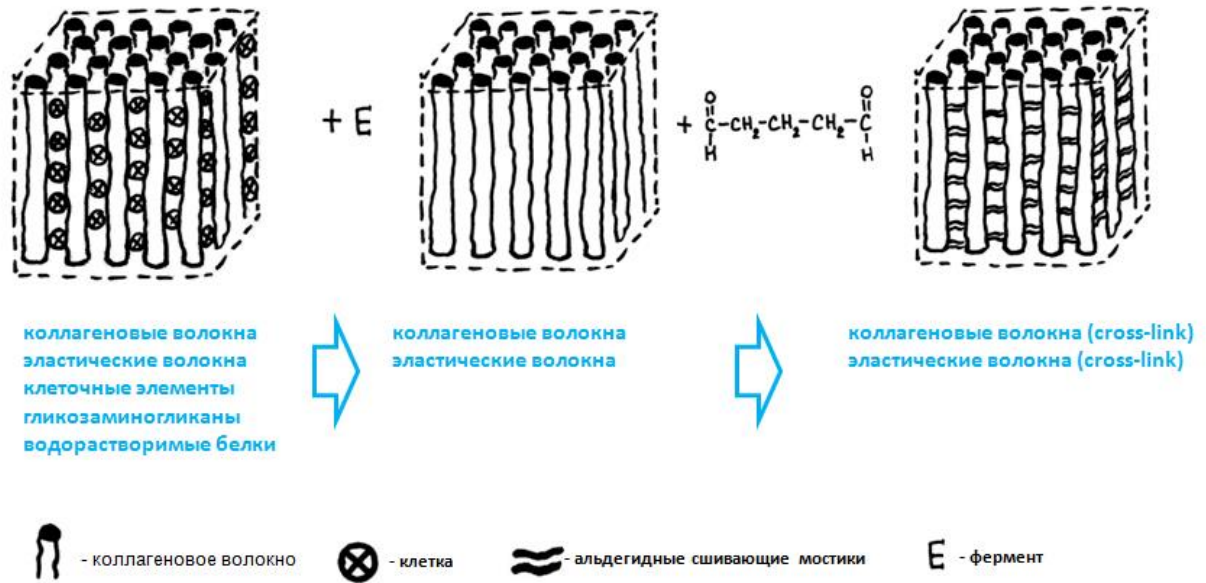


Рисунок 7 – Схематическое изображение химико-ферментативной обработки ксеноперикардальной ткани

Протоколы обработки ксеноперикардальной ткани составлялись путем изменения и последующего комбинирования основных параметров обработки. Мы выделили следующие ключевые стадии обработки:

- концентрация фермента
- температура ферментативной инкубации
- инкубация в средах с разным осмотическим давлением
- концентрация сшивающего агента

1. Концентрация фермента. Концентрация протеолитического фермента при обработке биоткани в свою очередь влияет на 2 параметра, тесно связанных друг с другом – это разрушение/неразрушение клеточных элементов и структурных волокон (коллагеназная и эластазная активность). Для определения «рабочих» концентраций террилитина провели эксперимент по обработке биоткани разными концентрациями фермента при одинаковом времени и температуре. За основу была взята концентрация, которая используется при производстве коммерческого продукта компанией «Кардиоплант». В целях неразглашения коммерческой тайны мы обозначили её X. В эксперименте участвовали 7 групп образцов соответственно с семью концентрациями фермента от низкой до высокой. Результаты оценивали по гистологическим срезам препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону-Вейгерту. Основные

критерии выбора результатов – отсутствие клеточных элементов, сохранность структурных волокон. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты эксперимента по изучению влияния концентрации фермента на состояние биоткани. (красным цветом обозначены результаты, не удовлетворяющие требованиям к биоимплантатам. зеленым цветом обозначены результаты, удовлетворяющие требованиям к биоимплантатам)

Концентрация фермента, ПЕ	Содержание клеточных элементов	Состояние структурных волокон
0,25X	Большое количество	Эластические – без изменений Коллагеновые – без изменений
0,5X	Единичные клеточные элементы	Эластические – без изменений Коллагеновые – без изменений
X	Отсутствие	Эластические – без изменений Коллагеновые – без изменений
1,5X	Отсутствие	Эластические – единично разрушены Коллагеновые – без изменений
2X	Отсутствие	Эластические – частично разрушены Коллагеновые – без изменений
2,5X	Отсутствие	Эластические – разрушены Коллагеновые – частично разрушены
3X	Отсутствие	Эластические – сильно разрушены Коллагеновые – сильно разрушены

Как видно из результатов, при использовании концентраций фермента X, 1,5X и 2X при постоянной температуре и времени теоретически возможно получение биоматериала, отвечающего требованиям к имплантатам. Более низкие концентрации не приводят к разрушению клеточных элементов, что повышает риск иммуногенности, а при более высоких концентрациях фермент начинает проявлять эластазную и коллагеназную активность и разрушает белковую матрицу.

2. Температура ферментативной инкубации. Температурный режим ферментативной обработки влияет на коллагеназную и эластазную активность террилитина. В эксперименте участвовали 6 групп образцов. Инкубацию проводили со стандартной концентрацией террилитина при температурах 30, 33, 35, 37, 39 и 43 °C в течение 40 минут. Результат оценивали по количеству разрушенных волокон коллагена

и эластина на гистологических препаратах образцов после окрашивания по методу Ван-Гизона-Вейгерта. Данные эксперимента приведены на Рисунке 8.

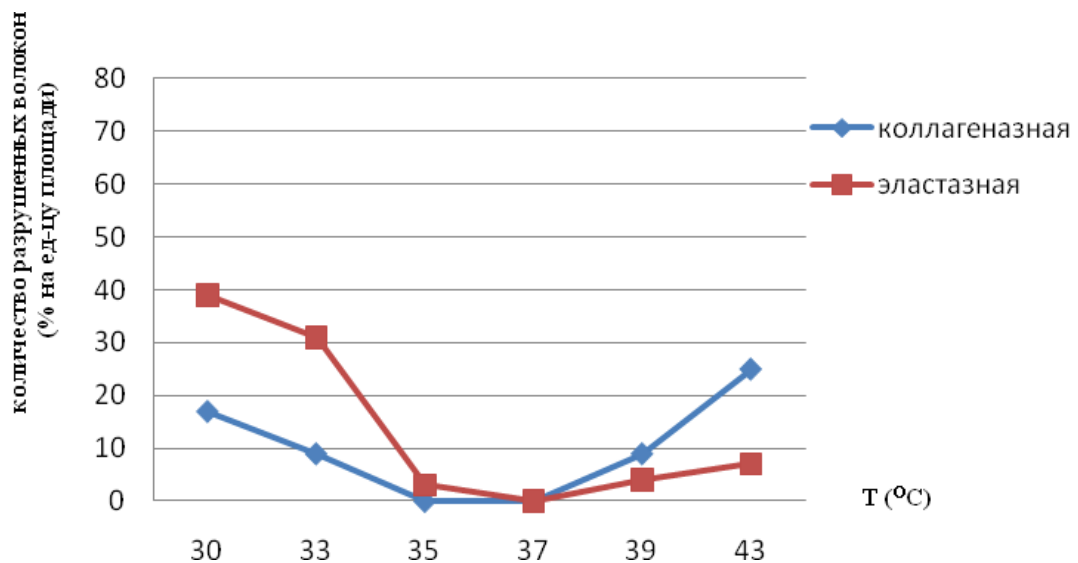


Рисунок 8 – Динамика коллагеназной и эластазной активности террилитина

Как видно из графика температурный оптимум ферментативной активности приходится на 37°C. При этом волокна структурных белков не повреждаются и соединительно-тканый каркас биоткани не повреждается. При температуре 35°C в течение 40 минут инкубации фермент также не проявляет коллагеназной активности, однако обладает небольшой эластазной (повреждения эластических волокон при таком режиме обработки составляет не больше 3%).

В создании матрикса, роль в упруго-деформативных свойствах у которого минимальна, такой протокол обработки может оказаться полезным. Таким образом, мы выделили два температурных режима – 35 и 37°C, которые в дальнейшем использовали при разработке протоколов обработки ксеноперикардальной ткани.

3. Инкубация в средах с разным осмотическим давлением. Для создания более рыхлой и пространственной структуры коллагено-эластического каркаса биоткань инкубировали в средах с разным осмотическим давлением. При этом биоткань после стандартного режима ферментативной обработки погружали в раствор ПИКЕЛЯ (9,5% хлористого натрия + 40% уксусной кислоты) на 2 часа для создания внутри ткани пониженного осмотического давления. Затем биоткань помещали в раствор дистиллята на 2,4,6,8 и 10 часов. Замеряли толщину биоткани на микрометре с цифровой головкой

не менее чем в 10 точках. Фиксировали время, по прошествии которого ксеноперикард обретал максимальную толщину.

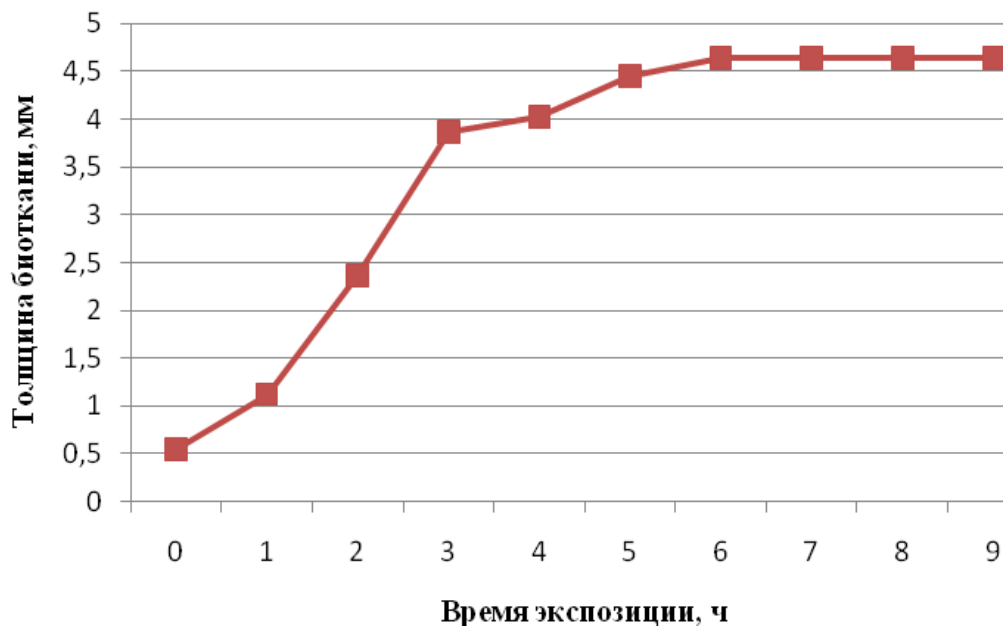


Рисунок 9 – Динамика увеличения толщины ксеноперикарда при инкубации в дистилляте

Из рисунка 9 видно, что толщина биоткани не увеличивается после 6 часов экспозиции в дистилляте. Время экспозиции учитывали в дальнейшем при разработке методов модификации ксеноперикарда.

4. Концентрация сшивающего агента. Концентрация глутарового альдегида, которые используют для обработки биоткани для протезирования, колеблется от 0,1 % до 0,6 %. Более низкие концентрации альдегидов являются неэффективными стерилизаторами, особенно в отношении некоторых видов микобактерий. Более высокие концентрации альдегидов могут сделать ткань слишком жёсткой и впоследствии спровоцировать кальциноз. Концентрация фиксирующего агента непосредственно определяет степень сшивания и в результате конечные свойства материала – их скорость деструкции протеазами реципиента и физико-механические свойства. На основании требований к разрабатываемым материалам, обзора литературы и накопленного опыта производства биопротезов сотрудников лаборатории биопротезирования ООО «Кардиоплант» были определены 3 «рабочих» концентрации сшивающего агента, которые использовались при разработке методов модификации ксеноперикарда – 0,1%, 0,25% и 0,5% исходя из того, что повышение концентрации

глутарового альдегида в экспозициях ведет к увеличению сшивок, а следовательно к увеличению прочностных характеристик и уменьшению скорости деструкции матрикса.

5.3. Матрица параметров протокола обработки биоматериалов

Таким образом, после экспериментального изучения ключевых параметров технологии обработки биоткани были выбраны «рабочие» режимы каждого из них. Исходя из этих данных, была составлена матрица параметров протокола обработки биоматериала (Рис. 10). Путем комбинации параметров по матрице были разработаны протоколы обработки ксеноперикарда для каждого вида биоматериала.

этап обработки	параметры обработки		
конц-я Е (ферментативная обработка)	сохранность белкового каркаса	X ПЕ ← коллагеназная/эластазная активность →	2X ПЕ разрушение белкового каркаса
температура Е-экспозиции (ферментативная обработка)	сохранность белкового каркаса	33 °С ← коллагеназная/эластазная активность →	37 °С разрушение белкового каркаса
экспозиция в гипертонических солевых растворах	время экспозиции меньше	0 ч ← толщина биоткани →	6 ч больше
концентрация сшивающего агента (стабилизация)	быстрее	0,1% ГА ← скорость деструкции →	0,5% ГА медленнее
	ниже	← прочность → выше	

Рисунок 10 – Матрица параметров протокола обработки биоткани.

В эксперименте участвовало 3 группы образцов.

Протокол №1. Образцы ксеноперикардальной ткани обрабатывали следующим образом. После первичной обработки образцы подвергали экспозиции в растворе хлористого натрия в течение 1 ч (концентрация соли в гипертонической среде – 2%), затем промывали проточной водой и проводили ферментацию с концентрацией протеолитического фермента 10 ПЕ в боратном буферном растворе (pH=8.2) в умеренно щелочной среде при температуре 37⁰С в течение 4 часов для разрушения клеточных элементов и сохранения белкового каркаса. После нейтрализации фермента пикельным раствором (9,5% хлористого натрия + 4 % раствор уксусной кислоты)

последний нейтрализовали 0,1 М раствором гидрокарбоната натрия в течение 20 минут. Продукты протеолиза удаляли в дистиллированной воде в течение 1 ч с последующей гипертонической экстракцией в растворах с нарастающей концентрацией. Соли удаляли проточным промыванием в течение 10 минут. Далее обработанный перикард помещали на специальные приспособления в ненапряженном состоянии для придания соответствующей формы и проводили структурную стабилизацию в 0,25% растворе глутарового альдегида на боратном буфере (в кислой среде). Затем материал с заданной формой снимали с приспособлений и подвергали химической стерилизации. Образцы этой группы обработаны в соответствии со способом подготовки биоткани для ксенопротезирования, описанном в патенте РФ № 2197818. Эта группа образцов служила контрольной группой сравнения в экспериментальном исследовании. Шифр образцов «Контроль».

Протокол №2. Образцы ксеноперикардальной ткани обрабатывали следующим образом. После первичной обработки образцы подвергали экспозиции в растворе хлористого натрия в течение 1 ч (концентрация соли в гипертонической среде – 2%), затем, в отличие от контроля, не промывая проточной водой погружали ткань в 4% раствор хлористого натрия для создания пониженного осмотического давления и помещали образцы в ультразвуковую ванну в отличие от контроля на определенное время. Подобная обработка ткани позволяет уменьшить количество используемого фермента на последующей стадии не затрагивая целостности коллагеновых и эластических волокон. Затем проводили ферментацию с пониженной в отличие от контроля концентрацией протеолитического фермента хПЕ (где $x < 5$) в ацетатном буферном растворе (рН=5.4) в кислой среде (в отличие от контроля) при температуре 37⁰С в течение 40 минут (в отличие от контроля) для разрушения клеточных элементов и сохранения белкового каркаса. Замена буферного раствора с боратного на ацетатный за счет смены среды с основной на кислую позволяет сократить время действия фермента при инкубации. После нейтрализации фермента пикельным раствором (9,5% хлористого натрия + 4 % раствор уксусной кислоты) последний нейтрализовали 0,1 М раствором гидрокарбоната натрия в течение 20 минут. Продукты протеолиза удаляли в дистиллированной воде в течение 1 ч с последующей гипертонической экстракцией в растворах с нарастающей концентрацией. Соли удаляли проточным промыванием в течение 10 минут. Далее обработанный перикард помещали на специальные

приспособления в ненапряженном состоянии для придания соответствующей формы и проводили структурную стабилизацию в многократно заменяемых растворах глутарового альдегида с повышенной восходящей концентрацией (0,25% + 0,5%) в отличие от контроля для создания более «защитого» матрикса. Затем биоматериал с заданной формой снимали с приспособлений и подвергали химической стерилизации. Шифр образцов «Ксеноперикардальный биоматериал I – КБ-I».

Протокол №3. Образцы ксеноперикардальной ткани обрабатывали следующим образом. После первичной обработки образцы подвергали экспозиции в растворе хлористого натрия в течение 1 ч (концентрация соли в гипертонической среде – 2%), затем, в отличие от контроля, не промывая проточной водой погружали ткань в 4% раствор хлористого натрия для создания пониженного осмотического давления и помещали образцы в ультразвуковую ванну в отличие от контроля на определенное время. Затем проводили ферментацию с пониженной в отличие от контроля и повышенной в отличие от образцов «КБ-I» концентрацией протеолитического фермента 2хПЕ (где $x < 5$) в ацетатном буферном растворе (рН=5.4) в кислой среде (в отличие от контроля) при температуре 35⁰С в течение 1 часа (в отличие от контроля и «КБ-I»). Комбинацию трех параметров с более высокой концентрацией фермента, низкой температурой и увеличенной экспозицией применяли для увеличения коллагеназной и эластазной активности фермента, что позволяло получить более рыхлую структуру биоматериала. После нейтрализации фермента пикельным раствором (9,5% хлористого натрия + 4 % раствор уксусной кислоты) последний нейтрализовали 0,1 М раствором гидрокарбоната натрия в течение 20 минут. Продукты протеолиза удаляли в дистиллированной воде в течение 1 ч с последующей гипертонической экстракцией в растворах с нарастающей концентрацией. Соли удаляли проточным промыванием в течение 10 минут. Далее обработанный перикард помещали на специальные приспособления в ненапряженном состоянии для придания соответствующей формы и проводили структурную стабилизацию в растворе глутарового альдегида с фиксированной низкой (0,1%) концентрацией в отличие от контроля и группы «КБ-I». Полученная биоткань, будучи слабо «защитой», должна обладать максимальной, в ряду полученных биоматериалов, скоростью биорезорбции. Шифр образцов «Ксеноперикардальный биоматериал II – КБ-II».

Таким образом, общими основными отличительными особенностями технологии обработки экспериментальных групп от способа, описанного в патенте РФ № 2197818 являются следующие:

1. Отсутствие стадии промывки проточной водой перед ферментацией после выдержки в растворе хлористого натрия.
2. Воздействие ультразвука на ткань перед стадией ферментации.
3. Использование ацетатного буферного раствора с кислой средой на стадии инкубации биоткани в ферментном растворе.
4. Снижение концентрации фермента.
5. Уменьшение времени инкубации биоткани в ферментном растворе (в 4 раза).

Дополнительно технология обработки каждой из экспериментальных групп также имеет свои отличительные особенности по сравнению с контролем и друг с другом (Таб. 3).

Таблица 3 – Схема обработки экспериментальных групп образцов биоматериала

СТАДИЯ ОБРАБОТКИ		ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ГРУППЫ			
		контроль	КБ -I	КБ -II	
1	Обработка хлористым натрием	2% (1 ч)	2% (1 ч)	2% (1 ч)	
2	Промывка проточной водой	+	—	—	
3	Гипертонический шок	—	4% (2ч)	4% (2ч)	
4	Воздействие УЗ	—	+	+	
5	Е	Буферный раствор	боратный (pH=8.2)	ацетатный (pH=5.4)	ацетатный (pH=5.4)
		Концентрация фермента	10ПЕ	x ПЕ	2x ПЕ
		Время инкубации	4ч	40 мин	1 час
		Температура (град.С)	37	37	35
6	Инактивация	9,5% NaCl + 4% УК	9,5% NaCl + 4% УК	9,5% NaCl + 4% УК	
7	Нейтрализация (гидрокарбонат)	0,1М	0,1М	0,1М	
8	Промывка дистиллированной водой	+	+	+	
9	Возрастающие концентрации ГА	0,1%	0,25%	0,1%	
		0,25%	0,5%		

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 6. ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КСЕНОПЕРКИАРДИАЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ

В реконструктивно-восстановительной хирургии для восстановления поврежденных тканей и органов необходимы биоматериалы разного строения и следственно, обладающие разными физико-механическими свойствами. Область применения биоматериалов определяется их физико-механическими свойствами: трехмерной структурой и структурой поверхности (топографическими свойствами), механическими характеристиками материала, а также возможностью модифицировать эти свойства.

Физико-механические параметры образцов ксеноперикардальных биоматериалов оценивали по четырем параметрам: модуль упругости, максимальная нагрузка, относительное удлинение при растяжении и напряжение при растяжении при максимальной нагрузке. Согласно полученным данным (Таб. 4), ксеноперикардальные биоматериалы, полученные по разработанным Протоколам, обладают различными упруго-деформативными и прочностными характеристиками.

Таблица 4 – Сводная таблица результатов физико-механических исследований групп образцов

Группа образцов	Модуль Юнга (МПа)	Максимальная нагрузка (Н)	Напряжение при растяжении при максимальной нагрузке (МПа)	Относительное удлинение при растяжении (%)
Контроль	28,98±7,42	28,23±3,40	7,64±2,06	33,44±5,87
«КБ-І»	43,99±5,32	38,32±5,30	8,14±1,02	25,38±6,44
«КБ-ІІ»	22,08±1,58	31,50±4,72	4,92±0,80	32,46±2,54

6.1. Модуль упругости

Согласно Рисунку 11 модуль упругости образцов «КБ-I» превосходит аналогичный показатель для образцов «КБ-II» в ~ 2 раза. Модули упругости образцов «Контроль» и «КБ-II» достоверно не различаются.

Подобное изменение упругих свойств связано с экспозицией материала в фиксирующих растворах с разными концентрациями. Относительно сравнения данных значений модуля упругости групп «Контроль» и «КБ-I», логично предположить наличие более плотной пространственной сети из образованных на матриксе сшивок во втором случае.

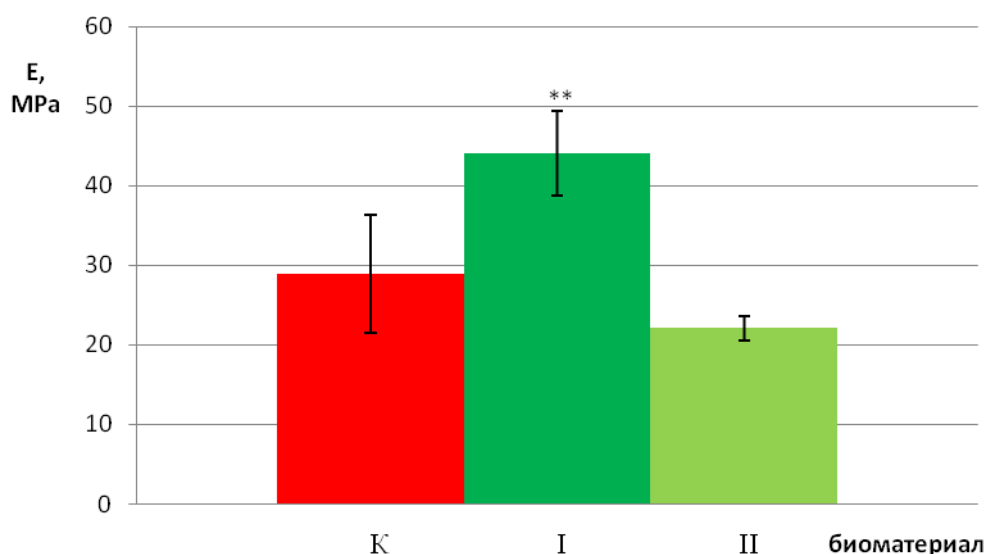


Рисунок 11 – Значения модуля упругости групп образцов
(здесь: ** - достоверно $p < 0,01$)

Образцы «КБ-II» обрабатывались только низкой концентрацией глутарового альдегида (0,1%) по сравнению с группой «Контроль» (0,1% + 0,25%) и это привело к незначительному снижению упругих свойств биоткани без достоверных отличий. Вероятно, качество пространственного расположения поперечных сшивок сопоставимо в образцах обеих тканей и поэтому в зоне абсолютно упругих деформаций материалы ведут себя схожим образом.

