

ID: 2015-07-6-A-5344

Оригинальная статья

Калмин О.В.¹, Венедиктов А.А.², Никишин Д.В.¹, Живаева Л.В.²**Изучение свойств ксеноперикардиальной пластины, обработанной модифицированным химико-ферментативным методом**¹ФГБОУ ВПО Пензенский государственный университет Минобрнауки России²Общество с ограниченной ответственностью «Кардиоплант»Kalmin O.V.¹, Venediktov A.A.², Nikitin D.V.¹, Zhivaeva L.V.²**Study of the properties of the xenopericardial plate, treated with a modified chemical-enzymatic method**¹Penza State University²Limited Liability Company «Kardioplant»**Резюме**

Цель: разработка метода химико-ферментативной обработки ксеноперикарда с целью получения нового материала с низкой биорезорбцией. **Методы.** Материалом исследования были образцы ксеноперикарда, обработанные стандартным и модифицированным химико-ферментативными методами. Часть образцов ксеноперикарда подвергали исследованию механических свойств. Другая часть образцов имплантировалась экспериментальным животным. Сроки имплантации составили 2 недели, 1 и 2 месяца. После выведения животных из эксперимента производилось гистологическое исследование образцов. **Результаты.** Установлено, что ксеноперикардиальная пластина, обработанная модифицированным методом, обладает более высоким модулем упругости, большей прочностью и меньшей растяжимостью, в отличие от материала, обработанного запатентованным химико-ферментативным методом. Повышение прочности и упругости, но снижение растяжимости образцов экспериментальной группы связано с обработкой глутаровым альдегидом в более высокой концентрации. В связи с этим биодegradация и биоинтеграция в образцах, подвергшихся стандартной обработке, активно выявляются уже в конце первого месяца после имплантации, в отличие от ксеноперикарда, обработанного модифицированным способом, у которого данные процессы проявляются к концу второго месяца. **Заключение.** Изучение деформативно-прочностных свойств и микроморфологии ксеноперикардиальной пластины на разных этапах эксперимента подтверждает, что модернизированный метод химико-ферментативной обработки ксеноперикарда позволяет создать биоматериал, обладающий лучшими упруго-эластическими характеристиками и характеризующийся более низкой скоростью биорезорбции и замещения собственной соединительной тканью реципиента.

Ключевые слова: ксеноперикард, тканевая инженерия, химико-ферментативная обработка, биорезорбция, механические свойства

Abstract

Objective: develop of a method of chemical-enzymatic treatment of xenopericard to produce new material with low bioresorption. **Methods.** The research material was samples of xenopericard treated with standard and modified chemical-enzymatic methods. Some samples of xenopericard were subjected to mechanical properties. Another part of the sample was implanted in experimental animals. Terms of implantation were 2 weeks, 1 and 2 months. After removal of the animal experiment was performed histological examination of samples. **Results.** It was established that xenopericardial wafers processed version of the method has a high modulus of elasticity, greater strength and less stretchability, in contrast to the material treated patented enzymatic-chemical method. Increased strength and elasticity, tensile specimens but the decrease is due to an experimental treatment groups with glutaraldehyde at a higher concentration. Therefore biointegration, biodegradation, and in samples exposed to standard treatment, actively detected at the end of the first month after implantation, unlike xenopericard processed by a modified method in which these processes occur at the end of the second month. **Conclusion.** The study of deformability and strength properties and micromorphology xenopericardial plates at different stages of the experiment confirms that the modernized method of chemical-enzymatic treatment of xenopericard to create a biomaterial with better elastic-elastic characteristics and is characterized by a lower rate of substitution and bioresorption own connective tissue of the recipient.

Key words: xenopericard, tissue engineering, chemical-enzymatic treatment, bioresorption, mechanical properties

Введение

На современном этапе развития в реконструктивной медицине одной из наиболее актуальных является проблема подбора материалов для проведения реконструктивных хирургических манипуляций.