6.2. Максимальная нагрузка

Согласно полученным данным (Рис. 12), образцы «КБ-I» обладают самыми высокими прочностными показателями. Максимальная нагрузка образцов этой группы

выше аналогичных показателей группы «Контроль» в 1,36 раза. Полученные данные подтверждают и дополняют результаты исследования модуля упругости образцов. Материал, обработанный сшивающим агентом более высокой концентрации, является более прочным. Это связано с образованием большего количества поперечных сшивок и как следствие получения более прочного материала. Разумеется, количество сшивок в биоматериале – это не единственный критерий, по которому можно оценить прочность биоматериала и его физико-механические параметры в целом. Требуется комплексный подход к изучению этих параметров. В случае с образцами «КБ-II» достоверных отличий относительно показателя максимальной нагрузки не наблюдается.

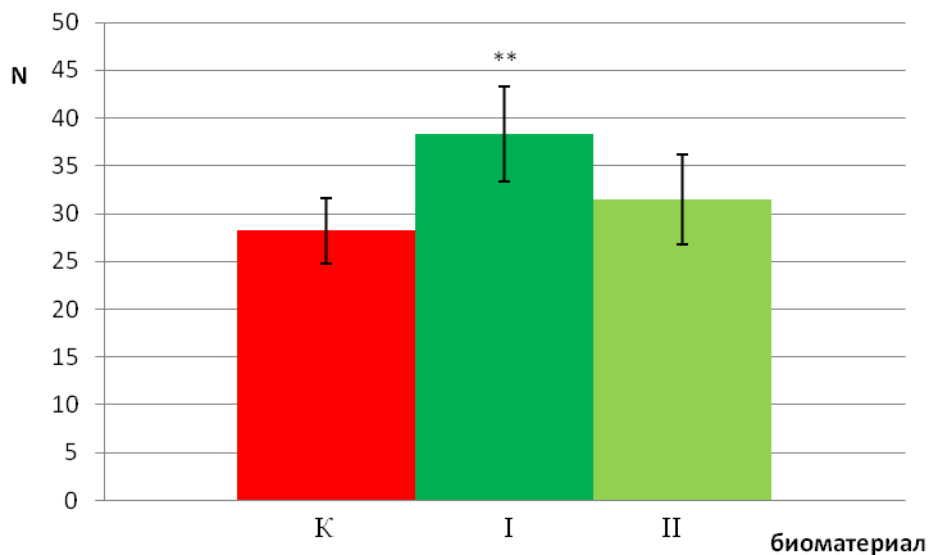


Рисунок 12 – Значения максимальной нагрузки групп образцов
(здесь: ** - достоверно $p < 0,01$)

6.3. Напряжение при растяжении при максимальной нагрузке (НРМН)

Величина НРМН у образцов «КБ-II» ниже по сравнению с группой «Контроль» в 1,55 раза (Рис. 13). Это связано с более глубоким изменением нативной структуры биоткани, сопряженной с утратой некоторого количества слабых и прочных молекулярных взаимодействий. Обработка слабыми растворами сшивающего агента ксеноперикарда по Протоколу №3 сильно влияет на архитектуру матрикса и на распределение сил при одноосном растяжении за счет изменения пространственной структуры самих структурных белков и образованных поперечных сшивок. У образцов

«КБ-I» значение НРМН практически не отличается от аналогичных показателей группы «Контроль» и не обнаруживает достоверных отличий. Следовательно, такой вид обработки биоткани не влияет на распределение сил между волокнами структурных белков при приложении нагрузки в виде одноосного растяжения, а значит, среди всех типов обработки именно Протокол № 2 дает возможность получить архитектуру матрикса сходную со структурой материала после ферментативной обработки и процесса кросс-линга по Протоколу №1.

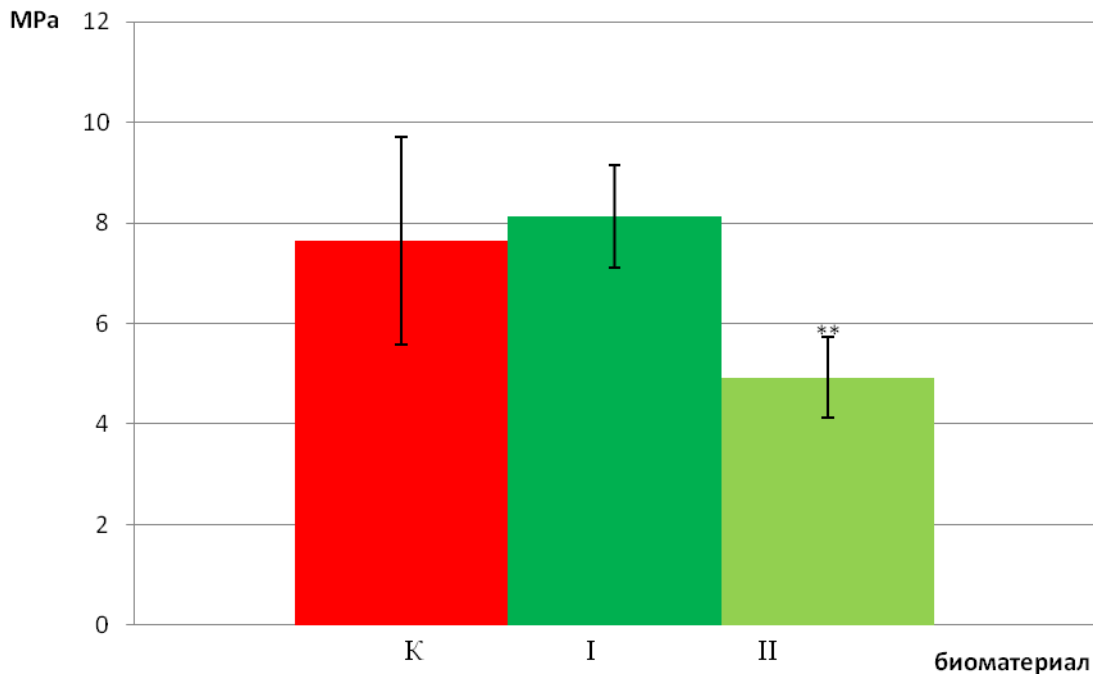


Рисунок 13 – Значения напряжения при растяжении при максимальной нагрузке групп образцов (здесь: ** - достоверно $p < 0,01$)

6.4. Относительное удлинение при растяжении при максимальной нагрузке (ОУР)

Величина ОУР образцов «КБ-I» ниже аналогичного параметра образцов группы «Контроль» в 1,32 раза (Рис.14). Показатели ОУР образцов «КБ-II» и группы «Контроль» достоверно не отличаются. Обработка биоткани по Протоколу № 2 дает менее растяжимый материал. Результаты дополняют данные предыдущих экспериментов по изучению физико-механических свойств и подтверждают наличие у образцов «КБ-I» более плотную и прочную сшивку матрикса глутаровым альдегидом. Качество и количество поперечных сшивок в случае с обработкой по Протоколу № 3 согласно полученным данным сопоставимо с аналогичными у образцов, обработанных по Протоколу №1.

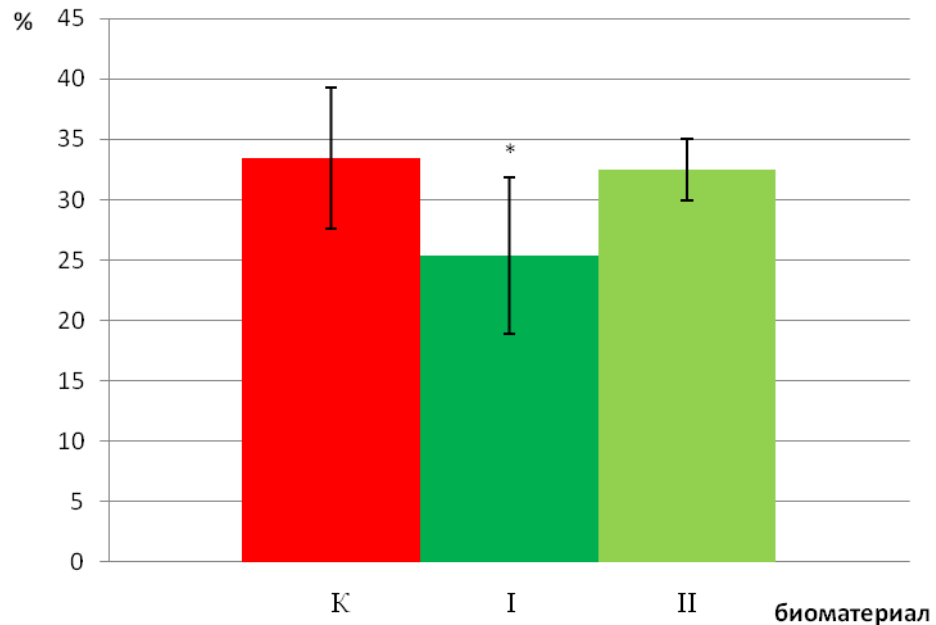


Рисунок 14 – Значения относительного удлинения при растяжении групп образцов
(здесь: * - достоверно $p < 0,05$)

Разработка биоматериалов для реконструктивных операций подразумевает создание имплантатов для замещения той или иной ткани реципиента. Рассмотренные в 1 главе области применения ксеноперикарда говорят о том, что эти ткани имеют отличную друг от друга архитектуру и физико-механические свойства. Соответственно имплантаты, также должны повторять свойства замещающих тканей. Высокой прочностью должны обладать, например имплантаты для замещения сухожильно-связочных структур, а для пластики дефектов тканей, не выполняющих механическую функцию, например, твердая мозговая оболочка, хирургам необходим имплантат, обладающий определенной степенью эластичности и упругости. Для биоматериалов, служащих основой для восстановления лепестков клапанов сердца в сердечно-сосудистой хирургии, одним из важнейших свойств остается прочность, гибкость и эластичность.

После проведения исследований физико-механических свойств полученных биоматериалов складывается следующая картина. После обработки биоткани по Протоколу № 2 получен материал, который обладает более высоким модулем упругости, он выдерживает более высокие нагрузки, и меньше деформируется при максимальной нагрузке. Кроме того, такой биоматериал обладает более высоким напряжением при разрушении. Это биоматериал с более плотно зашитой белковой

матрицей и как следствие более прочной и менее растяжимой структурой. Изученные физико-механические свойства образцов ксеноперикардального биоматериала, обработанного по Протоколу № 3, дают представление об организационной структуре матрицы после данной обработки. Практически по всем свойствам значения параметров физико-механических характеристик этой группы образцов сходны с параметрами образцов группы «Контроль». Это говорит о сходстве в архитектонике матриц биоткани этих групп, однако, отличие значений максимального напряжения при разрушении указывает на то, что пространственная сеть сшивок глутаровым альдегидом матрицы в этих случаях устроена не одинакова.

ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЕ СКОРОСТИ РЕЗОРБЦИИ КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Имплантаты, в зависимости от вида замещающей ткани должны обладать разной скоростью биорезорбции после имплантации. В настоящей главе представлены результаты исследования скорости резорбции образцов полученных ксеноперикардальных биоматериалов при продолжительной инкубации в нейтральной и окисляющей средах. Экспериментальные образцы всех полученных биоматериалов были стабильны в боратном буфере (рН=7,4) и в течение 8 недель их масса изменялась не более чем на 15 % (Рис. 15, 16, 17). Средняя скорость резорбции образцов в боратном буферном растворе (рН=7,4) составила 1,5%, 1,3%, 2,3% в неделю у образцов «Контроль», «КБ-I» и «КБ-II» соответственно. После имплантации материала в ткани животных, он может подвергнуться воздействию агрессивной окисляющей среды, которая формируется при развитии клеточного ответа, например, вызванного развитием реакции на инородное тело. Химия реакций клеточного ответа может описываться реакцией Фентона и сопровождаться внутриклеточным накоплением избытка ионов железа (один из компонентов реактива Фентона). В эксперименте были смоделированы такие агрессивные условия *in vitro* и изучена скорость резорбции экспериментальных образцов ксеноперикарда в реактиве Фентона (рН=7,4).

Быстрая резорбция материала в условиях *in vitro* предполагает и быструю биорезорбцию тканеинженерной конструкции из ксеноперикарда в условиях выраженного клеточного ответа или при развитии воспалительных процессов в организме человека. Под воздействием гидроксильных радикалов реактива Фентона образцы из разных экспериментальных групп претерпевали разную скорость резорбции, отличную от резорбции, наблюдаемой в образцах с инкубацией в боратном буфере (Рис. 15, 16, 17).

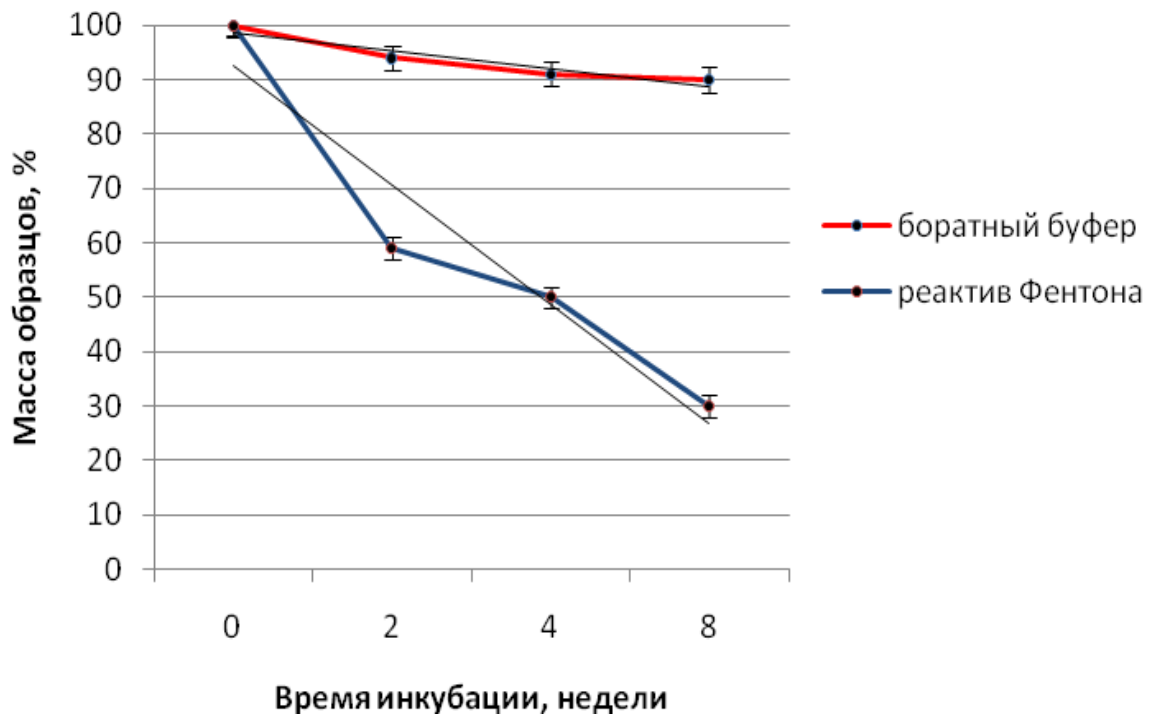


Рисунок 15 – Динамика резорбции образцов группы «Контроль» в боратном буфере и реактиве Фентона.

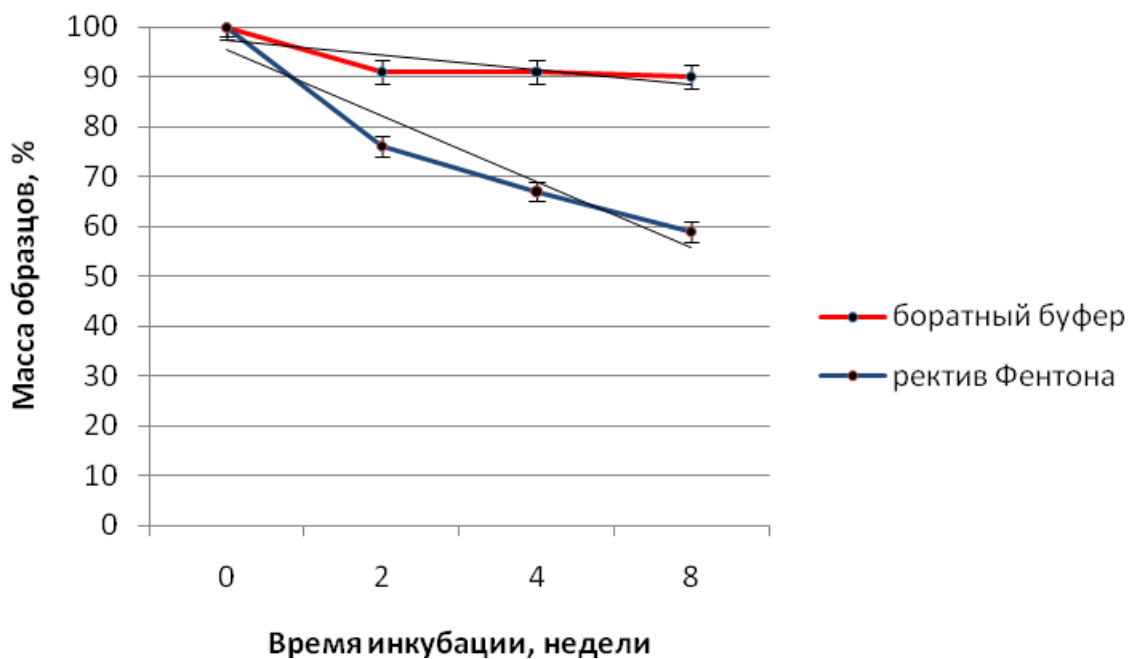


Рисунок 16 – Динамика резорбции образцов «КБ-I» в боратном буфере и реактиве Фентона.

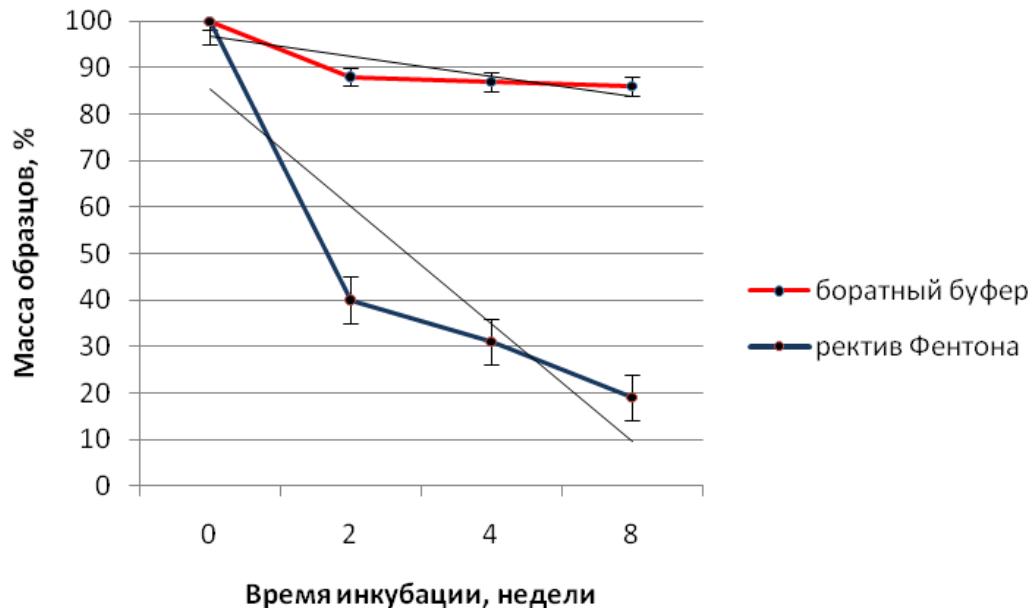


Рисунок 17 – Динамика резорбции образцов «КБ-II» в боратном буфере и реактиве Фентона.

Самую высокую скорость резорбции в реактиве Фентона показали образцы «КБ-II», стабилизированные раствором с низкой концентрацией сшивающего агента. Ко второй неделе масса образцов резко снизилась на 60%, а к восьмой неделе на 81% (Рис. 17). Средняя скорость потери массы этих образцов в эксперименте составила 13% в неделю. Это подтверждает то, что ксеноперикард, стабилизированный в низкой концентрации сшивающего агента, защит слабо и следовательно имеет меньшее количество ковалентных перешивков, а следовательно и подвержен более быстрой биорезорбции после имплантации и интеграции клеток окружающих тканей в имплантат. Такое свойство ксеноперикарда может быть полезным в условиях когда материал выступает в качестве имплантата для замещения дефектов тканей, не подверженных механическим воздействиям и требуется быстрая биоинтеграция и замещение окружающих тканей в материал (например при операции укрытия культи почки в урологии или протезирования твердой мозговой оболочки в нейрохирургии).

У образцов «КБ-I» картина отличается от предыдущей. Реактив Фентона разрушает ксеноперикард, обработанный по Протоколу № 2 через 2 недели на 24%, через 4 недели на 33%, через 8 недель на 41% (Рис. 16). Средняя скорость потери массы в эксперименте образцов «КБ-I» составила 6,8% в неделю. Низкая скорость резорбции ксеноперикарда, обработанного глутаровым альдегидом более высокой концентрации, способствует значительной устойчивости и сохранению механических свойств имплантата на

протяжении длительного времени. Материал с такими свойствами может быть полезен для протезирования тканей, выполняющих механическую функцию и подверженных нагрузкам в той или иной степени, например при операции протезирования глубокого сгибателя кисти или ахиллова сухожилия в травматологии, а также при операции хирургического лечения стрессового недержания мочи у женщин в гинекологии, где имплантат выступает в качестве поддерживающего ремня.

Комплексное исследование полученных данных, а также данных эксперимента по изучению физико-механических свойств и поведения материалов после имплантации на экспериментах *in vivo*, позволяет сделать вывод об области потенциального применения ксеноперикарда с такими свойствами.

ГЛАВА 8. ИССЛЕДОВАНИЯ МЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ

Гистологическое исследование образцов перикардиальных биоматериалов показало, что все четыре протокола обработки ткани позволяют полностью удалить клеточные элементы из ткани и получить во всех случаях коллагеново-эластический каркас.

8.1. Гистологическое исследование образцов группы «Контроль»

При проведении гистологического исследования ксеноперикарда, обработанного по Протоколу № 1 перед имплантацией было выявлено:

- при окраске гематоксилином и эозином клеточные элементы не встречались (Рис. 18);
- при окраске по Вейгерт-Ван-Гизону выявлено, что состояние эластических и коллагеновых волокон оставалось без изменений (Рис. 19).

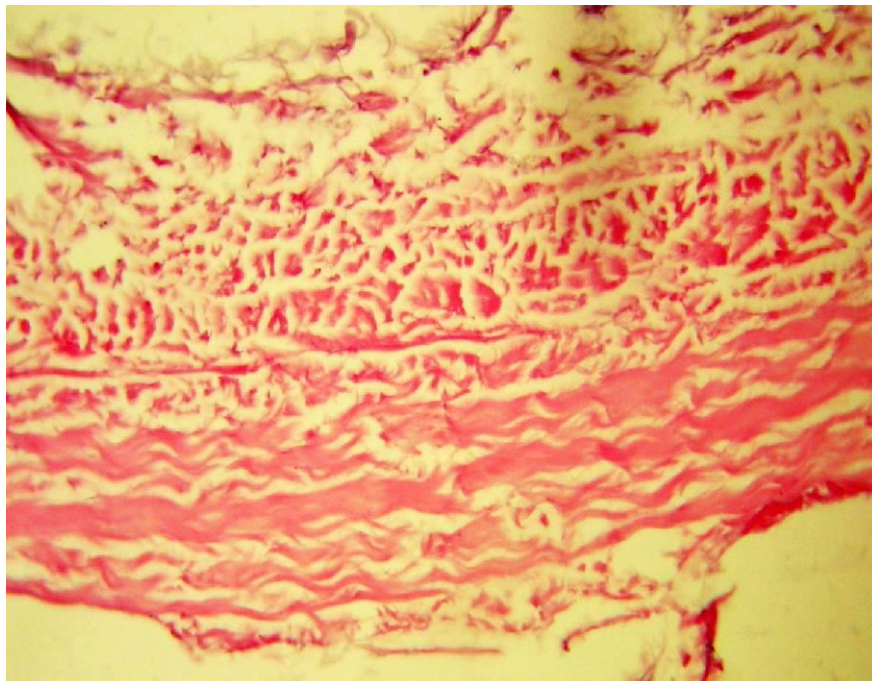


Рисунок 18 – Гистологический срез образца «Контроль». Материал после обработки.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200.