Хорошо известно, что «идеальный» трансплантат должен отвечать следующим требованиям: не приводить к воспалительной реакции; не оказывать токсического и иммуногенного действия; должен сохранять заявленные свойства как на этапе хранения, так и в организме, в который он был имплантирован; обладать способностью к физиологической деградации с образованием безопасных продуктов распада; обладать необходимой скоростью деградации, соответствующей процессам образования новой соединительной ткани; давать возможность нанесения биологически активных веществ на его поверхность; должен обладать эффективной и универсальной возможностью стерилизации; иметь длительные сроки хранения.

Наиболее часто в клинической медицине для трансплантации используют следующие основные виды материалов: аутоотрансплантаты, аллотрансплантаты и синтетические материалы.

Аутоотрансплантаты – это собственные ткани организма пациента. Этот материал имеет значительный плюс, он высоко биосовместим, но при проведении хирургических манипуляций с его использованием врачу приходится забирать материал и, как следствие, травмировать пациента, что увеличивает период реабилитации пациента [1-3].

Аллоотрансплантаты – это ткани и органы, взятые от донора (человека). В качестве донора может выступать трупный материал. Данный материал труднодоступен, т.к. в Российской Федерации практически отсутствуют банки с алломатериалами. При этом такой материал может нести в себе риск заражения различными инфекциями, что является недопустимым в клинической медицине [4-7].

Синтетические материалы широко распространены в практической медицине, имеют относительно небольшую стоимость, но обладают малым уровнем биоинтеграции и довольно часто отторгаются [8, 9].

Ксенотрансплантаты – это ткани и органы, которые взяты от животных. Их использование началось еще в конце XX века, однако они редко использовались из-за несовершенной методики изготовления ксеноматериала: оставшиеся в материале клетки запускали иммунный ответ, что способствовало отторжению имплантатов.

Основной причиной антигенности являются клетки ксеноматериала, а также глизоамингликаны. Именно поэтому в процессе подготовки необходимо разрушить клетки и вывести их из материала. Суть наиболее распространенного метода обработки ксеноперикарда, использующегося на данный момент (Патент на изобретение РФ № 2197818 от 28.10.2008 г.), состоит в том, что фермент разрушает носители антигенности, а вследствие обработки ткани гипертоническими растворами хлорида натрия фрагменты клеток удаляются из материала. При этом волокна соединительной ткани остаются незатронутыми и сохраняют свою структуру, а дальнейшая обработка глутаровым альдегидом превращает ткань ксеноматериала в биополимер. Однако данный метод не лишен недостатков и требует дальнейшего развития и оптимизации.

Цель: разработка метода химико-ферментативной обработки ксеноперикарда с целью получения нового материала с низкой биорезорбцией.

Материал и методы

Взятие ксеноперикарда производилось не позднее 20 минут с момента забоя животного. Полученный перикард погружался в физиологический раствор и доставлялся в лабораторию для дальнейшей обработки. Образцы были разделены на 2 группы: опытную и контрольную. В каждой группе исследовалось по 20 образцов ксеноперикарда.

Контрольная группа была обработана стандартным методом (Патент РФ № 2197818 от 28.10.2008 г.). Опытную группу образцов ксеноперикарда подвергали действию протеолитического фермента при различных режимах: изменяли время обработки, концентрацию протеолитического фермента, температуру при обработке, уровень pH, а также концентрацию сшивающего агента, в качестве которого служил раствор глутарового альдегида. Подобная модель ткани, будучи относительно «сильно зашитой», в теории должна обладать пониженной скоростью биоразложения. В конце обработки ксеноперикарда проводился гистологический контроль материала на наличие клеточных элементов и сохранность коллагеновых и эластических волокон ксеноперикарда.

На половине образцов из каждой группы изучали деформативно-прочностные свойства биоматериала. Исследование проводили на испытательной машине INSTRON-5944 BIO PULS, при этом изучались: максимальная нагрузка, максимальная относительная деформация, модуль упругости, напряжение при растяжении при максимальной нагрузке. Во время измерений образцы смачивались в физиологическом растворе.