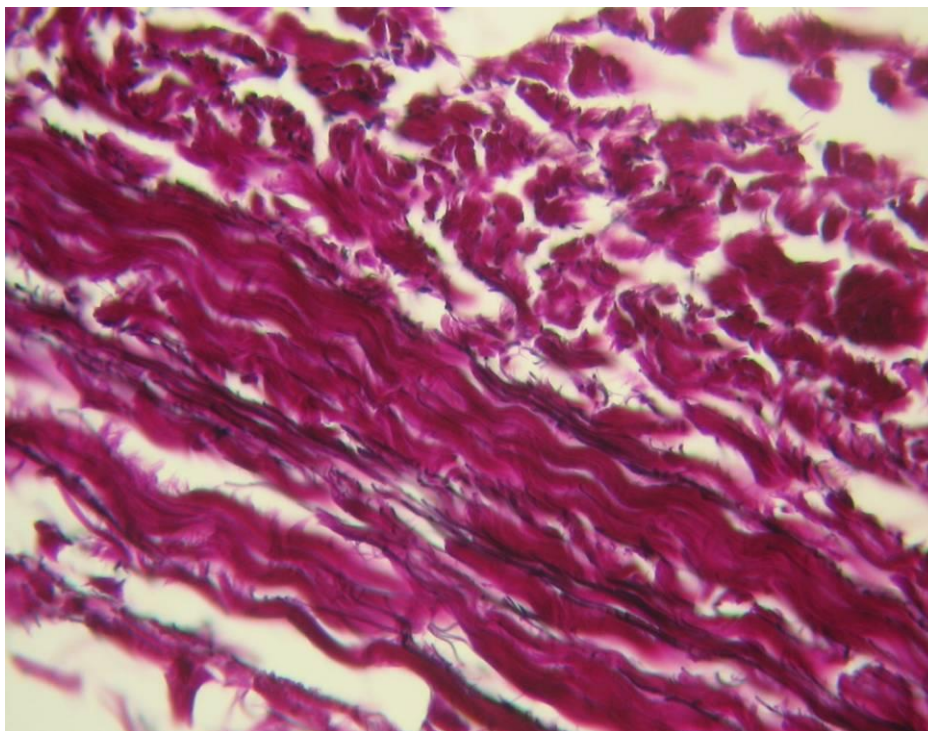


Рисунок 19 – Гистологический срез образца «Контроль». Материал после обработки.
Окраска Вейгер-Ван-Гизон. Ув. х400

При гистологическом исследовании образцов «Контроль» на 14 сутки в исследуемых образцах при окраске гематоксилином и эозином отмечено в 2-х образцах слабо выраженная лимфоцитарная инфильтрация (на толщину $2/3$ от толщины ксеноперикардальной пластины) с включением эпителиоидных и клеток фибропластического ряда, в 1-м образце умеренно выраженная лимфоцитарная инфильтрация. Вокруг образцов ксеноперикарда сохранялась умеренная клеточная инфильтрация, наблюдалось образование грануляционной ткани с единичными новообразованными сосудами (Рис. 20).

При анализе гистологических препаратов окрашенных по Вейгер-Ван-Гизону выявлено разрушение коллагеновых и эластических волокон средней степени выраженности. Что свидетельствует о процессах биорезорбции исследуемого объекта и перестройки материала (Рис. 21).

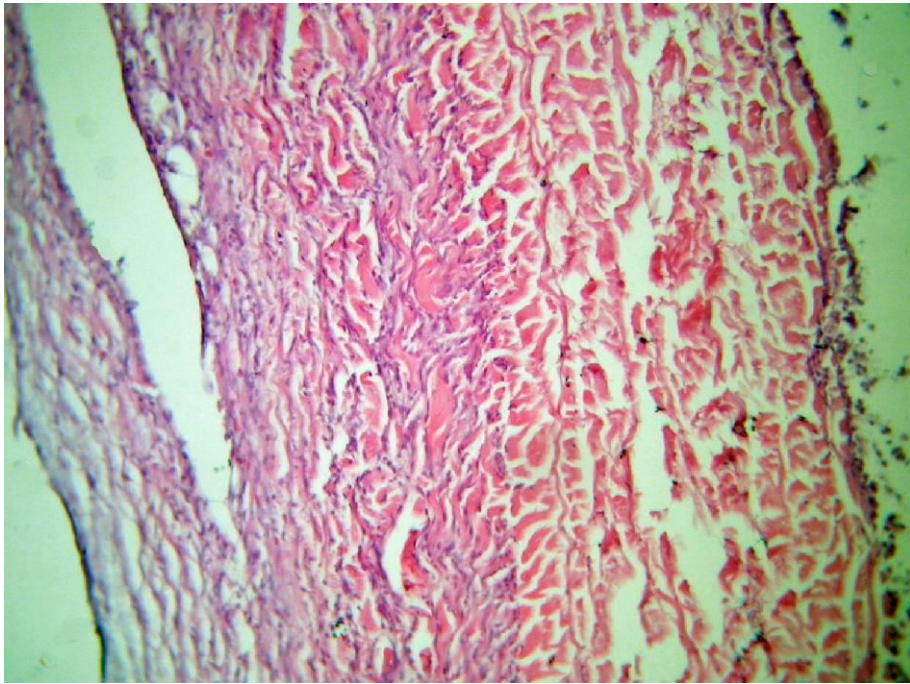


Рисунок 20 – Гистологический срез образца «Контроль». 14 сутки после имплантации.
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

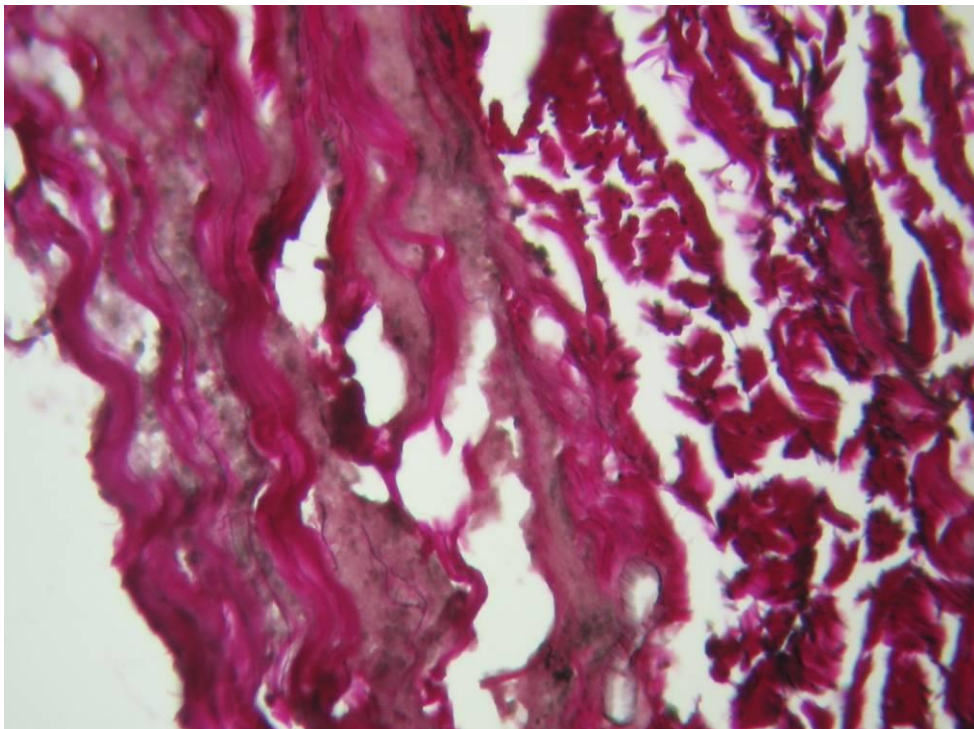


Рисунок 21 – Гистологический срез образца «Контроль». 14 сутки после имплантации.
Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. x400

К концу первого месяца эксперимента в тканевом ложе трансплантата отмечаются выраженные пролиферативные процессы. Биоматериал трансплантата имеет

однородную структуру, по наружной поверхности инфильтрирован лимфоцитами и гистиоцитами. Трансплантат окружен выраженным инфильтрационным валом. В составе клеточного инфильтрата выявляются лимфоциты, гистиоциты, плазматические клетки, клетки фибробластического ряда. В зоне непосредственного контакта с биоматериалом преобладают лимфоциты и гистиоциты, на периферии грануляционного вала пролиферирующие фибробласты и очаги новообразованного коллагена. В реактивной зоне вокруг ксеноперикарда определяются новообразованные кровеносные сосуды (Рис. 22).

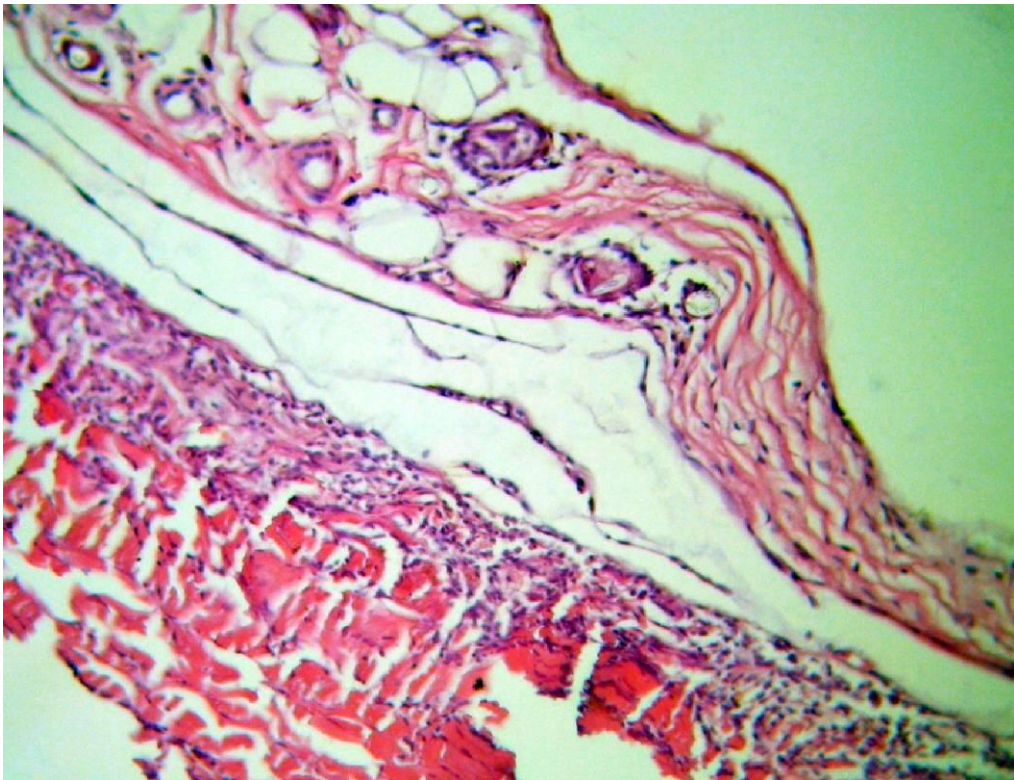


Рисунок 22 – Гистологический срез образца «Контроль». 30 сутки после имплантации.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

При окраске по Вейгерт-Ван-Гизону выявлены формирующиеся собственные коллагеновые и эластические волокна (Рис. 23).

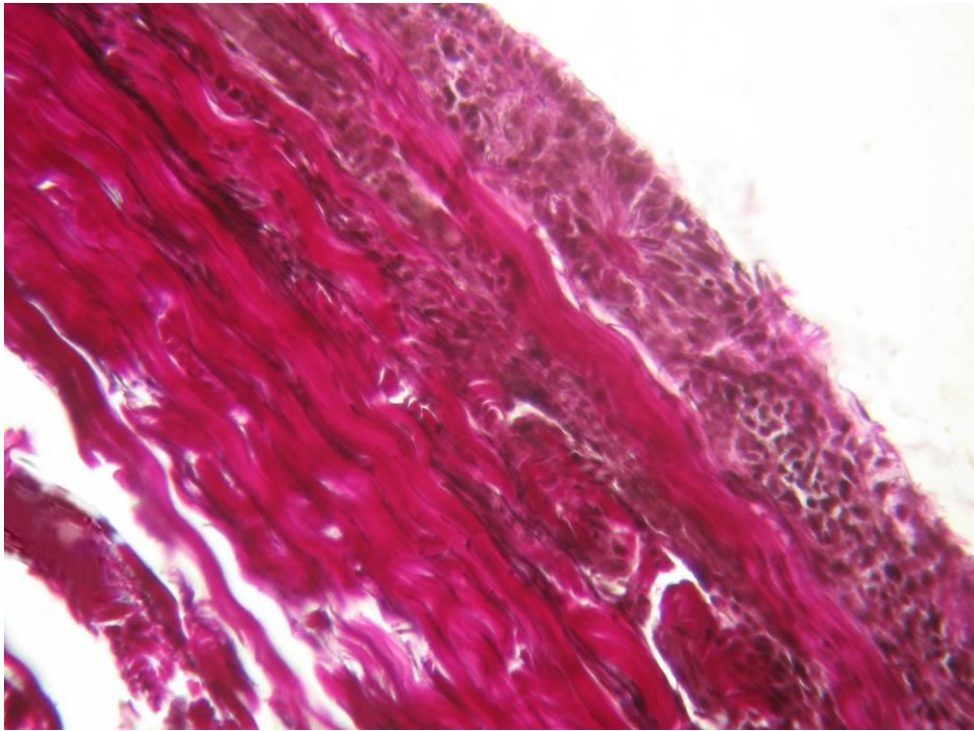


Рисунок 23 – Гистологический срез образца «Контроль». 30 сутки после имплантации.
Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. x400

Через два месяца начинают проявляться явления биорезорбции биоматериала на наружной его поверхности, отмечено практически полное прорастание собственной соединительной ткани и новообразованных сосудов. Отмечается значительное уменьшение количества лимфоцитов и макрофагов в воспалительном инфильтрате. Пролиферирующие фибробласты активно синтезируют соединительнотканый каркас вокруг трансплантата (Рис. 24).

При окраске по Вейгерт-Ван-Гизону выявляется большее количество новообразованных собственных коллагеновых и эластических волокон. Данные изменения свидетельствуют об активном процессе биорезорбции и интеграции собственной соединительной ткани в имплантат с последующим его замещением (Рис. 25).

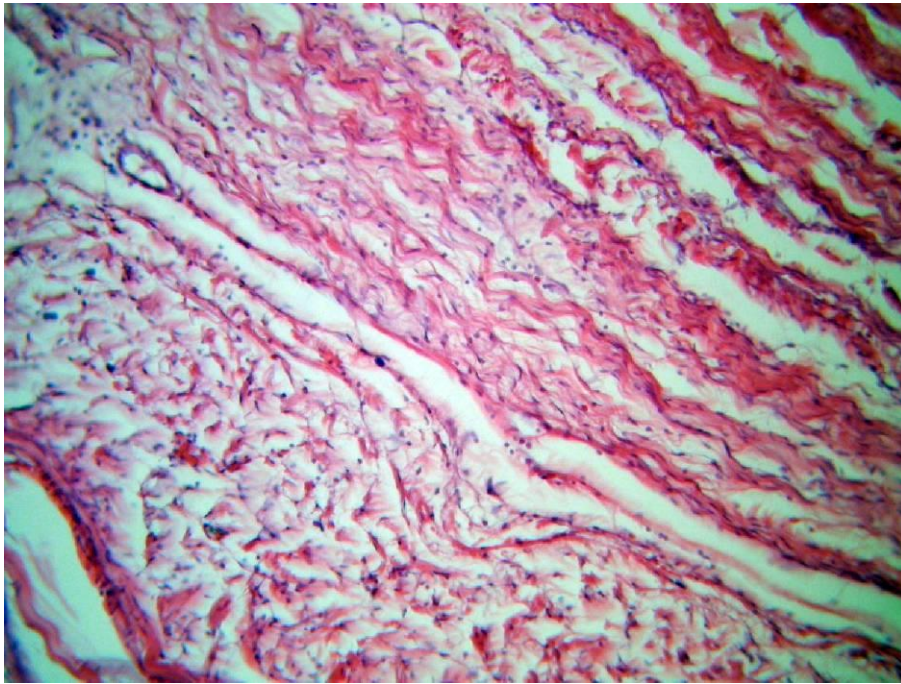


Рисунок 24 – Гистологический срез образца «Контроль». 60 сутки после имплантации.
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х200

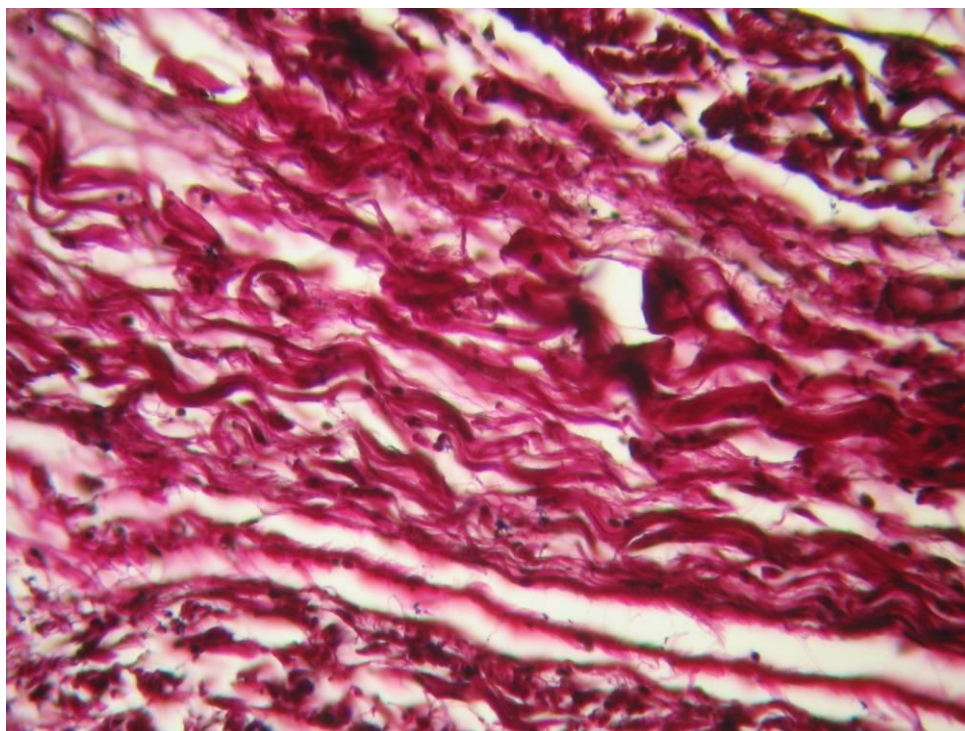


Рисунок 25 – Гистологический срез образца «Контроль». 60 сутки после имплантации.
Окраска Вейгер-Ван-Гизон. Ув. х400

8.2. Гистологическое исследование образцов «Ксеноперикардального биоматериала-1»

При проведении гистологического исследования ксеноперикарда, обработанного по Протоколу № 2 перед имплантацией было выявлено:

- при окраске гематоксилином и эозином клеточные элементы не встречались (Рис. 26);
- при окраске по Вейгерт-Ван-Гизону выявлено, что состояние эластических и коллагеновых волокон оставалось без изменений, но имели более плотное расположение (Рис. 27).

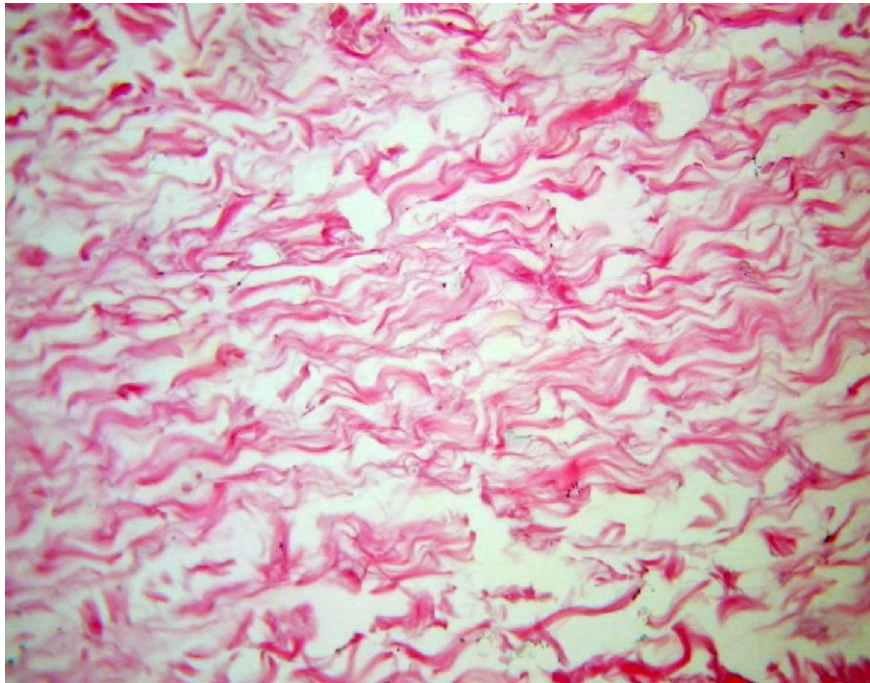


Рисунок 26 – Гистологический срез образца «КБ-1». Материал после обработки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

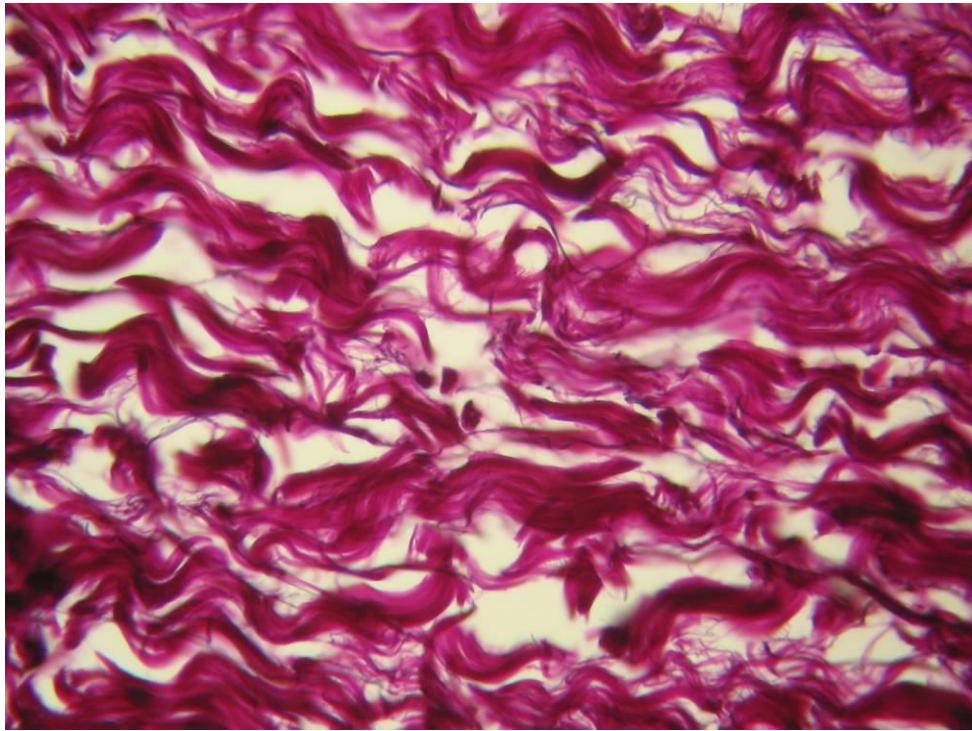


Рисунок 27 – Гистологический срез образца «КБ-1». Материал после обработки. Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. x400

При гистологическом исследовании биоматериала этой группы на 14 сутки в образцах при окраске гематоксилином и эозином отмечена умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация в 1 образце отмечаются процессы разрастания соединительной ткани по периферии ксеноперикардальной пластинки т.е. инкапсуляции, в остальных образцах лейкоциты проникают на 1/3 в толщу пластины (Рис. 28).

При анализе гистологических препаратов окрашенных по Вейгерт-Ван-Гизону выявлено частичное разрушение коллагеновых и эластических волокон на всю толщу лимфоцитарной инфильтрации, а в толще ксеноперикардальной пластины наблюдается не измененные коллагеновые и эластические волокна. Что свидетельствует о слабо активных процессах биоинтеграции исследуемого объекта (Рис. 29).

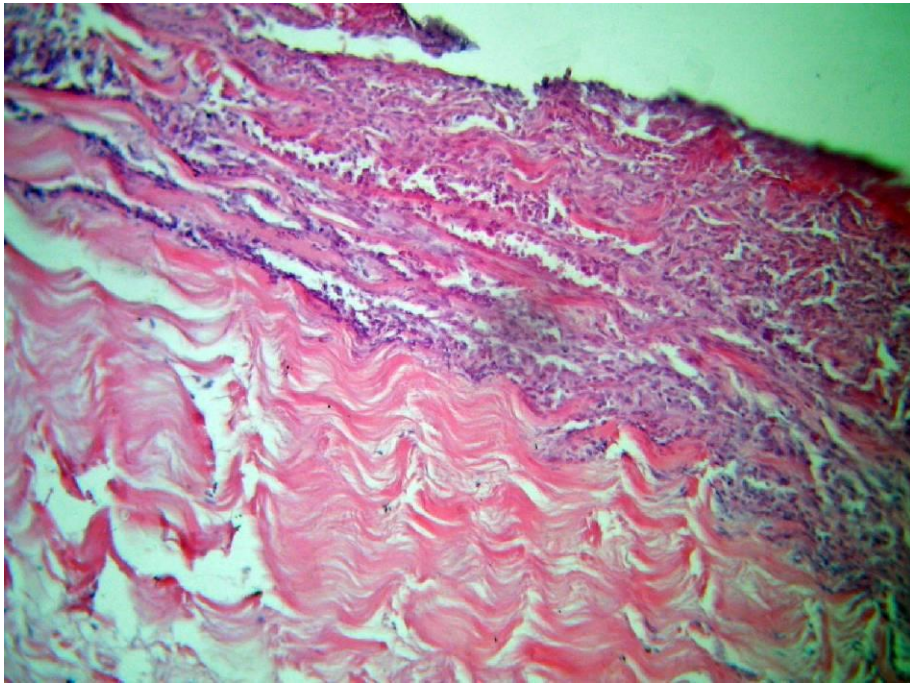


Рисунок 28 – Гистологический срез образца «КБ-І». 14 сутки после имплантации.
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х200

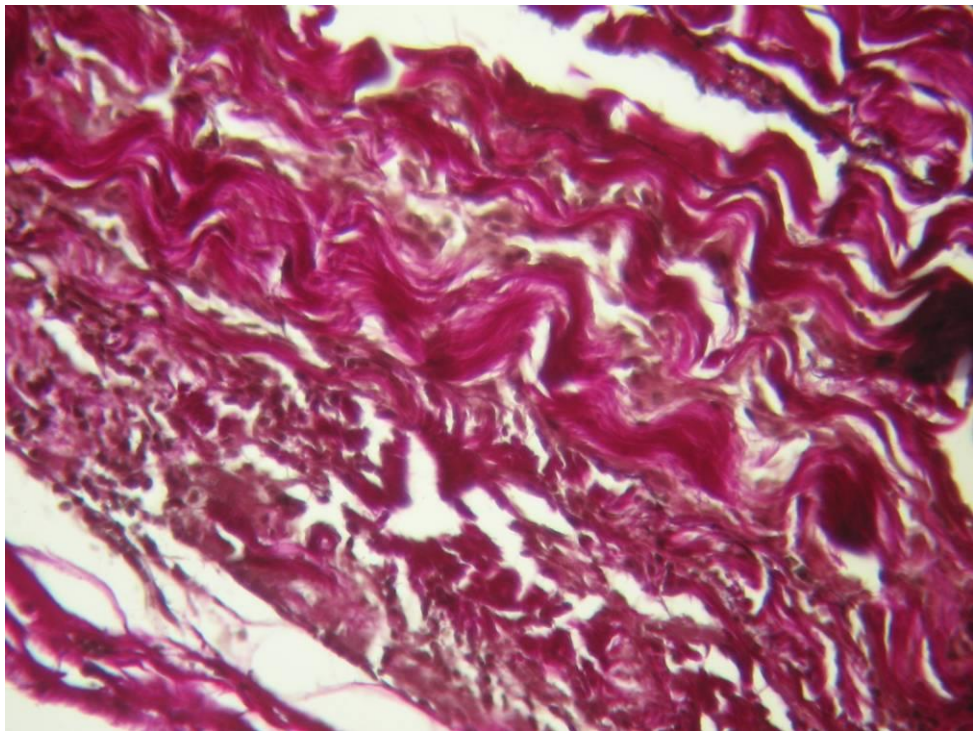


Рисунок 29 – Гистологический срез образца «КБ-І». 14 сутки после имплантации.
Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. х400

К концу первого месяца эксперимента в тканевом ложе трансплантата отмечаются выраженные пролиферативные процессы. Биоматериал трансплантата имеет

однородную структуру, по наружной поверхности инфильтрирован лимфоцитами и гистиоцитами. Трансплантат окружен выраженным инфильтрационным валом. В составе клеточного инфильтрата выявляются лимфоциты, гистиоциты, плазматические клетки, клетки фибробластического ряда. В зоне непосредственного контакта с биоматериалом преобладают лимфоциты и гистиоциты, на периферии грануляционного вала пролиферирующие фибробласты и очаги новообразованного коллагена. В реактивной зоне вокруг ксеноперикарда определяются новообразованные кровеносные сосуды (Рис. 30).

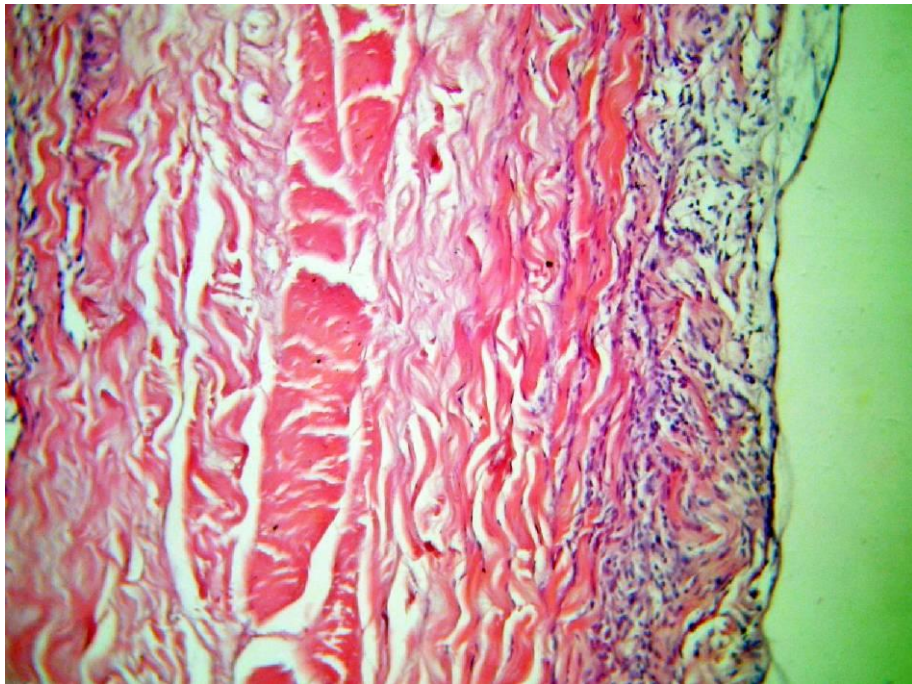


Рисунок 30 – Гистологический срез образца «КБ-І». 30 сутки после имплантации.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

При окраске по Вейгер-Ван-Гизону выявлены формирующиеся собственные коллагеновые и эластические волокна (Рис.31).

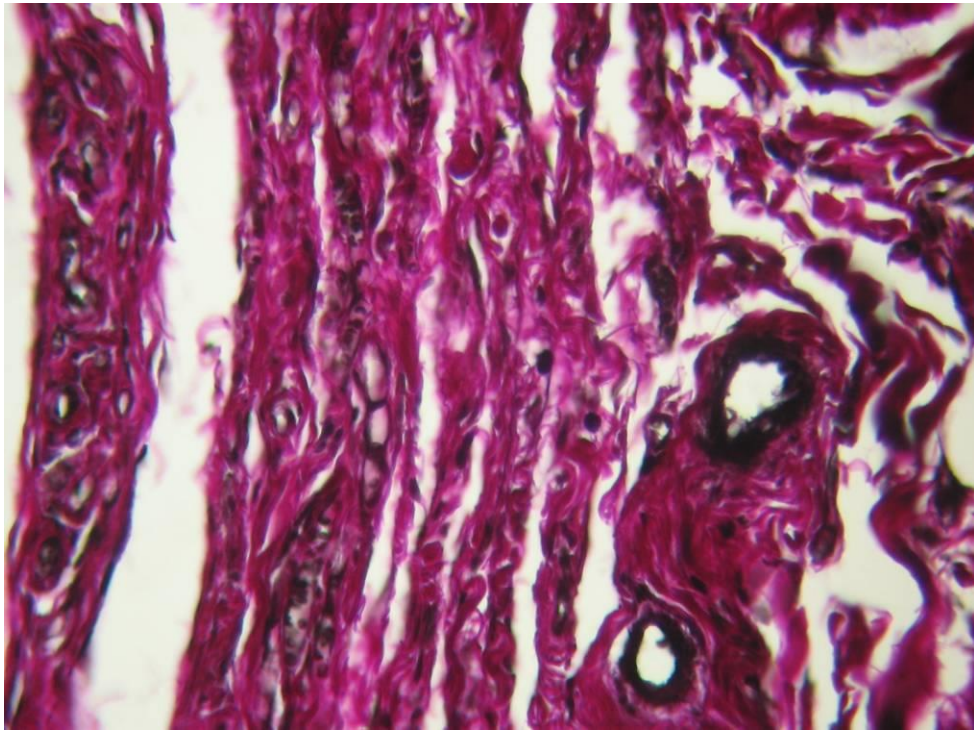


Рисунок 31 – Гистологический срез образца «КБ-I». 30 сутки после имплантации.
Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. x400

Через два месяца начинают проявляться явления биорезорбции имплантата на наружной его поверхности, отмечено практически полное прорастание собственной соединительной ткани и новообразованных сосудов. Отмечается значительное уменьшение количества лимфоцитов и макрофагов в воспалительном инфильтрате. Пролиферирующие фибробласты активно синтезируют соединительнотканый каркас вокруг трансплантата (Рис. 32).

При окраске по Вейгерт-Ван-Гизону выявляется большее количество новообразованных собственных коллагеновых и эластических волокон. Данные изменения свидетельствуют об активном процессе биорезорбции имплантата и интеграции собственной соединительной ткани в биоматериал с последующим его замещением (Рис. 33).

Таким образом, отмечено, что процессы биоинтеграции и замещения собственными тканями «Ксеноперикардального биоматериала - I» протекают гораздо медленнее по сравнению с контрольной группой. Кроме того, экспериментальное исследование подтверждает возможность применения образцов «Ксеноперикардального биоматериала - I» для восстановления целостности и структуры мягкой соединительной ткани.

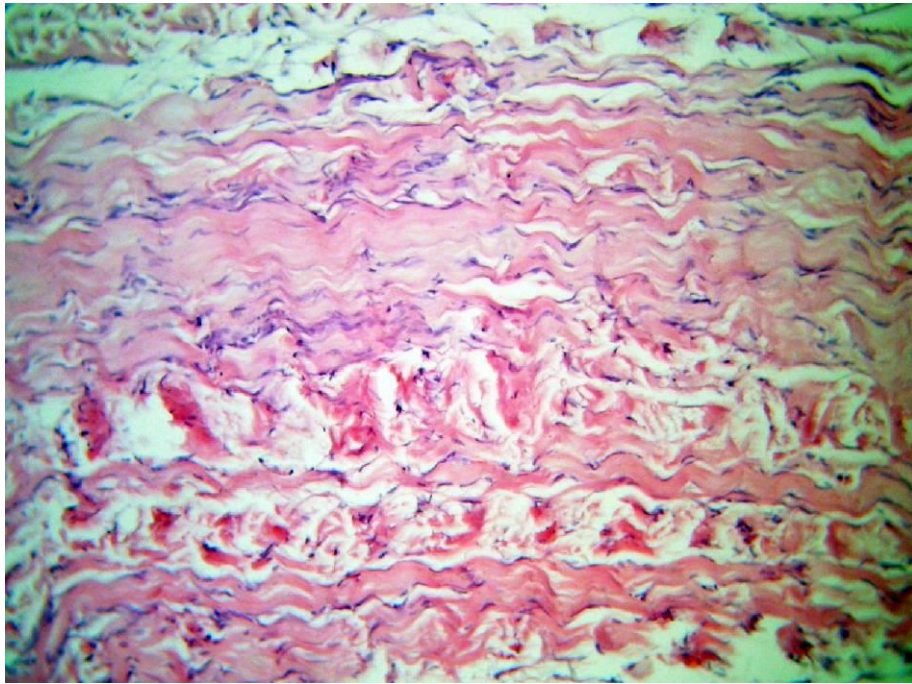


Рисунок 32 – Гистологический срез образца «КБ-І». 60 сутки после имплантации.
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х200

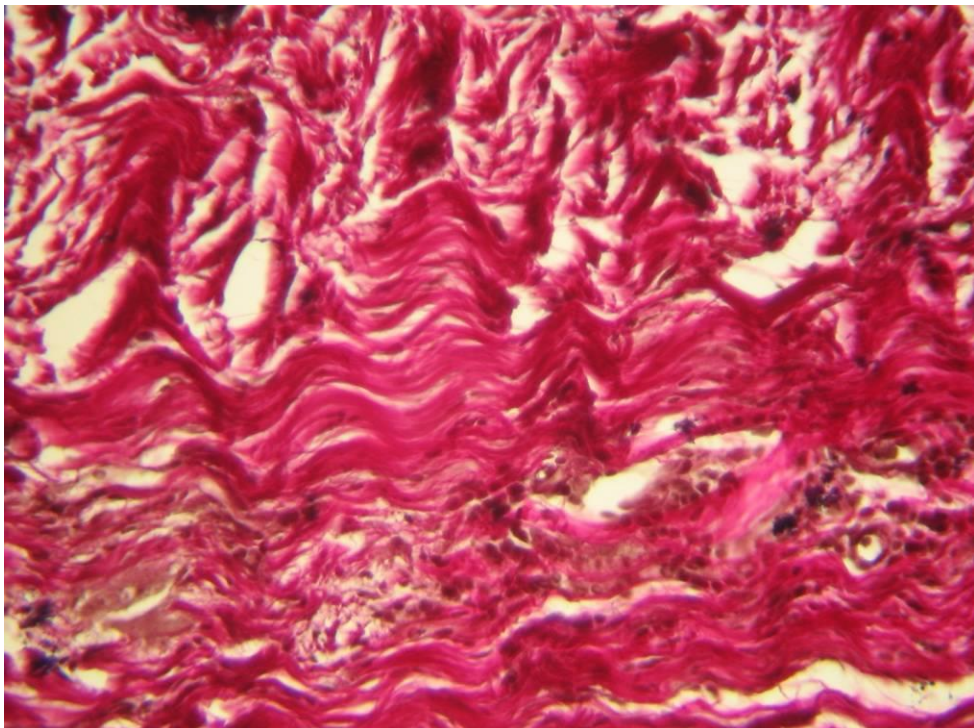


Рисунок 33 – Гистологический срез образца «КБ-І». 60 сутки после имплантации.
Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. х400

8.3. Гистологическое исследование образцов « Ксеноперикардального биоматериала -II»

При проведении гистологического исследования образцов ксеноперикарда, обработанного по Протоколу № 3 перед имплантацией было выявлено:

- при окраске гематоксилином и эозином клеточные элементы не встречались (Рис. 34);
- при окраске по Вейгерт-Ван-Гизону выявлено, что состояние эластических и коллагеновых волокон оставалось без изменений (Рис. 35).

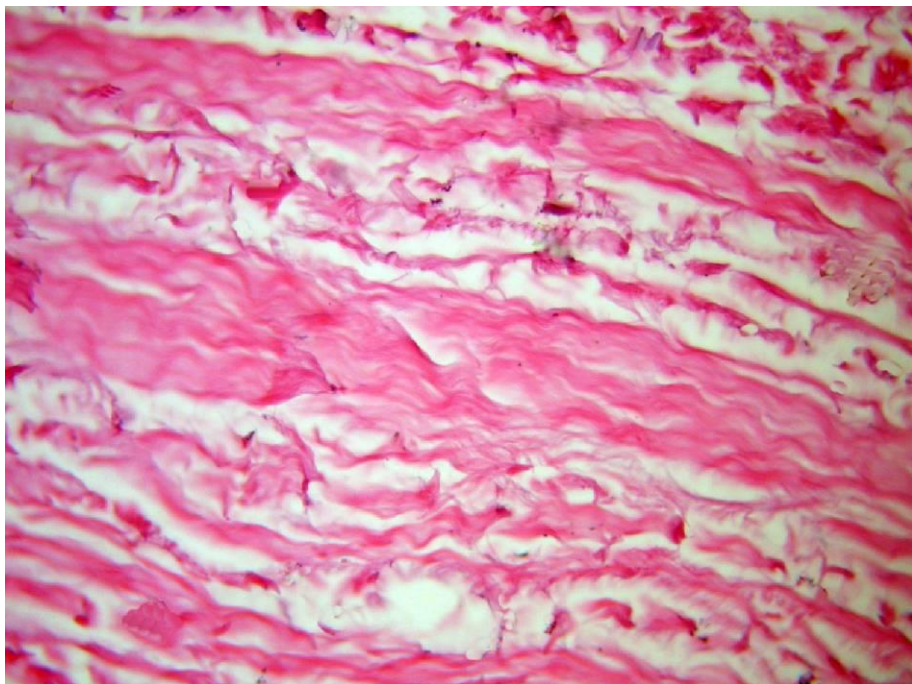


Рисунок 34 – Гистологический срез образца «КБ-II». Материал после обработки.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

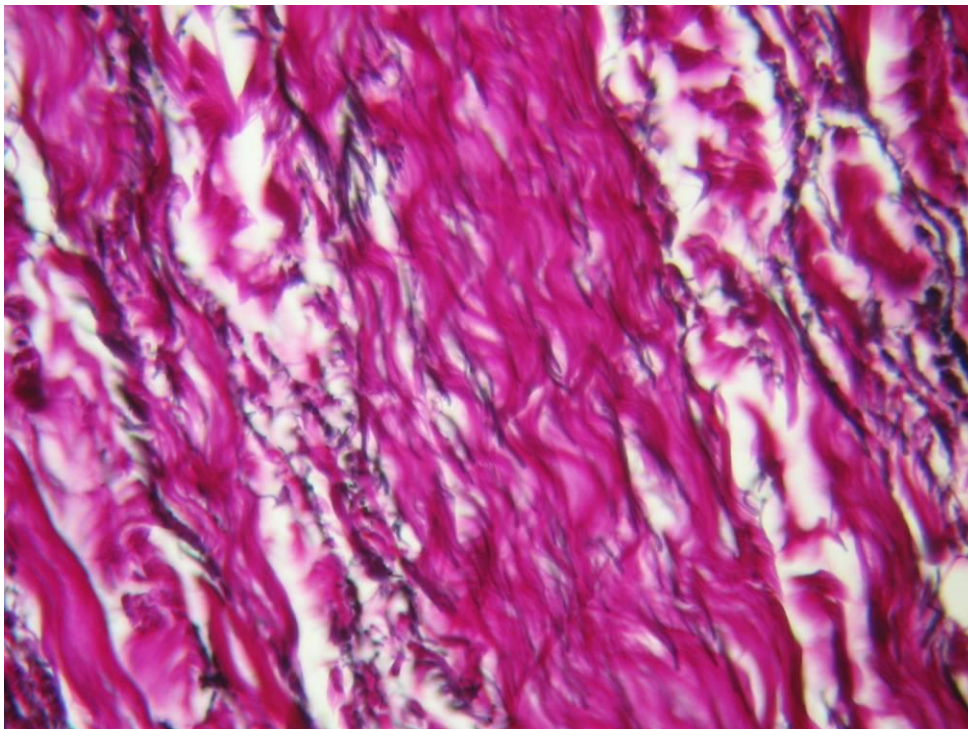


Рисунок 35 – Гистологический срез образца «КБ-II». Материал после обработки.
Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. x400

При гистологическом исследовании «КБ-II» на 14 сутки в исследуемых образцах при окраске гематоксилином и эозином отмечено в 2-х образцах слабо выраженная лимфоцитарная инфильтрация (на толщину $2/3$ от толщины ксеноперикардиальной пластины) с включением эпителиоидных и клеток фибропластического ряда, в 1-м образце умеренно выраженная лимфоцитарная инфильтрация. Вокруг образцов ксеноперикарда сохранялась умеренная клеточная инфильтрация, наблюдалось образование грануляционной ткани с умеренным количеством новообразованных сосудов (Рис. 36).

При анализе гистологических препаратов окрашенных по Вейгерт-Ван-Гизону выявлено разрушение коллагеновых и эластических волокон средней степени выраженности. Что свидетельствует об активных процессах биорезорбции исследуемого объекта уже на этом сроке (Рис. 37).

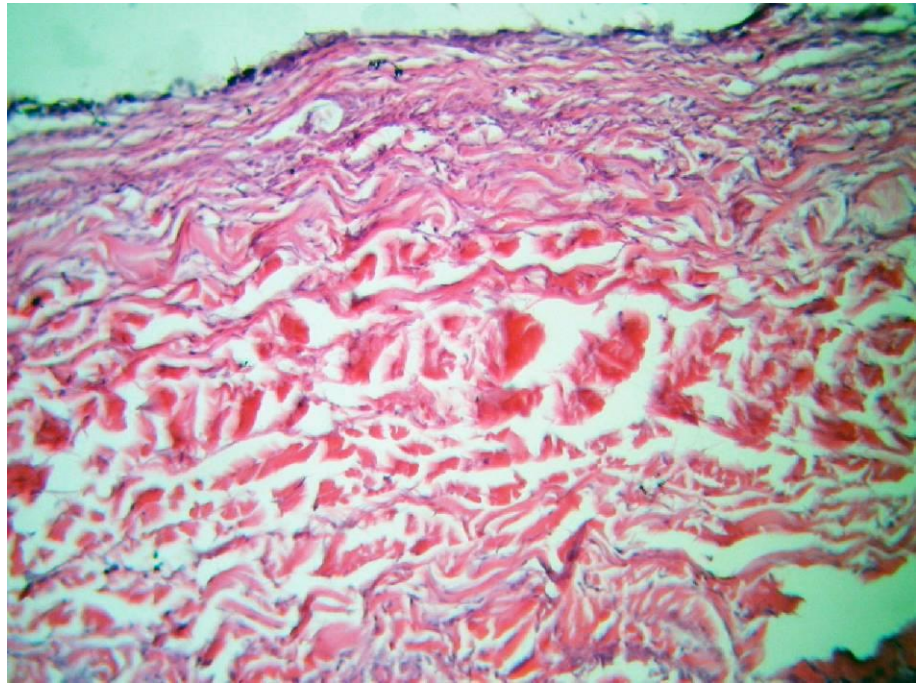


Рисунок 36 – Гистологический срез образца «КБ-II». 14 сутки после имплантации.
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

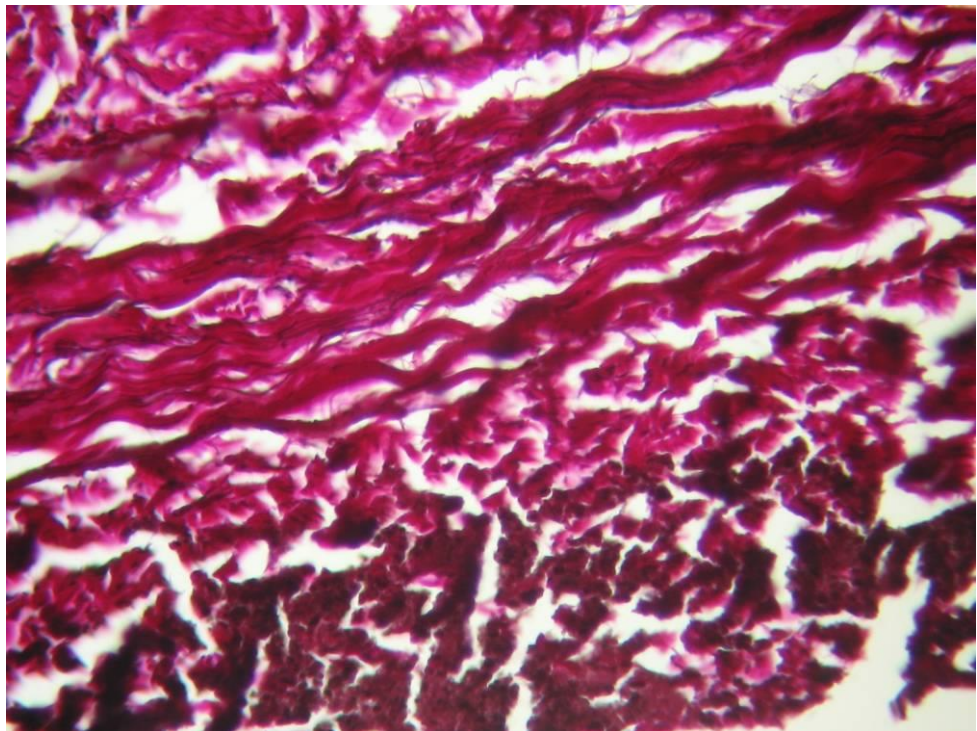


Рисунок 37 – Гистологический срез образца «КБ-II». 14 сутки после имплантации.
Окраска Вейгер-Ван-Гизон. Ув. x400

К концу первого месяца эксперимента в тканевом ложе трансплантата отмечаются выраженные пролиферативные процессы. Биоматериал трансплантата имеет

однородную структуру, по наружной поверхности инфильтрирован лимфоцитами и гистиоцитами. Трансплантат окружен слабо выраженным инфильтрационным валом. В составе клеточного инфильтрата выявляются лимфоциты, гистиоциты, плазматические клетки, клетки фибробластического ряда. В зоне непосредственного контакта с биоматериалом преобладают лимфоциты и гистиоциты, на периферии грануляционного вала пролиферирующие фибробласты и очаги новообразованного коллагена. В реактивной зоне вокруг ксеноперикарда определяются новообразованные кровеносные сосуды (Рис. 38).