Оставшиеся 10 образцов из каждой группы имплантировали экспериментальным животным. При проведении эксперимента соблюдались положения Европейской Конвенции по защите экспериментальных животных (1986 г.). В качестве экспериментальных животных выступали белые крысы породы Wistar массой до 260 г. Экспериментальных животных содержали на обычной диете. Экспериментальную модель создавали путем имплантации образцов материалов животным под кожу в область межлопаточного пространства. Операция проводилась в условиях стерильности под масочным эфирным наркозом. Подкожные полости формировали тупым способом с помощью стерильного шпателя. Разрез ушивали рассасывающейся нитью. Срок имплантации составил 2 недели, 1 месяц и 2 месяца. По истечении сроков образцы из каждой экспериментальной группы извлекали и производили гистологический анализ материала. Образцы тканей фиксировали в нейтральном 10%-ном формалине, проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином и по методу Вейгерта-Ван-Гизона. Используя микроскоп с цифровой фото насадкой, разрешением 7 мегапикселей с каждого гистологического препарата было получено по три фотографии. На микрофотографиях изучали: состояние коллагеновых и эластических волокон; наличие и характер клеточных элементов; наличие новообразованных кровеносных сосудов; явления биоинтеграции и биодеградации; наличие и степень воспалительной реакции.

Результаты

Исследование деформативно-прочностных свойств.

Исследование выявило, что образцы ксеноперикардиальной пластины, обработанные запатентованным и экспериментальным методами, имеют различные деформативно-прочностные свойства (табл. 1).

Модуль упругости (модуль Юнга) пластин ксеноперикарда экспериментальной группы был выше в 1,52 раза, чем в контрольной группе. Наоборот, максимальная относительная деформация образцов экспериментальной группы была ниже в 1,32 раза по сравнению с контрольной. Образцы экспериментальной группы обладали более значительной прочностью по сравнению с контрольной группой, прошедшей запатентованную обработку (в 1,36 раза).

Таблица 1. Деформативно-прочностные свойства ксеноперикарда

| Группа образцов | Модуль упругости (МПа) | Максимальная нагрузка (Н) | Напряжение при растяжении при максимальной нагрузке (МПа) | Максимальная относительная деформация (%) |
|-------------------------|------------------------|---------------------------|---|---|
| Зпатентованный метод | 28,98±7,42 | 28,23±3,40 | 7,64±2,06 | 33,44±5,87 |
| Экспериментальный метод | 43,99±5,32 | 38,32±5,30 | 8,14±1,02 | 25,38±6,44 |