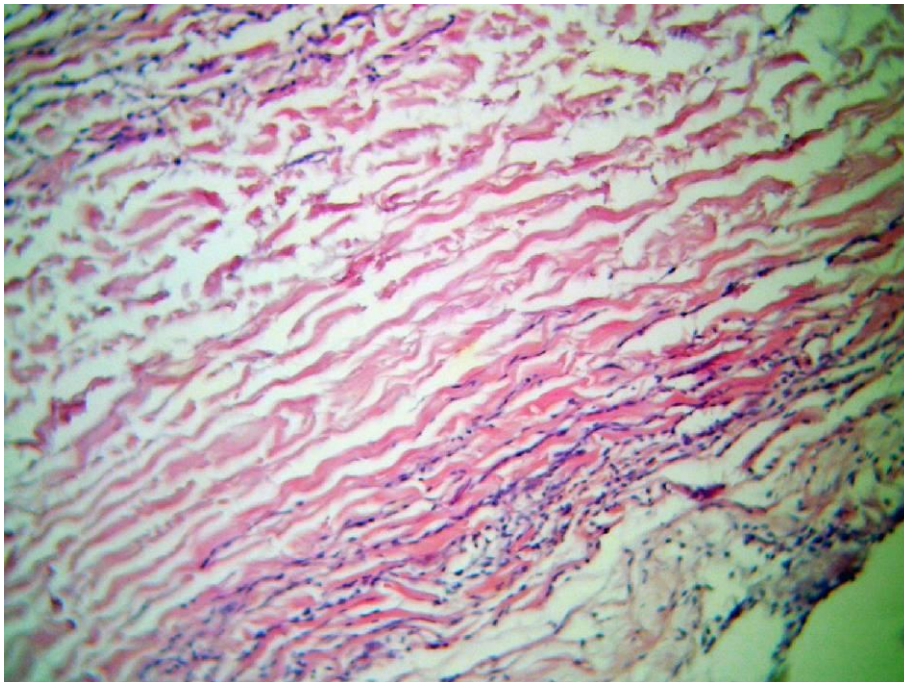


Рисунок 38 – Гистологический срез образца «КБ-II». 30 сутки после имплантации.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

При окраске по Вейгер-Ван-Гизону выявлены формирующиеся собственные коллагеновые и эластические волокна (Рис. 39).

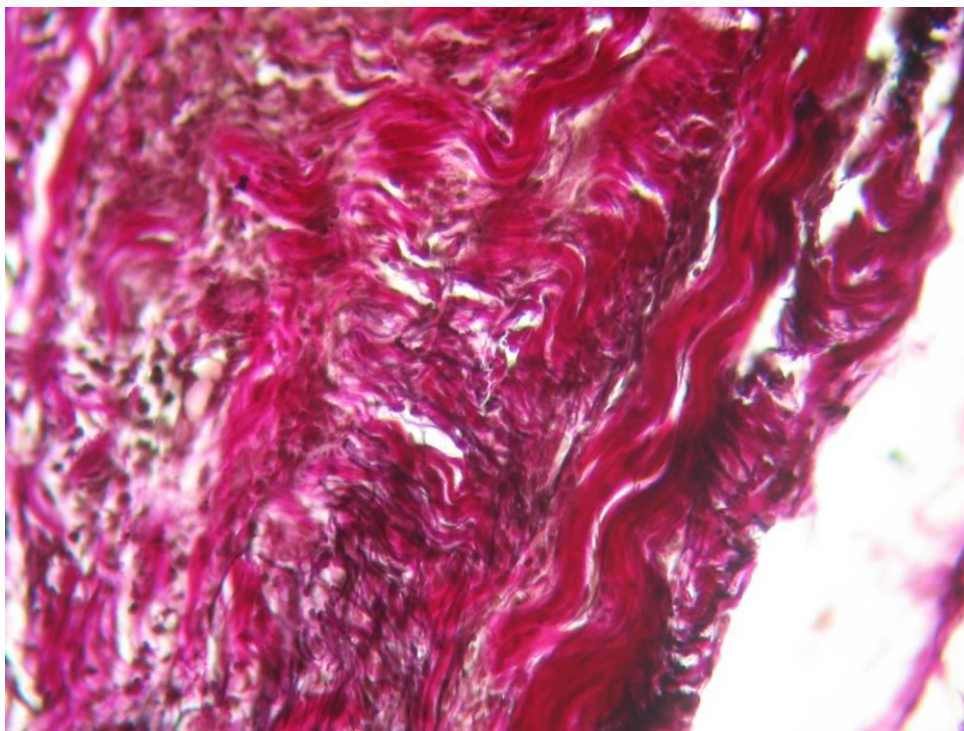


Рисунок 39 – Гистологический срез образца «КБ-II». 30 сутки после имплантации.
Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. x400.

Через два месяца начинают проявляться явления биорезорбции имплантата на наружной его поверхности, отмечено практически полное прорастание собственной соединительной ткани и новообразованных сосудов. Отмечается значительное уменьшение количества лимфоцитов и макрофагов в воспалительном инфильтрате. Пролиферирующие фибробласты активно синтезируют соединительнотканый каркас вокруг трансплантата (Рис.40).

При окраске по Вейгерт-Ван-Гизону выявляется большее количество новообразованных собственных коллагеновых и эластических волокон. Данные изменения свидетельствуют об активном процессе биорезорбции и интеграции собственной соединительной ткани в имплантат с последующим его замещением (Рис.41).

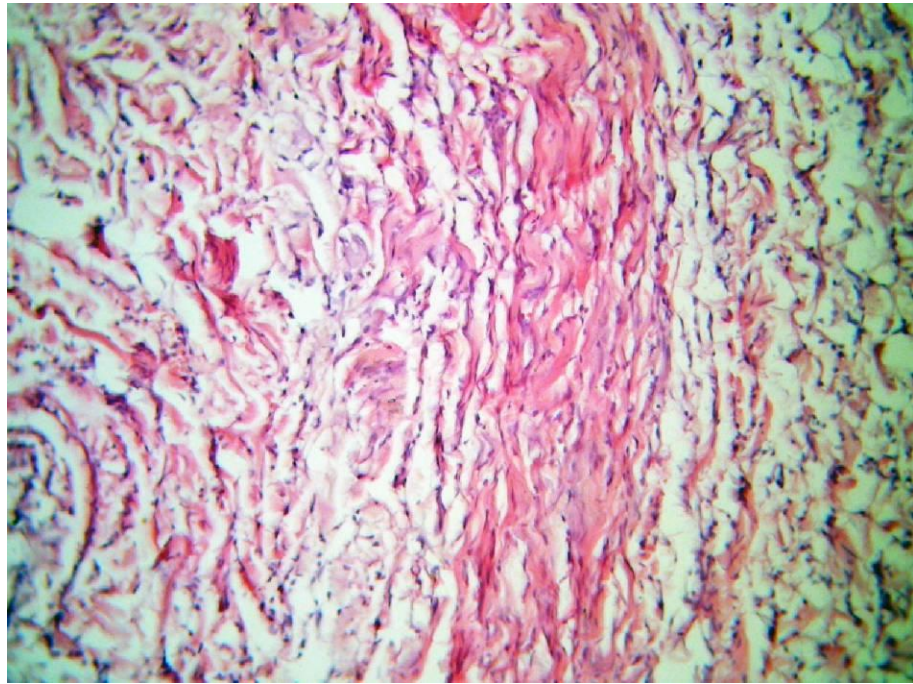


Рисунок 40 – Гистологический срез образца «КБ-П». 60 сутки после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х200.

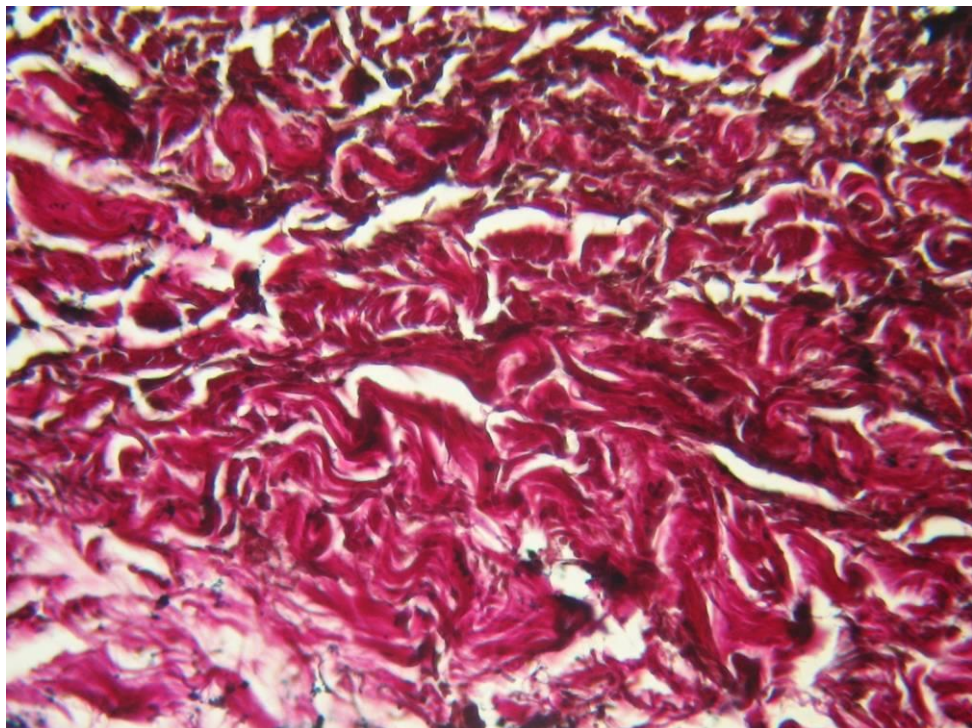


Рисунок 41 – Гистологический срез образца «КБ-П». 60 сутки после имплантации. Окраска Вейгерт-Ван-Гизон. Ув. х400.

Таким образом, отмечено, что процессы биоинтеграции и замещения собственными тканями «Ксеноперикардального биоматериала - II» протекают значительно активнее по сравнению с контрольной группой. Кроме того, отсутствие иммунных реакций и явления отторжения имплантата подтверждает возможность применения образцов «Ксеноперикардального биоматериала - II» для восстановления целостности и структуры мягкой соединительной ткани.

ГЛАВА 9. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РАЗРАБОТАННЫХ КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ В УСЛОВИЯХ IN VIVO

9.1. Оценка функциональных свойств «Ксеноперикардального биоматериала-І»

Оценку функциональных свойств биоматериала «КБ-І» проводили путем сравнительного анализа интеграции полипропиленовой сетки и ксеноперикарда в ткани экспериментального животного.

9.1.1. Морфологическое исследование тканей в зоне имплантации полипропиленовой сетки.

Изучение процесса роста соединительной ткани в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала проводили путем подсчета количества фибробластов и фиброцитов, а также коллагеновых и эластических волокон через 3, 6, и 12 месяцев после операции (Таб. 5).

Таблица 5 - Количество соединительно-тканых клеточных элементов в зоне имплантации полипропиленовой сетки в разные сроки после операции (клетки в поле зрения)

	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	P		
				3 мес. / 6 мес.	3 мес. / 12 мес.	6 мес. / 12 мес.
Фибробласты	99,29±10,34	180,11±8,47	60,27±4,76	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Фиброциты	69,74±4,86	99,49±8,25	59,96±4,50	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Соотношение фибробластов и фиброцитов	1,42	1,81	1	p<0,05	p<0,05	p<0,05

где p – достоверность различий между группами

Через три месяца имплантации количество фибробластов составило 99,29±10,34 клеток, через шесть месяцев - 180,11±8,47 клеток в поле зрения. Рост количества фибробластов в эти сроки составил 1,8 раза. К двенадцати месяцам после имплантации количество фибробластов в среднем составило 60,27±4,76 клеток в поле зрения. Аналогичная картина складывалась с количеством фиброцитов: к шести месяцам оно увеличивалось в 1,4 раза – от 69,74±4,86 до 99,49±8,25 клеток в поле зрения и

уменьшалось к двенадцати месяцам – в 1,7 раза – до $59,96 \pm 4,50$. Соотношение фибробластов и фиброцитов, а значит и степень активности образования волокон соединительной ткани через три месяца после операции составляла 1,42. После шести месяцев имплантации полипропиленовой сетки степень активности образования волокон соединительной ткани проявляла тенденцию к увеличению. К шести месяцам после операции соотношение фибробластов и фиброцитов составляло 1,81. К годовому сроку имплантации материала активность процессов новообразования падала, и число фибробластов и фиброцитов практически уравнивалось – соотношения их числа достигало единицы. Это говорит о том, что образование новой соединительной ткани к этому сроку либо прекращается, либо сводится к минимальной не критичной скорости.

При проведении гистологического исследования было обнаружено, что через три месяца после имплантации полипропиленовой сетки вокруг ее волокон располагались рыхлые пучки коллагеновых и эластических волокон. Через шесть месяцев после имплантации обнаружено их уплотнение, но интеграции и сплетения новообразованных волокон с полипропиленовой сеткой не обнаружено. Спустя 12 месяцев после имплантации лишь часть волокон сетки была переплетена с соединительнотканными волокнами (Рис. 42 и 43). Часть волокон полипропиленовой сетки была инкапсулирована.

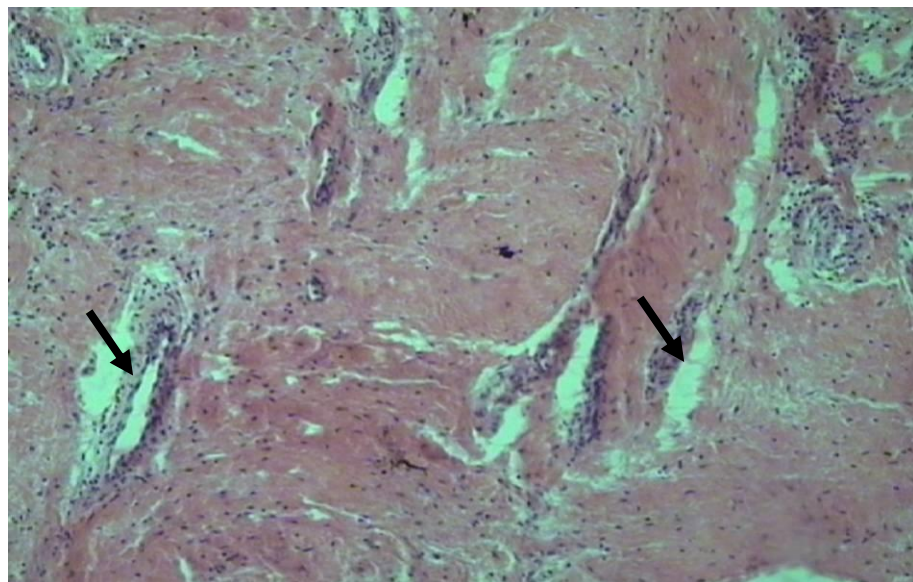


Рисунок 42 – Соединительная ткань в зоне имплантации полипропиленовой сетки; 12 мес. после операции (стрелками показаны участки рыхлого расположения волокон); окраска гематоксилином эозином, $\times 100$.

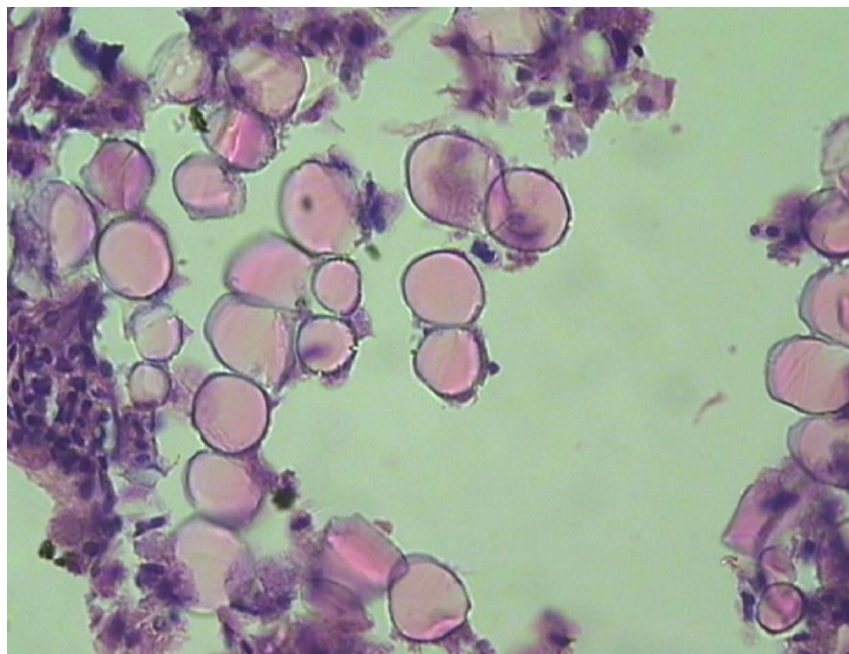


Рисунок 43 – Свободно лежащие волокна полипропиленовой сетки - 6 мес. после операции; окраска гематоксилином – эозином, $\times 400$

Исследование количества соединительно-тканых волокон в разные сроки после операции в зоне имплантации полипропиленовой сетки показало, что через 3 месяца после имплантации их количество составило $49,35 \pm 2,78\%$ (из них $35,17 \pm 3,21\%$ составляли коллагеновые волокна, и $14,18 \pm 2,12\%$ – эластические), через 6 месяцев наблюдалось увеличение коллагеновых и эластических волокон до $54,22 \pm 3,18\%$ ($38,73 \pm 1,47\%$ – коллагеновые и $15,49 \pm 3,38\%$ эластические волокна), и наконец, через год после имплантации относительная площадь, занимаемая волокнами соединительной ткани, достигла $63,03 \pm 2,15\%$ (коллагеновые волокна – $45,12 \pm 1,29\%$, эластические – $17,91 \pm 2,14\%$) (Таб. 6).

Таким образом, на протяжении всего года после имплантации (на сроках 3,6 и 12 месяцев) полипропиленовой сетки наблюдался рост соединительнотканых клеточных элементов фибробластического ряда в зоне имплантации материала. Однако соотношение количества фибробластов и фиброцитов на этих же сроках исследования указывают на то, что активно образование новой соединительной ткани протекает до шести месяцев, а к годовалому сроку приостанавливается. Относительная площадь коллагеновых и эластических волокон соединительной ткани также увеличивается в этой экспериментальной группе, но с волокнами полипропиленовой сетки они переплетаются неплотно, наблюдалась выраженная инкапсуляция волокон материала.

Таблица 6 - Относительная площадь компонентов соединительной ткани в разные сроки после операции в зоне имплантации полипропиленовой сетки.

	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	p		
				3 мес. / 6 мес.	3 мес. / 12 мес.	6 мес. / 12 мес.
Общая площадь, %	49,35±2,78	54,22±3,18	63,03±2,15	p<0,05	p<0,01	p<0,01
Площадь коллагеновых волокон, %	35,17±3,21	38,73±1,47	45,12±1,29	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Площадь эластических волокон, %	14,18±2,12	15,49±3,38	17,91±2,14	p<0,05	p<0,05	p<0,05

где p – достоверность различий между группами

9.1.2. Морфологическое исследование тканей в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала.

Анализ процессов новообразования соединительной ткани в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала проводили по тем же критериям, что и в случае с имплантацией полипропиленовой сетки. Количество фибробластов к трем месяцам после операции в среднем составляло 151,01±9,67 клеток в поле зрения. На сроке 6 месяцев после имплантации происходил рост числа фибробластов в 1,7 раза – до 257,06±14,6 клеток в поле зрения. Через 12 месяцев после имплантации количество фибробластов увеличивалось еще в 1,4 раза и достигало в среднем 350,48±19,33 клеточных элементов. Количество фиброцитов также возрастало со временем. Через 3 месяца после имплантации в среднем составило 79,43±5,32 клеток, через 6 месяцев увеличилось еще в 1,2 раза (до 98,70±10,25 клеток в поле зрения), через 12 месяцев после имплантации увеличилось еще в 2,6 раза (252,74±18,44 клеток в поле зрения).

Соотношение фибробластов и фиброцитов, а значит и степень активности образования волокон соединительной ткани через три месяца после операции составляла 1,9. После шести месяцев имплантации ксеноперикардального биоматериала степень активности образования волокон соединительной ткани проявляла тенденцию к увеличению. К шести месяцам после операции соотношение фибробластов и фиброцитов составляло 2,6. К годовому сроку имплантации материала

активность процессов новообразования падала, и соотношение фибробластов и фиброцитов достигало показателя 1,39 (Таб. 7).

Таблица 7 - Количество клеток соединительной ткани в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала в разные сроки после операции (клетки в поле зрения)

	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	p		
				3 мес. / 6 мес.	3 мес. / 12 мес.	6 мес. / 12 мес.
Фибробласты	151,01±9,67	257,06±14,60	350,48±19,33	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Фиброциты	79,43±5,32	98,70±10,25	252,74±18,44	p<0,05	p<0,01	p<0,01
Соотношение фибробластов и фиброцитов	1,9	2,6	1,39			

где p – достоверность различий между группами

Экспериментальная картина говорит о том, что наиболее активно процессы новообразования соединительной ткани протекали на сроке первых 6 месяцев после имплантации, а затем их активность снижалась, однако скорость образования новой ткани спустя год не остановился, как это произошло в экспериментальном случае с полипропиленовой сеткой. На сроке 3 месяца после имплантации коллагеновые и эластические волокна начинали интегрировать в ксеноперикардальный имплантат. Через 6 месяцев после имплантации ксеноперикард полностью пророс новообразованной соединительной тканью. Никаких «пустот» между имплантатом и новообразованными волокнами, как в случае с полипропиленовой сеткой обнаружено не было. Через год после операции наблюдали полную биоинтеграцию ксеноперикардального имплантата с собственной соединительной тканью животного. Граница «имплантат – соединительная ткань» «стиралась», определить границы ксеноперикардального биоматериала не представлялось возможным. Волокна ксеноперикарда резорбировались, взаимно переплетались и уступали место собственным коллагеновым и эластическим волокнам соединительной ткани животного (Рис. 45).

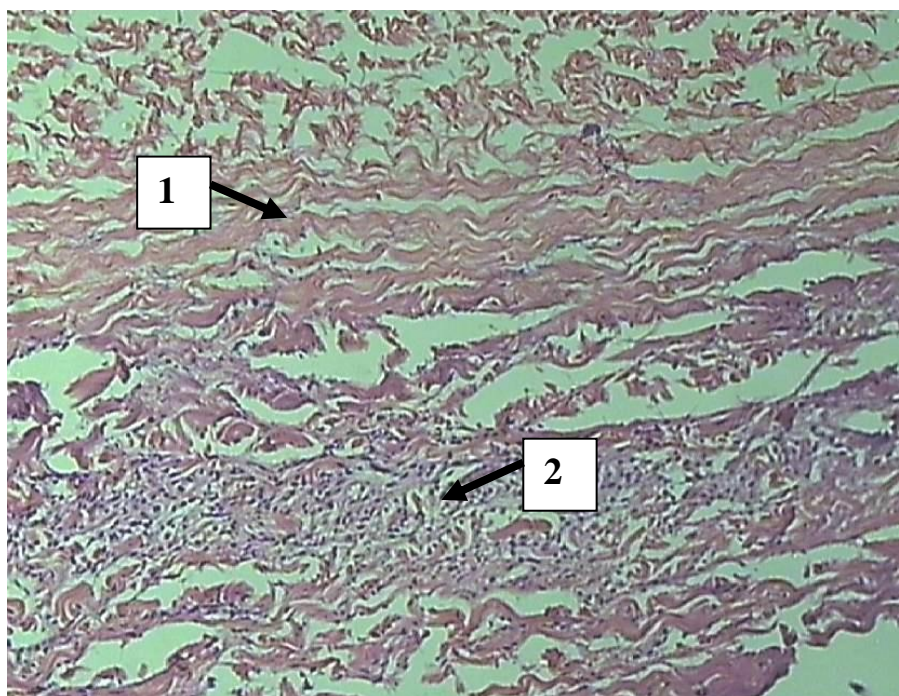


Рисунок 44 – Ксеноперикардальный биоматериал (1) и собственная соединительная ткань (2), 3 мес. после операции; окраска гематоксилином – эозин, $\times 100$

Через 3 месяца после имплантации ксеноперикардального биоматериала площадь образованных соединительнотканых волокон составила $55,89 \pm 2,81\%$ ($40,37 \pm 3,03\%$ — коллагеновые волокна и $15,52 \pm 2,29\%$ — эластические). Через 6 месяцев общая площадь коллагеновых и эластических волокон составила $62,78 \pm 1,35\%$ ($45,87 \pm 1,99\%$ — коллагеновые волокна, $16,91 \pm 2,03\%$ — эластические). Спустя год после имплантации общая площадь коллагеновых и эластических волокон составила $78,18 \pm 2,09\%$ ($53,27 \pm 1,22\%$ — коллагеновые волокна, $24,91 \pm 1,71\%$ — эластические) (Таб. 8, Рис. 44).

Таблица 8 - Относительная площадь компонентов соединительной ткани в разные сроки после операции в зоне имплантации ксеноперикардальной пластины

	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	P		
				3 мес. / 6 мес.	3 мес. / 12 мес.	6 мес. / 12 мес.
Общая площадь	$55,89 \pm 2,81$	$62,78 \pm 1,35$	$78,18 \pm 2,09$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,05$
Площадь коллагеновых волокон, %	$40,37 \pm 3,03$	$45,87 \pm 1,99$	$53,27 \pm 1,22$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Площадь эластических волокон, %	$15,52 \pm 2,29$	$16,91 \pm 2,03$	$24,91 \pm 1,71$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

где p – достоверность различий между группами

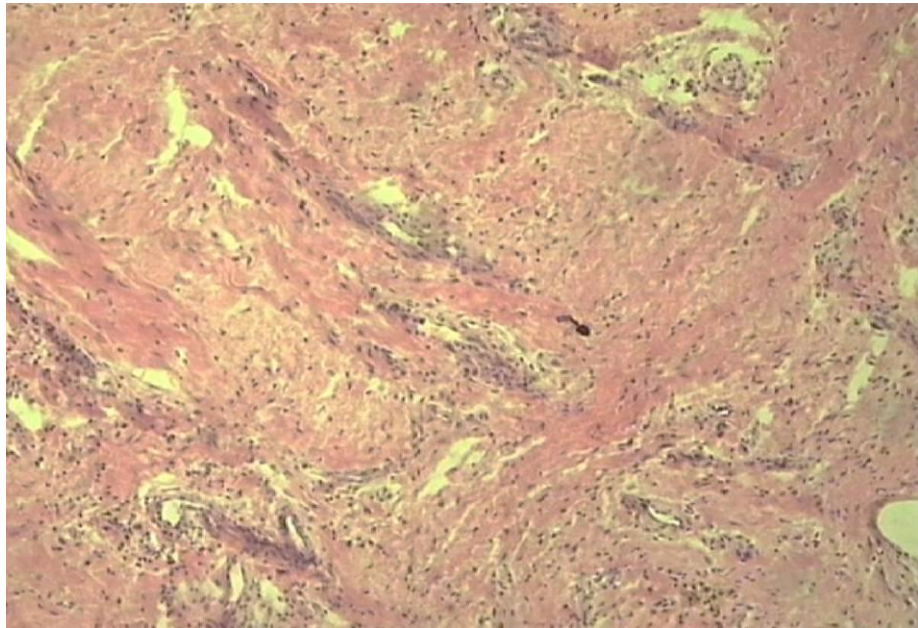


Рисунок 45 – Ксеноперикардальный биоматериал и собственная соединительная ткань, 12 мес. после операции; окраска гематоксилином – эозин, $\times 100$

Процесс биорезорбции ксеноперикардального имплантата протекал параллельно с процессом новообразования соединительной ткани. Относительная площадь волокон ксеноперикардального имплантата постепенно уменьшалась. Через 3 месяца после операции она составила $41,11 \pm 1,15\%$; через 6 месяцев – $33,85 \pm 1,39\%$. Через двенадцать месяцев после имплантации относительная площадь структурных соединительнотканых волокон составила в среднем $19,43 \pm 1,08\%$ (Таб. 9).

Таблица 9 - Относительная площадь волокон ксеноперикарда в разные сроки после операции

	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	p		
				3 мес. / 6 мес.	3 мес. / 12 мес.	6 мес. / 12 мес.
Площадь волокон ксеноперикарда, %	$41,11 \pm 1,15$	$33,85 \pm 1,39$	$19,43 \pm 1,08$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

где p – достоверность различий между группами

Прогрессивное увеличение количества соединительнотканых элементов (фибробластов и фиброцитов) и увеличение их соотношения на протяжении года после имплантации говорит о достаточно активных процессах образования новой соединительной ткани. Кроме того, наблюдалось увеличение относительной площади коллагеновых и эластических волокон соединительной ткани, которые в конце

исследования практически полностью замещали волокна ксеноперикардального биоматериала.

9.1.3. Сравнительный анализ результатов морфологического исследования тканей в зоне имплантации полипропиленовой сетки и ксеноперикардального биоматериала

Относительно сравнение состояния тканей в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала и полипропиленовой сетки проводили по полученным данным, по соответствующим параметрам (Таб. 10).

Таблица 10 – Количество клеток соединительной ткани в зоне имплантации полипропиленовой сетки и ксеноперикардального биоматериала в разные сроки после операции (клетки в поле зрения)

		Фибробласты	Фibroциты	Соотношение фибробластов и фиброцитов
3 месяца	ППС	99,29±10,34	69,74±4,86	1,42
	КБ-І	151,01±9,67	79,43±5,32	1,9
	p	p<0,05	p<0,05	-
6 месяцев	ППС	180,11±8,47	99,49±8,25	1,81
	КБ-І	257,06±14,60	98,70±10,25	2,6
	p	p<0,05	p>0,05	-
12 месяцев	ППС	60,27±4,76	59,96±4,50	1
	КБ-І	350,48±19,33	252,74±18,44	1,39
	p	p<0,05	p<0,05	-

где ППС – полипропиленовая сетка; КП – ксеноперикард; p – достоверность различий между группами

Все различия между количеством клеток в разные сроки после операции достоверны, кроме различий между числом фиброцитов вокруг полипропиленовой сетки и ксеноперикардального биоматериала через 6 месяцев после операции. Через 3 и 6 месяцев после имплантации количество фибробластов в зоне имплантации материала «КБ-І» превышало аналогичный показатель полипропиленовой сетки в 1,5 раза. К 12 месяцам в зоне имплантации сетки число фибробластов снижалось. В случае с ксеноперикардом количество фибробластов продолжало увеличиваться. При

сравнительном анализе количества фиброцитов спустя 3 и 12 месяцев после имплантации обеих экспериментальных групп были получены схожие результаты.

Таким образом, в отличие от полипропиленовой сетки, в зоне имплантации которой, количество клеток фибробластического ряда росло только до срока 6 месяцев, а затем падало, в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала количество соответствующих клеток продолжало постоянно увеличиваться в течение всего срока наблюдения. Соотношение количества фибробластов и фиброцитов, говорящий об активности процессов новообразования через шесть месяцев после имплантации в тканях, окружающих ксеноперикард, на 30,4% превосходил аналогичный показатель, полученный в тканях вокруг полипропиленовой сетки. Спустя год после имплантации вокруг полипропиленовой сетки он составлял единицу, в то время как в тканях вокруг ксеноперикарда он был равен 1,39. На всех сроках имплантации площадь соединительнотканых волокон в области имплантации ксеноперикардального биоматериала превосходила аналогичный показатель полипропиленовой сетки в 1,2 раза. В зонах обоих имплантатов шло постепенное увеличение относительной площади соединительной ткани. Однако в зоне имплантации ксеноперикарда это увеличение происходило более высокими темпами (Таб. 11).

Таблица 11 – Относительная площадь компонентов соединительной ткани в разные сроки после операции в зоне имплантации полипропиленовой сетки и ксеноперикардального биоматериала.

		Общая площадь, %	Площадь коллагеновых волокон, %	Площадь эластических волокон, %
3 месяца	ППС	49,35±2,78	35,17±3,21	14,18±2,12
	КБ-1	55,89±2,81	40,37±3,03	15,52±2,29
	P	p<0,05	p<0,05	p<0,05
6 месяцев	ППС	54,22±3,18	38,73±1,47	15,49±3,38
	КБ-1	62,78±1,35	45,87±1,99	16,91±2,03
	P	p<0,05	p<0,05	p<0,05
12 месяцев	ППС	63,03±2,15	45,12±1,29	17,91±2,14
	КБ-1	78,18±2,09	53,27±1,22	24,91±1,71
	p	p<0,05	p<0,05	p<0,05

где ППС – полипропиленовая сетка; КБ – ксеноперикард; p – достоверность различий между группами

Дополнительно в ходе экспериментального исследования была изучена степень биоинтеграции собственных волокон соединительной ткани в ксеноперикардальных

биоматериал, проходящей у различных поверхностей ксеноперикарда (у серозной и фиброзной стороны) (Таб. 12)

Таблица 12 - Относительная площадь компонентов соединительной ткани в зоне имплантации ксеноперикардальной пластины с серозной и фиброзной стороны биоматериала в разные сроки после операции

		Общая площадь, %	Площадь коллагеновых волокон, %	Площадь эластических волокон, %
3 месяца	серозная сторона	35,64±2,45	24,46±2,61	11,18±1,16
	фиброзная сторона	55,89±2,81	40,37±3,03	15,52±2,29
	p	p<0,05	p<0,05	p<0,05
6 месяцев	серозная сторона	33,56±2,18	23,15±1,87	10,41±1,76
	фиброзная сторона	62,78±1,35	45,87±1,99	16,91±2,03
	p	p<0,05	p<0,05	p<0,05
12 месяцев	серозная сторона	33,14±2,33	22,43±1,99	10,71±1,77
	фиброзная сторона	78,18±2,09	53,27±1,22	24,91±1,71
	p	p<0,05	p<0,05	p<0,05

где ППС – полипропиленовая сетка; КП – ксеноперикард; p – достоверность различий между группами

В течение всего срока имплантации площадь соединительнотканых волокон с фиброзной стороны ксеноперикарда значительно превышала площадь волокон с серозной стороны через 3 месяца – на 36,23%, через 6 месяцев – на 46,54%, через 12 месяцев – на 57,61% ($p<0,05$). Такой результат показывает наличие у серозной поверхности ксеноперикарда инертных к прорастанию свойств, способствующих сохранению функциональной подвижности мышц живота. Рост соединительной ткани вокруг ксеноперикарда происходил активнее со стороны фиброзной поверхности, о чем говорило большее количество клеток и волокон соединительной ткани, а также более высокое соотношение фибробластов и фиброцитов.

Таким образом, в ходе эксперимента по оценке функциональных свойств «Ксеноперикардального биоматериала I» провели сравнительное исследование этого материала с полипропиленовой сеткой. Изучение процесса роста соединительной ткани в зоне имплантации проводили путем подсчета количества соединительно-тканых клеточных элементов (фибробластов и фиброцитов), а также площадь коллагеновых и эластиновых волокон через 3, 6, и 12 месяцев после имплантации.

Количество фибробластов в зоне имплантации полипропиленовой сетки через 3 месяца после имплантации составило $99,29\pm 10,34$, через 6 месяцев - увеличение до

180,11±8,47, через 12 месяцев - резкое уменьшение до 60,27±4,76. Количество фибробластов в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала через 3 и 6 месяцев после имплантации превысило количество фибробластов и фиброцитов в зоне имплантации сетки на 34,25% и 29,93% соответственно ($p<0,05$). Через 12 месяцев после операции вокруг ксеноперикардального имплантата количество фибробластов продолжало увеличиваться, превысив аналогичный показатель в зоне сетки на 82,8% ($p<0,05$). Через три месяца количество фиброцитов в зоне имплантации полипропиленовой сетки составил 69,74±4,86 единиц, через 6 месяцев он возростал до 99,49±8,25 единиц, а через 12 месяцев после операции наблюдалось снижение количества клеток до 59,96±4,50 единиц. При анализе количества фиброцитов в зоне имплантации ксеноперикарда было выявлено, что спустя три месяца после имплантации число клеток превышает аналогичный показатель, полученный вокруг сетки, на 12,12%, а к году уже на 76,28% ($p<0,05$). Соотношение фибробластов и фиброцитов, говорящее об активности синтетических процессов через шесть месяцев после имплантации в тканях, окружающих ксеноперикард, на 30,4% превосходил аналогичный показатель, полученный в тканях вокруг полипропиленовой сетки. Кроме того, спустя три месяца после операции, отмечали прорастание соединительнотканых волокон в ксеноперикардальный имплантат, в то время как в зоне полипропиленовой сетки рыхлые коллагеновые и эластические волокна свободно лежали вокруг нитей сетки.

Через 6 месяцев в области имплантации полипропиленовой сетки коллагеновые и эластические волокна уплотнялись и утолщались, однако с нитями сетки они не переплетались. Ксеноперикардальный биоматериал в аналогичные сроки полностью прорастал собственной соединительной тканью животного. Полученные данные разнятся с результатами морфологического исследования в зоне имплантации ксеноперикарда, обработанного диэпоксисоединениями [26]. Автор этой работы утверждает, что к 6 месяцев после операции лишь часть волокон ксеноперикарда подвергалась резорбции, большое количество тучных клеток говорило о незавершенности процессов морфологической перестройки. Вероятно, это связано с различной обработкой ксеноперикарда, и как следствие, как с разным его поведением в организме.

Спустя 12 месяцев после имплантации лишь часть нитей полипропиленовой сетки была оплетена соединительноткаными волокнами, часть волокон полипропиленовой

сетки была инкапсулирована. Ткань ксеноперикарда резорбировалась, волокна истончались и замещались собственными коллагеновыми и эластическими волокнами животного. Через 12 месяцев после имплантации граница между имплантатом и соединительной тканью стиралась. Биоматериал полностью пророс собственной тканью животного. Площадь коллагеновых и эластических волокон в области имплантации ксеноперикарда превышала аналогичный показатель в области полипропиленовой сетки - через 3 и 6 месяцев - на 11,7% и 13,63% соответственно ($p < 0,05$). Через год после имплантации увеличение площади соединительной ткани вокруг ксеноперикарда превосходило площадь вокруг сетки на 19,38% ($p < 0,05$).

В течение всего срока имплантации площадь соединительнотканых волокон с фиброзной стороны ксеноперикарда значительно превышала площадь волокон с серозной стороны через 3 месяца – на 36,23%, через 6 месяцев – на 46,54%, через 12 месяцев – на 57,61% ($p < 0,05$). Такой результат показывает наличие у серозной поверхности ксеноперикарда инертных к прорастанию свойств.

Активность процесса новообразования соединительной ткани в месте имплантации ксеноперикардального биоматериала через год после операции превосходит на 25% аналогичный показатель, полученный в тканях вокруг полипропиленовой сетки.

9.2. Оценка функциональных свойств «Ксеноперикардального биоматериала-II»

Исследование проведено на четырех половозрелых кроликах-самцах породы шиншилла массой до 3,5 кг. Эксперимент включал размещение ксеноперикардальной пластины в теле мочевого пузыря гладкой поверхностью в просвет пузыря, ворсинчатой – к брюшине. Пластина фиксировалась рассасывающимся шовным материалом со средним сроком рассасывания нитью Safi 1 3/0 колющей иглой HS1/2 17 мм. Выведение животных из опыта производили через 6 месяцев и 12 месяцев. Затем гистологическому исследованию подвергались микропрепараты, изготовленные из фрагментов стенки мочевого пузыря, содержащих имплантат. Окраску соединительной ткани производили гематоксилином и эозином. Изучали основные морфологические параметры тканевой реакции. За время наблюдения отторжения материала и развития инфекционных или иных осложнений не отмечено. Через 6 месяцев после имплантации отмечена умеренная нейтрофильная инфильтрация в зоне оперативного вмешательства (Рис. 46).

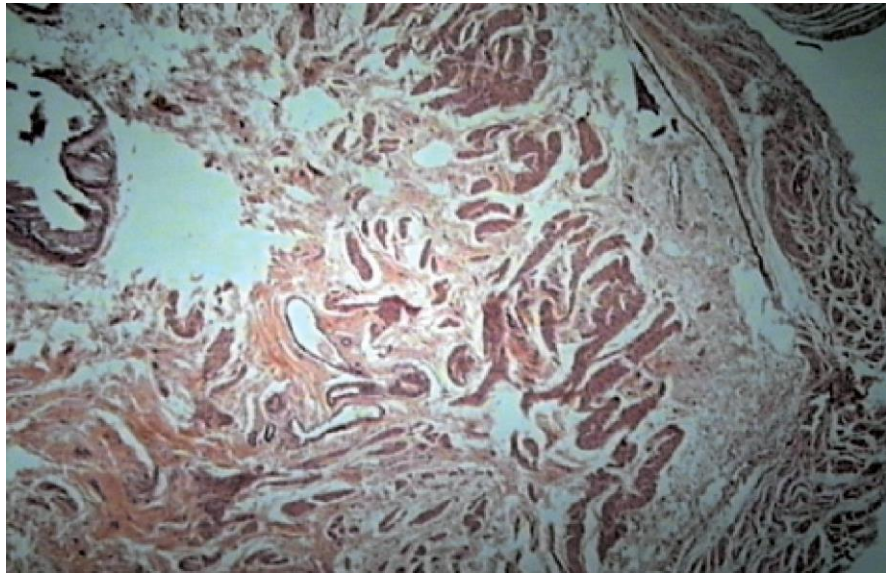


Рисунок 46 – Фрагменты ксеноперикардального биоматериала в стенке мочевого пузыря через 6 месяцев. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. x40.

Через год в препаратах нейтрофильная и макрофагальная инфильтрация отсутствуют. Вокруг ксеноперикарда определяется грануляционная ткань с новообразованными сосудами. В зоне имплантации ксеноперикардальной пластины полностью отсутствуют признаки воспаления. Видны участки новообразованной соединительной ткани, практически полностью проросшая ткань ксеноперикарда. Слизистая оболочка полностью восстановлена (Рис. 47).

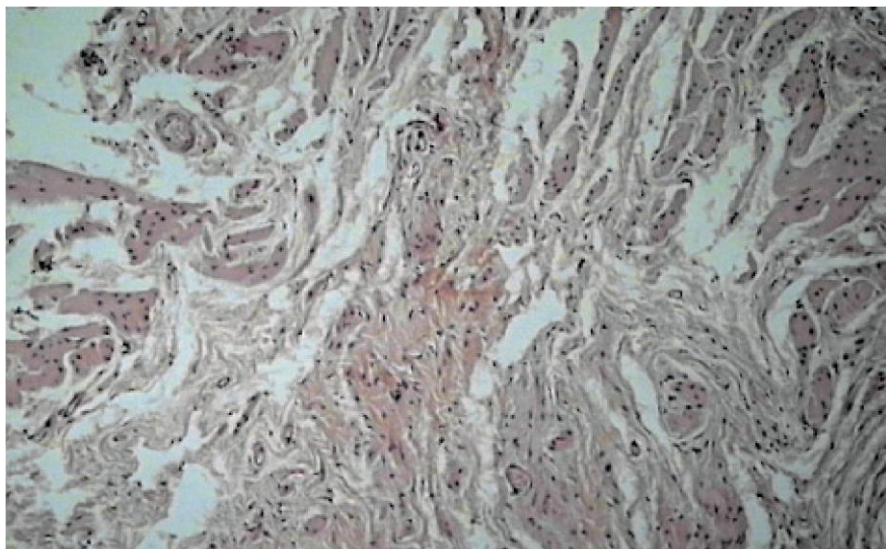


Рисунок 47 – Отсутствие нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации в зоне имплантации ксеноперикардального биоматериала через 1 год. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. x 100.

Инертные свойства ксеноперикардального биоматериала позволяют адаптироваться к ткани мочевых путей, пройдя этап асептического воспаления, и в течение полугода полностью замещается собственной соединительной тканью. Как видно из эксперимента под воздействием мочи полностью перестраивается коллагеновая структура ксеноперикардального биоматериала и появляется эпителизация со стороны слизистой оболочки. Полученные результаты говорят о перспективах применения ксеноперикардального биоматериала в этой области. Исследования продолжаются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность и научная значимость выполнения научно-исследовательской работы обусловлена возрастающим спросом на биосовместимые материалы медицинского назначения, применяемые в реконструктивной хирургии. В настоящее время среди специалистов хирургического профиля, занимающихся проблемами реконструкции поврежденных тканей в рамках целого ряда направлений, отсутствует единое мнение по определению показаний к имплантации, выбору материала и способу имплантации.

Материал для реконструктивных операций в хирургии классифицируется по происхождению на несколько видов: аутогенный, аллогенный, ксеногенный, синтетический. Широкое распространение эндопротезов синтетического происхождения позволило существенным образом повлиять на результаты лечения больных, однако привело к развитию целого ряда осложнений, связанных имплантацией. Не смотря на то, что большое количество исследователей ставят акцент на производство и внедрение синтетических материалов [10, 12, 15, 17, 19, 22, 29, 32], в настоящее время практически все большее внимание уделяется биоматериалам. Сегодня применение синтетики уместно лишь в качестве механической поддержки (защита шва, армировка аутопластики и т.д.). С начала прошлого столетия на основе более точных анатомических и биомеханических данных предпринимались попытки оперативного восстановления целостности соединительных тканей. Наряду со швом связок, довольно быстро возникла идея заменять поврежденную структуру ксено- или аллотканью, а также искусственными материалами. Все попытки, за исключением единичных случаев, не удавались. Лишь в 70-е годы XX столетия интерес к возмещению дефектов ткани снова возрос, т.к. к этому времени показали хорошие результаты аутотрансплантанты, и одновременно на рынке искусственных материалов появились синтетические ткани, позволившие надеяться на лучшие долгосрочные исходы при их применении. Однако ожидания не оправдались. При использовании вариантов синтетики достоверно хороших длительных и даже среднесрочных результатов достигнуто не было. Напротив, часто наблюдались их разрывы, нестабильность из-за проблем крепления и реакции несовместимости, в связи с чем немалая часть протезов подлежала удалению. К настоящему моменту эра возмещения поврежденных тканей синтетическими тканями может рассматриваться как исчерпавшая себя [25].

Помимо аутоотканей для пластических целей использовали и различные алломатериалы. Основное их преимущество заключалось в отсутствии дополнительного разреза при заборе аутооттрансплантатов. Так для пластических целей применялись аллобрюшина, твердая мозговая оболочка, ткань мениска и другие. Известны так же эндопротезы сухожилия, изготовленные из лиофилизированного трупного человеческого сухожилия и способ пластики дефекта сухожилия с его помощью [14]. Однако применение тканей аллогенного происхождения сопряжено с определенными трудностями: ограниченные ресурсы при получении достаточного количества исходного материала, риск заражения вирусными инфекциями, недостаточность отечественного законодательства в области забора и коммерческой реализации подобной продукции.

Аутопластика также имеет ряд серьезных недостатков, связанных с дополнительным травмированием, увеличении времени проведения операции и времени послеоперационной реабилитации пациента.

Разработка и внедрение новых биосовместимых материалов позволила в значительной степени повлиять на результаты лечения больных. Успехи, достигнутые за последние 15-20 лет в области медицинской науки, стали отправной точкой в развитии технологий по изготовлению новых биоматериалов, изделий из них, а так же систем и устройств биомедицинского назначения. На сегодняшний день уровень науки и техники позволяет предложить несколько альтернативных путей восстановления или замены поврежденных органов и тканей: трансплантацию, имплантацию и тканевую инженерию. И если трансплантация, кроме немаловажной финансовой стороны упирается еще и в проблему поиска донора, то особых препятствий на пути развития имплантационных технологий и тканевой инженерии нет. Основная сложность данного направления – это биосовместимость материалов, которая может зависеть не только от имплантируемого материала, но и от индивидуальной реакции организма пациента в ответ на имплантацию.

Решение проблемы биосовместимости открывает широкие перспективы применения биоматериалов в медицинской практике, особенно в реконструктивно-восстановительной хирургии, которая объединяет все направления хирургической деятельности (хирургия, травматология и ортопедия, гинекология, урология, офтальмология и др.). За последние десятилетия налажено производство синтетических

тканезамещающих биосовместимых материалов, нашедших широкое применение в хирургической практике. Популярность этих материалов обусловлена, прежде всего, их доступностью, удовлетворительными пластическими свойствами, хорошей биоадаптацией и отсутствием тяжелых осложнений в ранние сроки после имплантации. С накоплением клинического опыта, изучения отдаленных результатов и анализа качества жизни пациентов, перенесших имплантацию, стало понятно, что достигнутые положительные результаты далеки от идеальных, если таковые вообще возможны. В этой связи научно-исследовательские работы, посвященные разработке и внедрению новых биосовместимых материалов не потеряли своей актуальности.

Биосовместимые материалы на основе тканей ксеногенного происхождения широко используются в сердечно-сосудистой хирургии на протяжении нескольких десятилетий. Однако в других направлениях хирургической деятельности данные материалы оказались невостребованными, не смотря на их положительные характеристики. Применение в клинической практике оказалось ограничено единичными научными школами, занимающимися разработкой новых технологий в хирургии, хотя области применения биосовместимых материалов на основе тканей ксеногенного происхождения охватывают практически все направления специальностей с хирургическим уклоном.

Наиболее перспективным направлением на сегодняшний день является использование в качестве биоматериала на основе естественного белка, составляющего основу сухожилия – коллагена. Одной из разновидностей подобного биоматериала является обработанный говяжий перикард. Ксеноперикард на протяжении уже нескольких десятилетий широко применяется в хирургии сердца и сосудов для закрытия дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородок, создания искусственных клапанов сердца, протезирования сосудов, протезирования и пластики клапанов сердца, околосердечных тканей, профилактики спаечных процессов в средостении, биопротезирования и пластики магистральных сосудов и уже доказал свою высокую эффективность применения в этой области медицины. [21, 37, 52, 55, 59, 61, 64]. В настоящее время в России существует три крупных производителя ксеноперикарда – это компания «НеоКор» (г. Кемерово), Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева (г. Москва) и компания «Кардиоплант» (г. Пенза), входящая в состав группы компаний ЗАО НПП «МедИнж» - крупного

российского производителя изделий медицинского назначения. Основное отличие этих продуктов – технология обработки и консервации биологической ткани. Московские и кемеровские производители ксеноперикарда ориентированы только на рынок кардиохирургии и не заинтересованы в диверсификации производства и освоении новых областей, например общей хирургии, урологии и гинекологии, нейрохирургии и других. Ксеноперикардальная пластина «Кардиоплант», которая успешно вытесняет аналоги (занимает до 65% рынка сердечно-сосудистой хирургии по данным на 2013 год) с рынка кардиохирургии, позволяют делать вывод о конкурентоспособности имеющейся и перспективности разрабатываемых технологий перед указанными производителями. Кроме того, начатые сотрудниками медицинского института Пензенского Государственного Университета и Центрального института травматологии и ортопедии им Н.Н. Приорова экспериментальные исследования по возможности применения ксеноперикарда в разных областях реконструктивно-восстановительной хирургии говорят о перспективности данного подхода. Поэтому комплексность настоящей работы имеет высокую практическую значимость. Предлагаемые способы обработки и стабилизации биологической ткани позволяют получать продукт с индивидуальными характеристиками и свойствами для широкого применения при реконструктивных операциях.

В основе технологии, применяемой в протоколе обработки ксеноперикарда, стоит процесс децеллюляризации ткани и стабилизации её глутаровым альдегидом. После воздействия на ткань протеолитическим ферментом террилитином и экспецицией биоткани в растворах с разным осмотическим давлением, материал лишается клеточных элементов и гликозаминогликанов, и, как следствие, иммуногенности. После этапа стабилизации ткани глутаровым альдегидом ксеноперикард превращается в биополимер на основе природного коллагена и эластина. Продуктом протеолиза такого матрикса являются природные аминокислоты, которые легко вовлекаются в метаболизм организма реципиента, тем самым обеспечивая замещение собственными тканями.

Ксеноперикард «Кардиоплант» уже давно применяется в сердечно-сосудистой хирургии, однако сфера его применения растет как в сердечно-сосудистой, так и в других областях реконструктивной и восстановительной хирургии. Расширение области применения материала предъявляет новые требования к нему. И если раньше для определенной группы хирургических вмешательств был нужен материал только с

определенными характеристиками, и этого было достаточно, то сегодня хирургам нужны более совершенные материалы с широким спектром свойств, разным поведением и разным биологическим действием.

В ходе исследования разработаны протоколы обработки ксеноперикардальной ткани и получены два ксеноперикардальных биоматериала с различными физико-механическими и биорезорбируемыми свойствами. Результаты их исследования показывают, что все биоматериалы соответствуют требованиям, предъявляемым в настоящее время к аналогичным продуктам, применяемым в клинической практике и заслуживают внимания для дальнейшего изучения и тестирования.

«Ксеноперикардальный биоматериал I» характеризуется высокими показателями прочности и упругости, обладает низкой скоростью резорбции и медленным замещением собственными тканями. «Ксеноперикардальный биоматериал II» характеризуется низкими показателями упруго-деформативных свойств, но с высокой скоростью биорезорбции и степенью биоинтеграции. Разработанные биоматериалы могут быть использованы в качестве материала замещающего ткани, подверженные механической нагрузке, например, в реконструктивных операциях для пластики дефектов сухожильно-связочных структур, герниопластике, гинекологии, а также в антирефлюксной хирургии («Ксеноперикардальный биоматериал-I») и для замещения тканей не подверженных механической нагрузке, например в реконструктивных операциях для протезирования твердой мозговой оболочки, укрытия культи почки, пластике мочевого пузыря, мочеточников, корпоропластика при болезни Пейрони («Ксеноперикардальный биоматериал-II»).

Развитие современной тканевой биотехнологии, получение биополимеров, по своим свойствам, приближенным к натуральной соединительной ткани, позволяет надеяться на скорое решение многих проблем, стоящих перед современной биомедициной. Мы надеемся, что созданная в результате настоящего исследования серия биоматериалов на основе ксеноперикардальной ткани, отвечающих требованиям к современным имплантатам, найдет широкое и достойное применение, а также станет еще одним шагом на пути к решению фундаментальных задач современной практической медицины.

В настоящем исследовании была предпринята попытка создания биоматериалов с заданными свойствами из ксеноперикардальной ткани для протезирования широкого

спектра пораженных тканей. Были разработаны протоколы обработки биоткани и в результате получены два вида биоматериала, характеризующиеся разными физико-механическими свойствами и скоростью биорезорбции. Исследования местного действия биоматериалов после имплантации в ткани животных доказали безопасность их применения, а начатые медико-биологические исследования разрабатываемых материалов в клинической практике уже показывают их эффективность.

КЛИНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗРАБОТАННЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ

Практические рекомендации подтверждают проведенные исследования по оценке возможности и эффективности применения разработанных ксеноперикардальных биоматериалов.

«Ксеноперикардальный биоматериал I»

Травматология и ортопедия, хирургия кисти. Профессор А.Н. Митрошин и соавт. [40] делает вывод о возможности рекомендовать его в качестве материала для замещения дефектов сухожильно-связочного аппарата. В основе клинического анализа авторов работы – хирургическое лечение 45 больных с застарелыми повреждениями сухожилий и связок, проходивших лечение в клинике ГБУЗ ПОКБ им. Н.Н. Бурденко (г. Пенза). Анализ особенностей течения послеоперационного периода у больных показал, что у пациентов, оперированных с использованием ксеноперикарда, длительность болевого синдрома, температурной реакции и отторжения имплантата в послеоперационном периоде не выявлено. Предложенный материал продемонстрировал свою состоятельность при замещении дефектов сухожилий и связок в лечении свежих и застарелых повреждений ахиллова сухожилия, сухожилия четырехглавой мышцы бедра, коллатеральных связок коленного сустава, передней крестообразной связки, сухожилия сгибателей и разгибателей пальцев кисти. Также у авторов имеется опыт лечения ста пациентов с повреждениями сухожилий сгибателей пальцев кисти в зоне фиброзно-синовиального канала [7]. Учитывая клинические данные пластика протезом «Кардиоплант» является альтернативным способом лечения повреждения сухожилий наряду с аутопластикой.

Кроме того, в настоящее время исследования по оценке эффективности применения «Ксеноперикардального биоматериала I» для замещения сухожилий сгибателей пальцев кисти на базе Травматологического отделения №2 (микрохирургии) ГАУЗ РКБ МЗ РТ (г. Казань) в рамках научной темы: «Усовершенствование существующих и разработка новых способов лечения заболеваний и повреждений кисти и пальцев» проводит научный руководитель этого направления д.м.н. профессор А.А. Богов и ответственный исполнитель доктор В. Г. Топыркин.

Герниопластика. Профессор В.И. Никольский и соавт. в работе [42] провел сравнительную оценку результатов протезирующей герниопластики синтетическим и биологическими материалами в эксперименте и клинике. Клиническая часть исследования проводилась на базе ГБУЗ ПОКБ им. Н.Н. Бурденко (г. Пенза) В исследовании были включены 43 больных с послеоперационными вентральными грыжами, оперированных с применением ксеноперикарда. Отдаленные результаты исследования (до четырех лет) показали, что применение способа герниопластики ксеноперикардом достоверно снижает частоту возникновения у пациентов чувства боли, ощущения инородного тела в месте операции (на 44%), тем самым улучшая их физическое и эмоциональное самочувствие. Также была изучена возможность использования ксеноперикарда для формирования лапаростомы. В хирургической клинике Медицинского института Пензенского государственного университета с целью формирования лапаростомы у 19 больных с перитонитом различного генеза впервые применены ксеноперикардальные пластины. При использовании ксеноперикарда не отмечено ни одного случая эвентрации внутренних органов, он крепко удерживал края брюшной стенки. В ходе работы отмечены высокие прочностные качества материала, стойкость материала в гнойной ране. Послеоперационной грыжи с характерными для нее признаками не выявлено [43].

Кроме того, в настоящее время работу по оценке эффективности применения «Ксеноперикардального биоматериала I» в герниопластике ведет начальник кафедры военно-полевой (военно-морской) хирургии Института усовершенствования врачей ФБУ "ГВКГ им. акад. Н. Н. Бурденко МО РФ" заслуженный врач РФ, хирург высшей категории, профессор В.Л. Асташов (г. Москва). Проведено 30 операций с использованием разработанного биоматериала по поводу замещения соединительно-тканых структур после грыжесечения различной локализации. Оценка отдаленных результатов будет проводиться.

Гинекология. На базе гинекологического отделения ОДКБ им. Н.Ф. Филатова (г. Пенза) выполнены операции с использованием ксеноперикардальной пластины при выпадении внутренних органов у 4 больных и стрессовом недержании мочи у 2 больных. Ранних послеоперационных осложнений не было, получен хороший

клинический эффект. Исследования продолжаются [41]. На базе ГБУЗ «Городской Александровской больницы» (г. Санкт-Петербург) доктором А.В. Никольским выполнена позадилонная уретропексия ксеноперикардом при стрессовом недержании мочи двум пациенткам. Через шесть месяцев опущений стенок влагалища не выявлено, при проведении компрессионных проб моча удерживается. Дальнейшее изучение возможностей применения в этой области представляется авторам перспективным и обоснованным.

Антирефлюксная хирургия. На базе ГКБ СМП им. Г.А. Захарьина «Пензенский институт усовершенствования врачей» МЗ РФ группой врачей [5] проведена работа по изучению ближайших и отдаленных результатов хирургического лечения больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и грыж пищеводного отверстия диафрагмы (32 пациента). В сроки наблюдения больных основной группы от 1 до 14 месяцев клинические, эндоскопические и рентгенологические результаты не хуже результатов группы сравнения (синтетический материал). Осложнения в виде прорезывания имплантата не наблюдалось. Авторы делают вывод о том, что первые положительные ближайшие отдаленные результаты говорят о перспективности новой методики с применением ксеноперикарда в качестве фиксирующего материала и возможности ее широкого внедрения в антирефлюксную хирургию.

«Ксеноперикардальный биоматериал II»

Нейрохирургия. На базе регионального сосудистого центра ГБУЗ ПОКБ им. Н.Н. Бурденко (г. Пенза) доктором М.В. Красновым проведены операции по поводу протезирования твердой мозговой оболочки у шестерых больных с использованием ксеноперикардального биоматериала. Получено заключение о применении ксеноперикардальных пластин. М.В. Красновым отмечено, что пластины хорошо моделировались в месте имплантации, обладали достаточной механической прочностью, антигенной резистентностью, гладкая поверхность мягкая и пластичная, соответствует характеристикам твердой мозговой оболочки, может принимать ее форму, не образуя складок, препятствуя образованию ликвореи. В результате применения изделия не наблюдалось побочных эффектов и осложнений в виде аллергических реакций, инфекционного процесса и повышения температуры пациента. В

послеоперационном периоде жалобы от пациентов не поступали. Дальнейшая работа и оценка эффективности применения ксеноперикардального биоматериала в этой области продолжается.

Андрология и урогинекология. На базе ГБУЗ «Городской Александровской больницы» (г. Санкт-Петербург) доктором А.В. Никольским были выполнены различные виды оперативных вмешательств [41] с использованием в качестве эндопротеза ксеноперикардальной пластины пятерым больным: корпоропластика полового члена при болезни Пейрони трем больным и пластика тазового дна при передней промежностной грыже мочевого пузыря – двум больным. Получены хорошие результаты в послеоперационном периоде. Дальнейшее изучение возможностей применения в этой области представляется авторам перспективным и обоснованным.

ВЫВОДЫ

1. На основе анализа имеющихся подходов к созданию биосовместимых материалов для восстановительно-реконструктивной хирургии и результатов собственных экспериментальных исследований разработана оригинальная методика химико-ферментативной обработки ксеноперикардальной ткани.

2. Доказано, что параметры ключевых стадий многостадийной химико-ферментативной обработки ксеноперикарда (концентрация фермента, температура ферментативной инкубации, инкубация в средах с разным осмотическим давлением, концентрация сшивающего агента) существенно влияют на структурные свойства биоткани.

3. Разработаны два протокола с оптимальными режимами химико-ферментативной обработки ксеноперикардальной ткани, позволяющие получить биоматериалы с заданными физико-механическими и биорезорбируемыми свойствами.

4. В зависимости от выбранного протокола обработки ксеноперикарда биоматериалы различаются по модулю упругости в ~ 2 раза, напряжением при растяжении при максимальной нагрузке $\sim 1,7$ раза и относительным удлинением при растяжении \sim в 1,3 раза.

5. Показана возможность получать ксеноперикардальные биоматериалы с разной скоростью резорбции. Потеря массы образцов биоматериалов после 8 недель инкубации в модельной среде реактива Фентона ($\text{pH} = 7,4$), моделирующего воспалительную реакцию организма на инородное тело, изменяется от $\sim 40\%$ до $\sim 80\%$. Показано, что после обработки ксеноперикарда глутаровым альдегидом более высокой концентрации скорость резорбции биоматериала снижается. Обнаружено существенное уменьшение скорости резорбции всех биоматериалов после двух недель инкубации в окисляющей среде, однако биоматериалы теряют массу в этот период с разной скоростью.

6. Сравнительное гистологическое изучение области имплантации ксеноперикардальных биоматериалов в подкожной жировой клетчатке крыс, а также анализ морфологических признаков-критериев, отражающих дистрофические, воспалительные и репаративные процессы в операционной ране, свидетельствуют об ослаблении воспалительного процесса (уменьшение лимфогистиоцитарной

инфильтрации, лимфоцитов, макрофагов) к 30 суткам после операции, а также заметном усилении и ускорении репаративного компонента (увеличение количества клеток фибробластического ряда) с 30-х суток суток для образцов разработанных биоматериалов.

7. Доказано, что независимо от режима обработки биоткани, разработанные ксеноперикардальные биоматериалы обладают высокими биосовместимыми свойствами: не вызывают реакции отторжения при имплантации, биорезорбция имплантата в условиях *in vivo* сопровождается замещением новообразованной тканью животного и процессами неоваскуляризации.

8. На экспериментальных моделях имплантации в условиях *in vivo* в брюшную стенку и стенку мочевого пузыря доказаны высокие адаптационные и интеграционные свойства разработанных ксеноперикардальных биоматериалов к мягким тканям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базылев В.В., Немченко Е.В., Карнахин В.А., Коциенко А.С. Применение ксеноперикардальной заплаты «Кардиоплант» при реконструкции корня аорты по методике Nicks-Nunez. *Инновационные имплантаты в хирургии: сб. тр. Ч. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; ISBN 978-5-7982-0325-3 2014 С. 84– 91.*
2. Барбараш Л.С., Иванов С.В., Журавлева И.Ю., Ануфриев А.И., Казачек Я.В., Кудрявцева Ю.А., Зинец М.Г. 12-летний опыт использования биопротезов для замещения инфраингвинальных артерий. // *Ангиология и сосудистая хирургия. 2006. Т. 12. № 3. С. 91-97.*
3. Баулин А.В., Митрошин А.Н., Зюлькин Г.А., Нестеров А.В., Квасов А.Е., Баулин В.А., Середин С.А. Восстановление белой линии живота при протезирующей герниопластике с применением синтетических и биологических протезов // *Материалы Всероссийского форума "Пироговская хирургическая неделя". Вестник СПбГУ. Сер. 11. — 2010 — С. 120.*
4. Баулин А.В., Середин С.А., Квасов А.Е., Митрошин А.Н., Баулин В.А., Венедиктов А.А., Лембас А.Н., Никишин Д.В. Ксеноперикардальная герниопластика: возможности и перспективы // *Бюллетень медицинских Интернет-конференций. Т. 1. №5. id 2011-03-24-A-1263 — 2011 — С. 11-15.*
5. Баулина О.А., Баулин В.А. и соавт. Первый опыт применения ксеноперикардальной ленты в антирефлюксной хирургии. *Инновационные имплантаты в хирургии: сб. тр. Ч. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; ISBN 978-5-7982-0325-3 2014 С. 168 – 172.*
6. Баулина О.А., Вихрев Д.В., Федорова М.Г. и соавт. Изучение перспективы применения ксеноперикардальной пластины в урогинекологии. // *Известия высших учебных учреждений. Поволжский регион. Фундаментальные исследования. Медицинские науки. 2012. №10. С. 20-24*
7. Баулина У.В., Сиваконь С.В., Митрошин А.Н. и соавт. Анализ результатов лечения пациентов после пластики сухожилий сгибателей пальцев

кисти ксеноперикардальным протезом. *Инновационные имплантаты в хирургии: сб. тр. Ч. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; ISBN 978-5-7982-0325-3 2014 С. 183–187.*

8. Брежнев В.П. Пути улучшения результатов аутодермальной пластики при послеоперационных вентральных грыжах: Автореф. дисс. канд. мед. наук. Харьков 1991., Гундорова Р.А. О показаниях к хирургическому вмешательству при ожоговой травме глаз. // *Новое в лечении ожогов глаз: тезисы докладов. Москва — 1989 — С.50-51.*

9. Бурцев П.Ю., Горшков А.А., Грусков А.Д., Ломовской В.А., Фуки В.К. Исследование упругих свойств биотканей, используемых в кардиохирургии. // *Материалы VII международного симпозиума «Динамические и технологические проблемы механики конструкций и сплошных сред» г. Ярополец 12-16 февраля 2001 — С. 91-99*

10. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиалканоаты — биоразрушаемые полимеры для медицины / *Под ред. В.И. Шумакова. — Красноярск: Группа компаний «Платина», — 2006 — 288 с.*

11. ГОСТ Р ИСО 10993. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 19. Исследование физико-химических, морфологических и топографических материалов. — М., 2010

12. Григорюк А.А. Морфологические исследования применения имплантатов с коротким сроком рассасывания для лечения вентральных грыж в эксперименте / А.А. Григорюк, Ю.А. Кравцов // *Бюллетень экспер. биол. и мед. № 12. — 2005 — С. 698-700*

13. Грин А., Аткис Д. Большие упругие деформации и нелинейная механика сплошной среды: *Пер. с англ. М.: Мир, — 1965 — 455с.*

14. Демичев Н.П. Сухожильная гомопластика в реконструктивной хирургии». — *Ростов на Дону: изд-во Рост. ун-та, — 1970 — 102 с.*

15. Дронов А. Ф. Имплантаты с направленными действиями для реконструктивной хирургии сосудов (экспериментально-клиническое исследование): *дисс. д-ра мед. наук. - М., — 1990- 482 с.*

16. Егиев В.Н. Взаимодействие полипропиленовых эндопротезов с тканями передней брюшной стенки / В.Н. Егиев, Д.В. Чижов, Н.В. Филаткина.// *Герниология*. – № 2. — 2005 — С. 41-49.

17. Егиев, В.Н. Сравнительная оценка степени фиксации фибробластов на синтетических эндопротезах, используемых для пластики дефектов передней брюшной стенки / В.Н. Егиев [и др.].// *Герниология*. 2006.№2. С. 37-41.

18. Журавлева И.Ю. Патогенез кальцификации биопротезов клапанов сердца и пути ее профилактики. // *Материалы симпозиума "Биопротезы в сердечно сосудистой хирургии"*. г. Кемерово. — 1995 — С. 50-56.

19. Зотов В.А. Пластика брюшной стенки сетчатыми элементами из никелида титана. // *Биосовместимые материалы и имплантаты с памятью формы. Материалы международной конференции*. - Томск: Нортхэмптон, МА. —.2001 — С. 122-127.

20. Иванов А. С. Балоян Г. М. Тараян М. В. Лебедева А. В. Рудаков А. С. Непрямая истмопластика коарктации аорты ксеноперикардом. Ближайшие и отдаленные результаты хирургической коррекции // *Кардиология и сердечно сосудистая хирургия*// №1. 2007 – С. 73-77.

21. Иванов А.С., Иванов В.А., Балоян Г.М., Евсеев Е.П., Шехтер А.Б., Милованова З.П. Ксенопластика в реконструктивной хирургии сердца и сосудов. Результаты 20-летнего использования пластических материалов на основе ксеноперикарда. Биопротезы в сердечно-сосудистой хирургии. // *Материалы Всероссийской конференции с международным участием. Кемерово, 21-23 июня, — 2001 — С.41-43.*

22. Иванов С.В., Иванов И.С., Должников А.А., Мартынцев А.А., Цуканов А.В., Мамедов Р.А. Морфология тканей при использовании протезов из полипропилена и политетрафолена. // *Анналы хирургии*. 2009 №3. С. 59 – 64.

23. Калинин Ю.Ю. Оптическое биокератопротезирование ожоговых бельм. / *дисс. докт. мед. наук*. – М., 2005. 260 с.

24. Калмин О. В., Живаева Л. В., Венедиктов А. А., Никишин Д. В., Фуки В. К., Генгин М. Т. Изучение in vivo свойств ксеноперикарда, прошедшего

различную обработку химико-ферментативным методом. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. Теоретическая медицина. № 2 (26), 2013 С. – 15-26.*

25. Каплунов О.Ф. К истории оперативного восстановления крестообразных связок коленного сустава // *Травматология и ортопедия в России, 2007. №1. С.74.*

26. Кармадонов А.В. Применение модифицированного ксеноперикарда в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки / *Автореф. дисс. канд. мед. наук. – Кемерово. – 2009 — 22 с.*

27. Карпенко А.А., Кужугет Р.А., Стародубцев В.Б., Игнатенко П.В., Ким И.Н., Горбатов В.Н. Непосредственные и отдаленные результаты различных методов реконструкции каротидной бифуркации. // *Патология кровообращения и кардиохирургия №1-2013, стр.21-24*

28. Карцева Е.В. Применение ксеноперикарда в комплексном лечении новорожденных с гастрошизисом. *Автореф. дисс. канд. мед. наук – РМАПО, г. Москва. – 2001 — 23 с.*

29. Краснопольский В.И., Попов А.А., Буянова С.Н. Синтетические материалы в хирургии тазового дна. // *Акуш. и гинекол.; 2003. №6. С. 36–38.*

30. Кудрявцева Ю.А., Глушкова Т.В., Веремеев А.В., Лосева С.В., Журавлева И.Ю. Новая технология антикальциевой обработки биопротезов клапанов сердца. // *Материалы тринадцатого всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов 25-28 ноября, Россия НППЛ РХСС СО РАМН, Кемерово – 2007 – С. 18-21.*

31. Куперберг Е.Б. Клиника, диагностика и неврологические показания к хирургическому лечению больных атеросклеротическим поражением ветвей дуги аорты. *Автореф. дисс. д.м.н. Москва. 1989*

32. Ланина С.Я. Методологические и методические вопросы гигиены и токсикологии полимерных материалов и изделий медицинского назначения. *Научный обзор. М. 1982. С.61-86.*

33. Лещенко, В.Г. Медицинская и биологическая физика : учеб. пособие / В.Г. Лещенко, Г.К. Ильич. — Минск : Новое знание ; М. : ИНФРА-М, 2012. С. 84 – 93
34. Лоран О.Б., Пушкарь Д.Ю., Годунов Б.Н. Свободная синтетическая петля в оперативном лечении недержания мочи при напряжении у женщин. *Пленум Правления Российского общества урологов. Материалы. М.; 2001. С. 117–118.*
35. Малиновский Н.Н., Константинов Б.А., Дземешкевич С.Л. Биологические протезы клапанов сердца. М.: Медицина. 1988. 255с.
36. Меркулова Е.П., Анищенко С.Л., Давыдюк Н.Н., Чеснов Ю.М. Экспериментальные операции на булле кроликов с имплантацией целлюлозы и ксенотрансплантата // *Медицинский журнал : рецензируемый научно-практический журнал. 2006. № 1. С. 64-66.*
37. Милованова З.П., Иванов А.С., Черепенин Л.П., Дземешкевич С.Л., Балоян Г.М. 11-летний опыт применения ксеноперикарда в хирургии сердца. *Тезисы докладов и сообщений II Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов, Санкт-Петербург, Ч. II. 1993. С. 159-160.*
38. Митрошин А.Н. Сиваконь С.В. Абдуллаев А.К. Гистоморфометрические данные и сравнительный анализ биотрансплантата при пластике сухожилий и связок. // *Сборник трудов XVII межрегиональной научно-практической конференции памяти Н.Н. Бурденко. Пенза, 2010 – С.224-225.*
39. Митрошин А.Н. Сиваконь С.В. Баулина У.В. Возможности реконструкции сухожилий сгибателей пальцев кисти биологическим материалом. // *Сборник трудов XVII межрегиональной научно-практической конференции памяти Н.Н. Бурденко. Пенза, 2010 – С.223-224*
40. Митрошин А.Н., Абдуллаев А.К и соавт. Возможности и результаты применения ксеноперикарда при повреждении сухожилий и связок. *Инновационные имплантаты в хирургии: сб. тр. Ч. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; ISBN 978-5-7982-0325-3 2014 С. 187 – 192.*

41. Никольский А.В., Башков В.А., и соавт. Применение ксенопластики в урологии, андрологии и урогинекологии (пилотное исследование) *Инновационные имплантаты в хирургии: сб. тр. Ч. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; ISBN 978-5-7982-0325-3 2014 С. 193 – 196.*
42. Никольский В.И., Титова Е.В. и соавт. Опыт применения ксеноперикарда «Кардиоплант» при послеоперационных вентральных грыжах. *Инновационные имплантаты в хирургии: сб. тр. Ч. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; ISBN 978-5-7982-0325-3 2014 С. 196 – 199.*
43. Никольский В.И., Янгуразова Е.В. и соавт. Возможность использования ксеноперикарда для формирования лапаростомы. *Инновационные имплантаты в хирургии: сб. тр. Ч. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; ISBN 978-5-7982-0325-3 2014 С. 199– 201.*
44. Патент РФ № 2120212 Способ предимплантационной обработки биологических протезов сосудов и клапанов сердца.
45. Патент РФ № 2197818 Способ подготовки биоткани для ксенопротезирования.
46. Севастьянов В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов. Т. XI. 2009. №3 С. 69-80.*
47. Севастьянов В.И. Биосовместимость / М.: ИЦ ВНИИ геосистем., 1999. 366 с.
48. Севастьянов В.И., Васин С.Л., Перова Н.В. Методы исследований биоматериалов и медицинских изделий// *В кн.: Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. – М.: ИЦ ВНИИ геосистем., 1999. С. 47-87.*
49. Серов, В.В., А.Б.Шехтер. Соединительная ткань / -М.: Медицина, 1981.-312 с.
50. Синельников Р.Д. Атлас анатомии человека: Учеб. пособие для мед. ин-тов. Т.4 / Р. Д. Синельников, Я. Р. Синельников. - 2-е изд., стер. - М. : Медицина, 1996. - 319 с.

51. Стародубцев В.Б. Диагностика и хирургическое лечение патологии брахиоцефальных артерий у пациентов с сосудисто-мозговой недостаточностью. *Автореф. дисс. док. мед. наук Новосибирск. 2009*
52. Столяров М. С. «Клинико-функциональная оценка пластики сонных артерий заплатой из ксеноперикарда, обработанного диэпоксисоединениями, при каротидной эндартерэктомии». *Автореф. дисс. кан. мед. наук. Новосибирск., 2008*
53. Сэнно Манабу Полимеры медицинского назначения. *М.: Медицина. 1981, 248 с.*
54. Фаллер Д., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки (Руководство для врачей). *Пер. с англ. под ред. акад. И.Б.Збарского. М.: Бином. 2003*
55. Фунг Зуй Хонг Шон. Отдаленные результаты имплантации ксеноперикардальных кондуитов при хирургической коррекции аневризмы восходящей аорты. *Дисс. канд. мед. наук М.. 2012*
56. Храпунов В.Н., Захарова В.П., Пищурин А.А., Горячев А.Г. Структуральные изменения ксеноперикарда в зависимости от метода обработки (эксперимент *in vivo* с последующим патоморфологическим исследованием). *Ежегодник научных трудов Ассоциации сердечно-сосудистых хирургов Украины, сборник научных трудов № 18. Киев. 2010 – С. 121-128.*
57. Храпунов В.Н., Шидловский Н.В., Пищурин А.А., Горячев А.Г. Исследование механических свойств (прочность и эластичность) ксеноперикарда, обработанного по различным методикам. *Ежегодник научных трудов Ассоциации сердечно-сосудистых хирургов Украины Сборник научных трудов № 18. Киев 2010 – С. 144-151.*
58. Хэм А., Корман Д. «Гистология» т.2., М., «Мир». 1983
59. Чернявский А.М., Ларионов П.М., Столяров М.С., Стародубцев В.Б.. Структурная трансформация ксеноперикарда после имплантации в сонную артерию// *Патология кровообращения и кардиохирургия. Новосибирск, №4 – 2007– С. 37-40*
60. Чернявский А.М., Столяров М.С., Стародубцев В.Б., Виноградова Т.Е., Альсов С.А.. Сравнительные долгосрочные результаты операций каротидной

эндартерэктомии с пластикой заплатами из ксеноперикарда, обработанного диэпоксидсоединениями, и аутовены // *Патология кровообращения и кардиохирургия* № 4 – 2007 – С. 46-50.

61. Чеснов Ю.М. Биосовместимость ксеноперикарда, фиксированного эпоксидными соединениями, в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. // *Актуальные вопросы кардиологии. Выпуск 2. Сб. научн. тр. под редакцией Н.А. Манака. "Энциклопедикс" ISBN 985-630028-2. 2002. С. 188-190.*

62. Чеснов Ю.М. Островский Ю.П., Скорняков В.В., Швед М.М. Пластика корня аорты заплатами "Биокард" при аортальном протезировании. // *Медицинский журнал. – Минск, №3 – 2005 – С.122-124*

63. Чеснов Ю.М., Станишевский Л.С., Швед М.М., Островский Ю.П.. Экспериментальные биопротезы для сердечно-сосудистой хирургии. *Тез. докл. в сб. материалов "Биопротезы в сердечно-сосудистой хирургии". Кемерово, Россия., 2001. С. 71 – 72.*

64. Шапошников, А. Н. Эпоксисоединения в консервации биологических протезов клапанов сердца (экспериментальное исследование): *дисс. канд. мед. наук / А. Н. Шапошников. - М., 1992. 213 с.*

65. Шумаков В.И., Севастьянов В.И. Биополимерные матрицы для искусственных органов и тканей // *Здравоохранение и медицинская техника. 2003 . №4. С. 30-33.*

66. Щукин Е.Д., Краснов М.М., Измайлова В.Н., Бессонов А.И., Гуров А.Н., Афанасова Г.А.. О необратимом растяжении биополимеров глаза. // *Коллоид. Журн. 1994. т. 56 №3.*

67. Щукин Е.Д., Краснов М.М., Измайлова В.Н., Бессонов А.И., Гуров А.Н., Афанасова Г.А.. Влияние активной среды на ползучесть склеры глаза. // *Коллоидн. журнал , т.59, 1997 №3. С.409-411.*

68. Vajpai PK. Immunological aspects of treated natural tissue prostheses. *In: Williams DF, ed. Biocompatibility of Tissue Analogues. Boca Raton, FL: CRC Press, — 1985 — P. 5-25.*

69. Barlas Naim Aytacoglu, Necat Yilmaz. Citric acid as a decalcifying agent for the excised calcified human heart valves .*The Anatolian Journal of Cardiology (Anadolu Kardiyoloji Dergisi)*, April; №8, — 2008 — P. 94-98.
70. Chang Y; Sung H; Chiu Y; Lu J. Assessment of an epoxy-fixed pericardial patch with or without ionically bound heparin in a canine model. // *International Journal of Artificial Organs*; Vol. 20; № 6; — 1997 — P. 332-340.
71. Connolly J.M. et al. Ethanol inhibition of porcine bioprosthetic heart valve cusp calcification is enhanced by reduction with sodium borohydride. *J Heart Valve Dis.*; 13(3): — 2004 — P.487-493.
72. Garcia paez J.M.E. Jorge-herrero, A. Carrera, I. Millan Porcine pericardial membrane subjected to tensile testing. Preliminary study of the process of selecting tissue for use in the construction of cardiac bioprostheses // *Journal of materials science: materials in medicine* 12; — 2001 — P.425-430.
73. Girardot J.M., Girardot M.N. Amide cross-linking: an alternative to glutaraldehyde fixation. *J Heart Valve Dis*, 5(5): — 1996 — P. 518-525.
74. Goissis Gilberto, Marcolino Domingo Braile, Carnevalli Nelly cristina. Mechanical, thermal and morphological properties of glutaraldehyde crosslinked bovine pericardium followed by glutamic acid treatment // *J. Materials Research*, Vol. 12, No 1, — 2009 — P.113-119.
75. Grood, E.S. Cruciate ligament prosthesis: strength, creep, and fatigue properties / E.S. Grood, F.R. Noyes// *J. Bone Joint Surg.* — Vol. 58-A. — 1976 — P.1083–1088.
76. H.Ali Dondas, Necat Yilmaz, Ulku Comelekoglu. Prevention of calcification with TPEN in pericardial bioprosthetic heart valve material., *Faculty of Medicine, Mersin University, Mersin, Turkey, Anadolu Kardiol Derg*, № 4, — 2007 — P. 365-370
77. Holzmueller, W. Das PDS-augmentierte Patellar-sehnentransplantat zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes am Schafsknie: *Chir Forum* / W. Holzmueller [et al.] // *Langenbecks Arch. Chir.* — 1989.— *Suppl.* — P. 265–268.

78. Isenburg J.C., et al. Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. // *Biomaterials*, 2004; 25(16): P. 3293-3302.
79. Isenburg J.C., et al. Tannic acid treatment enhances biostability and reduces calcification of glutaraldehyde fixed aortic wall. // *Biomaterials*, 2005; 26(11): P. 1237-1245.
80. Ito T, Maekawa A, Aoki M, Hoshino S, Hayashi Y, Sawaki S, Yanagisawa J, Tokoro M. Seamless reconstruction of mitral leaflet and chordae with one piece of pericardium. // *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014 Mar 31. [Epub ahead of print]
81. James, S.L. Cruciate ligament stents in reconstruction of the unstable knee / S.L. James [et al.] // *Clin. Orthop.* – 1979. – N 143. – P. 90–96.
82. Jayakrishnan A., Jameela S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. // *Biomaterials Volume 17, Issue 5, 1996, P. 471–484*
83. Kato Y, Yamaguchi S, Yachiku S, Nakazono S, Hori J, Wada N, et al. Changes in urinary parameters after oral administration of potassium-sodium citrate and magnesium oxide to prevent urolithiasis. // *Urology* 2004; 63: P. 7-11.
84. Kershen R.T., Dmochowski R.R., Appel R.A. Beyond collagen: injectable therapies for the treatment of female stress urinary incontinence in the new millennium. // *J Urol* 2002; 29: P. 559–74.
85. Kim DJ, Kim YJ, Kim WH, Kim SH. Xenograft Failure of Pulmonary Valved Conduit Cross-linked with Glutaraldehyde or Not Cross-linked in a Pig to Goat Implantation Model. // *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012 Oct;45(5):287-94.
86. Kim SS, Lim SH, Cho SW. Tissue engineering of heart valves by recellularization of glutaraldehyde-fixed porcine valves using bone marrow-derived cells. *Exp Mol Med*. 2006 Jun 30;38(3):273-83. Department of Bioengineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea.
87. Lee J.Michael, Ralph Corrente, Sean A. Haberer. The bovine pericardial xenograft. Effect of tethering or pressurization during fixation on the tensile viscoelastic

properties of bovine pericardium. // *Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 23,*
— 1989 — P.477-489,

88. Levy R. Y., Schoen F. Y. Prevention of experimental bioprosthetic heart valve calcification. - // *Trans. Soc. Biomater, 1984, vol. 7, p. 195*

89. Magilligan DJ, Lewis JW Jr, Heinzerling RH, Smith D. Fate of a second porcine bioprosthetic valve. // *J Thorac Cardiovasc Surg 1983; 85: P. 362-370.*

90. Maniscalco B.S., Taylor K.A. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy. // *Pathophysiology — 2004, 11, P. 95-101*

91. Marangella M, Di Stefano M, Casalis S, Berutti S, D'Amelio P, Isaia G.C. Effects of potassium citrate supplementation on bone metabolism. // *Calcif Tissue Int 2004. №74. P. 330-5.*

92. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. // *Biotechniques. 2004 Nov;37(5):790-6, 798-802.*

93. Min BJ, Kim YJ, Choi JW, Choi SY, Kim SH, Lim HG. Histologic Characteristics and Mechanical Properties of Bovine Pericardium Treated with Decellularization and α -Galactosidase: A Comparative Study. // *Korean J Thorac Cardiovasc Surg. 2012 Dec;45(6):368-79.*

94. Mironova, S.S. Späetresultate der Rekonstruktion des Bandapparates des Kniegelenkes mit Lawsan / S.S.Mironova // *Zbl. Chir. — 1978. — Bd. 103. — P. 432–434.*

95. Morgan T.O., Westney O.L., McGuire E.J. Pubovaginal sling: 4-year outcome analysis and quality of life assessment. // *J Urol 2000; 163: P. 1845–8*

96. Mueller C, Dave H, Prêtre R. Surgical repair of aorto-ventricular tunnel. // *Multimed Man Cardiothorac Surg. 2012 Jan 1;2012 - P. 1093-97*

97. Naso F, Gandaglia A, Bottio T, Tarzia V, Nottle MB, d'Apice AJ, Cowan PJ, Cozzi E, Galli C, Lagutina I, Lazzari G, Iop L, Spina M, Gerosa G. First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. // *Xenotransplantation. 2013 Jul-Aug;20(4):252-61.*

98. Neethling WM, Hodge AJ, Clode P, Glancy R. A multi-step approach in anti-calcification of glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. // *J Cardiovasc Surg (Torino)*. Fremantle Heart Institute, Fremantle Hospital, School of Surgery and Pathology, University of Western Australia, Fremantle, Western Australia 2006 Dec; 47(6): P. 711-8,
99. Nimni M.E. Glutaraldehyde fixation revisited. // *J. Vet. Med. Sci.* 2001. № 9. P. 961-965.
100. Nonaka M, Iwakura A, Yamanaka K. Technique to treat extensive abscesses in double valve replacement for prosthetic valve endocarditis. // *J Heart Valve Dis.* 2013 Jul;22(4):575-7.
101. Odvina CV, Preminger GM, Lindberg JS, Moe OW, Pak CY. Long-term combined treatment with thiazide and potassium citrate in nephrolithiasis does not lead to hypokalemia or hypochloremic metabolic alkalosis. // *Kidney Int* 2003; 63: P. 240-7
102. Pak CY, Peterson RD, Poindexter J. Prevention of spinal bone loss by potassium citrate in cases of calcium urolithiasis. // *J Urol* 2002; 168: P. 31-4.
103. Pettenazzo E, Valente M, Thiene G. Octanediol treatment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: evidence of anticalcification efficacy in the subcutaneous rat model. // *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008 Aug;34(2):. Epub 2008 Jun 11, P. 418-22
104. Poon C.I., Zimmern P.E., Wilson S.T. et al. Three – dimensional ultrasonography to assess long-term durability of periureteral collagen in women with stress urinary incontinence due to intrinsic sphincter deficiency. // *J Urol* 2005; 1 (65): P. 60–4
105. Rehm, K.E. Biomechanische Untersuchungen vom resorbierbaren Bandersatz und deren klinische Bedeutung: Chir. Forum / K.E. Rehm [et al.] // *Langenbecks Arch. Chir.* – 1984. – Suppl. – P. 205–211.
106. Scherer, M.A. Resorptionskinetik von Polidioxanon-Kordeln in Abhaengigkeit vom Implantationsort:Berichtsband DVM/AO Tagung 11 / M.A. Scherer [et al.] // *Deutscher Verband fuer Materialforschung und pruefung.* – Berlin, 1991. – P. 73–81.

107. Schlöglhofer T, Aigner P, Stoiber M, Schima H. Fixation and mounting of porcine aortic valves for use in mock circuits. // *Int J Artif Organs*. 2013 Oct;36(10):738-41.
108. Siebels, W. Die Auswirkung von temporaeren synthetischen Verstaerkungsmaterialien auf die biomechanischen Eigenschaften gestielter Patellarsehnenplastiken als Kreuzbandersatz beim Schaf : Chir. Forum / W. Siebels [et al.] // *Langenbecks Arch. Chir.* – 1989.– *Suppl.* – P. 261–264.
109. Soygur T, Akbay A, Kupeli S. Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and residual fragments after shockwave lithotripsy in lower caliceal calcium oxalate urolithiasis: a randomized controlled trial. // *J Endourol* 2002; 16: P. 149-152.
110. Sucu N., et al. Two-step EDTA anti-calcification method for bioprosthetic heart valve materials. // *Med Sci Monit*, 2006; 12(6): MT33-38.
111. Sung H.W., Cheng W.H., Chiu I.S., Hsu H.L., Liu S.A. Studies on epoxy compound fixation. // *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2003. № 6. P. 671-675.
112. Trantina-Yates A.E., et al. Detoxification on top of enhanced, diamine-extended glutaraldehyde fixation significantly reduces bioprosthetic root calcification in the sheep model. // *J Heart Valve Dis*, 2003; 12(1): P. 100-101.
113. Trowbridge Anthony E., Keith M. Roberts, Clare E. Crofts Pericardial heterografts. Toward quality control of mechanical properties of glutaraldehyde-fixed leaflets // *J. Thorac Cardiovasc Surg* — 1986 — P. 21-28,
114. Trowbridge E.A. Black M.M. Daniel C.L. The mechanical response of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium to uniaxial load // *Journal of materials science* 20 — 1985 — 114-140
115. Trowbridge E.A., Crofts C.E. The standardizations of gauge length: its influence on the relative extensibility of natural and chemically modified pericardium // *J. Biomechanics Vol. 19. № 12*, — 1986 — P. 1023-1033,
116. US Patent 4402697 Method for inhibiting mineralization of natural tissue during implantation
117. US Patent 4648881 Implantable biological tissue and process for preparation thereof

118. US Patent 5447536 Method for fixation of biological tissue
119. US Patent 5733399 Process for fixation of calcification-resistant biological tissue
120. US Patent 6479079 Anticalcification treatments for fixed biomaterials
121. US Patent 6506339 Method of sterilization
122. US Patent 6547827 Method for fixation of biological tissues having mitigated propensity for post-implantation calcification and thrombosis and bioprosthetic devices prepared thereby
123. US Patent 6696060 Methods for sterilizing preparations of monoclonal immunoglobulin's.
124. Valente M., et al. Detoxified glutaraldehyde cross-linked pericardium: tissue preservation and mineralization mitigation in a subcutaneous art model. // *J Heart Valve Dis*, 1998; 7(3): P. 283-291.
125. Vescini F, Buffa A, La Manna G, Ciavatti A, Rizzoli E, Bottura A, et al. Long-term potassium citrate therapy and bone mineral density in idiopathic calcium stone formers. // *J Endocrinol Invest* 2005; 28: P. 218-22.
126. Victrup L., Summers K.H., Dennett S.L. Clinical urology guidelines for the initial assessment and treatment of women with urinary incontinence: a review. // *European urology* 2005; 4 (issue 1): P. 38-45
127. Viidik Andrus. Mechanical properties of parallel-fibred collagenous tissues. // *Journal of Biomechanics*, Volume 24, Issue 9, — 1991 — P. 819-823
128. Zilla P., et al. Glutaraldehyde detoxification of aortic wall tissue: a promising perspective for emerging bioprosthetic valve concepts. // *J Heart Valve Dis*, 1997; 6(5): P. 510-520

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГА – глутаровый альдегид

ИК – инфракрасная (спектроскопия)

МЗ РФ – Министерство здравоохранения Российской Федерации

МИ – медицинское изделие

МПа – мегапаскаль

нм - нанометр

ПЕ – протеолитическая единица

УФ – ультрафиолетовая (спектроскопия)

Хс-ЛПНП холестерина липопротеиды низкой плотности

ЭДТА - Этилендиаминтетрауксусная кислота

FDA - Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

MOPS - (N-морфолино)-пропансульфоновая кислота

PIPES - Пиперазин-1 ,4-бис-(2-этансульфоновая кислота)

SDS - додецилсульфата натрия

TPEN - тетракис (2-пиридилметил) этилендиамин

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке компании «Кардиоплант» научно-производственного предприятия «МедИнж», а также при поддержке гранта Министерства промышленности и торговли Российской Федерации на выполнение научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы «Разработка биологических ксеноматериалов для реконструктивной хирургии, остеопластики и тканевой инженерии» в рамках выполнения федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 17 февраля 2011 г. № 91.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность за терпение и снисходительность к автору, а также за помощь в подготовке данной работы, поддержку и критику научному руководителю профессору Михаилу Трофимовичу Генгину. Искренне признателен и глубоко благодарен научному руководителю Виктору Ивановичу Севастьянову за неоценимую помощь в подготовке работы к защите.

Отдельную благодарность выражаю также своему руководителю Сергею Васильевичу Евдокимову за мудрость, вдохновение, отеческий надзор и предоставленную возможность поверить в свои силы и проявить себя. Выражаю также сердечную благодарность Валентине Константиновне Фуки за помощь в планировании работы, за добрую семейную атмосферу и мудрость. Сердечно благодарю коллегу Любовь Живаеву, а также Сергея Гамзина и Анастасию Кручинину за помощь в подготовке и проведении экспериментального исследования. Благодарю Дмитрия Викторовича Никишина за помощь в проведении гистологического анализа и оценку полученных результатов, а также сотрудников Медицинского института Пензенского Государственного Университета за помощь и клиническую апробацию материалов, полученных в результате работы.

Благодарю своих родных и друзей за веру и моральную помощь, оказанную при подготовке работы.