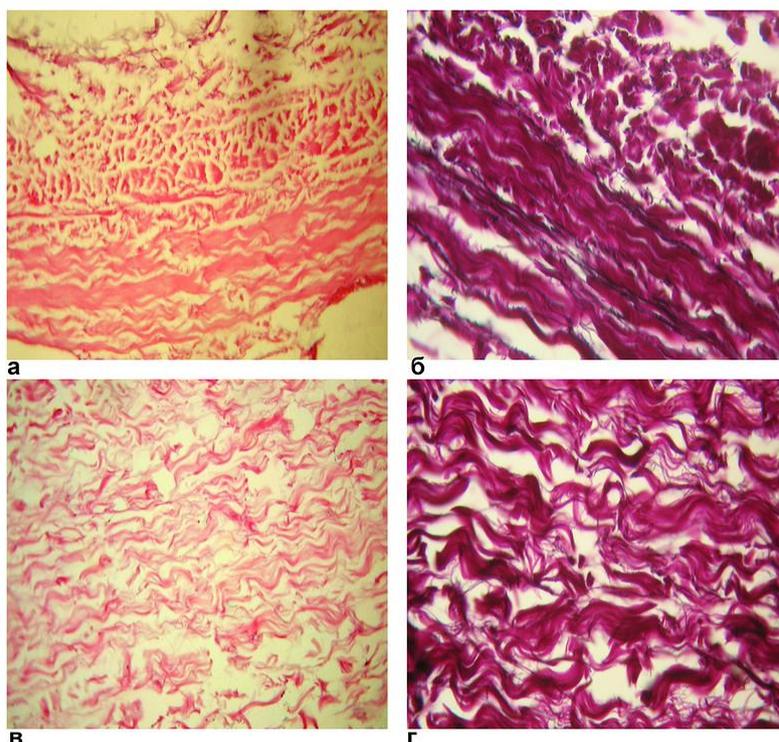


Рисунок 1. Контрольные образцы ксеноперикарда (а – ксеноперикард, обработанный стандартным методом, окраска гематоксилином-эозином, х200; б – ксеноперикард, обработанный стандартным методом, окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, х400; в – ксеноперикард, обработанный модифицированным методом, окраска гематоксилином-эозином, х200; г – ксеноперикард, обработанный модифицированным методом, окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, х400)

Повышение прочности и упругости, но снижение растяжимости образцов экспериментальной группы связано с обработкой глутаровым альдегидом в более высокой концентрации. В результате такой обработки происходит образование большего количества поперечных швов между коллагеновыми волокнами. Вследствие этого коллагеновая сеть становилась более плотной, а весь ксеноматериал становится более прочным и упругим, но менее растяжимым.

Значение напряжения при максимальной нагрузке в контрольной группе незначительно отличалось от аналогичного показателя экспериментальной группы. Следовательно, такой вид модификации ксеноперикардиальной пластины не оказывает сильного влияния на распределение сил между волокнами при приложении нагрузки в виде одноосного растяжения.

Микроскопическое исследование.

1. Обработка ксеноперикарда стандартным методом.

При гистологическом исследовании контрольных образцов ксеноперикарда, прошедших стандартную обработку, было установлено, что при окраске гематоксилином и эозином клеточные элементы не выявлялись; при окраске по методу Вейгерта-Ван-Гизона, несмотря на обработку ксеноперикарда агрессивными веществами и разрушение клеточных элементов, состояние эластических и коллагеновых волокон оставалось без изменений.

При исследовании ксеноперикарда на 14-е сутки после имплантации при окраске гематоксилином и эозином отмечались было установлено, что в 2 образцах имелась слабо выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация (в среднем на 2/3 от общей толщины ксеноперикардиальной пластины) с включением эпителиоидных клеток и клеток фибропластического ряда, в 1 образце – умеренно выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Вокруг имплантированных образцов ксеноперикарда сохранялась умеренная клеточная инфильтрация, наблюдалось образование грануляционной ткани с единичными новообразованными сосудами (рис. 1).

При анализе гистологических препаратов, окрашенных по Вейгерту-Ван-Гизону, выявлено частичное разрушение коллагеновых и эластических волокон, что свидетельствует об активных процессах биodeградации исследуемого фрагмента ксеноперикарда.

К концу первого месяца эксперимента в местах прилегания трансплантата к тканям реципиента отмечались выраженные пролиферативные процессы. Ксеноперикардиальная пластина имела однородную структуру, по наружной поверхности была инфильтрирована лимфоцитами и гистиоцитами. Пластина была окружена выраженным инфильтрационным валом. В составе клеточного инфильтрата встречались плазматические клетки, лимфоциты, гистиоциты, клетки фибробластического ряда. В области контакта с материалом преобладают лимфоциты и гистиоциты, на периферии грануляционного вала – пролиферирующие фибробласты и очаги новообразованного коллагена. В зоне вокруг ксеноперикарда определялись новообразованные кровеносные сосуды. При окраске по Вейгерту-Ван-Гизону выявлялись формирующиеся собственные коллагеновые и эластические волокна.

Через 2 месяца после начала эксперимента на поверхности материала отмечались явления биodeградации. Было обнаружено практически полное врастание собственной соединительной ткани и новообразованных сосудов, значительное уменьшение количества лимфоцитов и макрофагов в инфильтрате. Фибробласты активно синтезировали соединительнотканый каркас вокруг трансплантата. При окраске по Вейгерту-Ван-Гизону определялось большое количество новообразованных собственных коллагеновых и эластических волокон. Подобные изменения свидетельствовали об активном процессе биodeградации ксеноперикардиальной пластины и интеграции в нее собственной соединительной ткани с дальнейшим полным замещением имплантата (рис. 2).

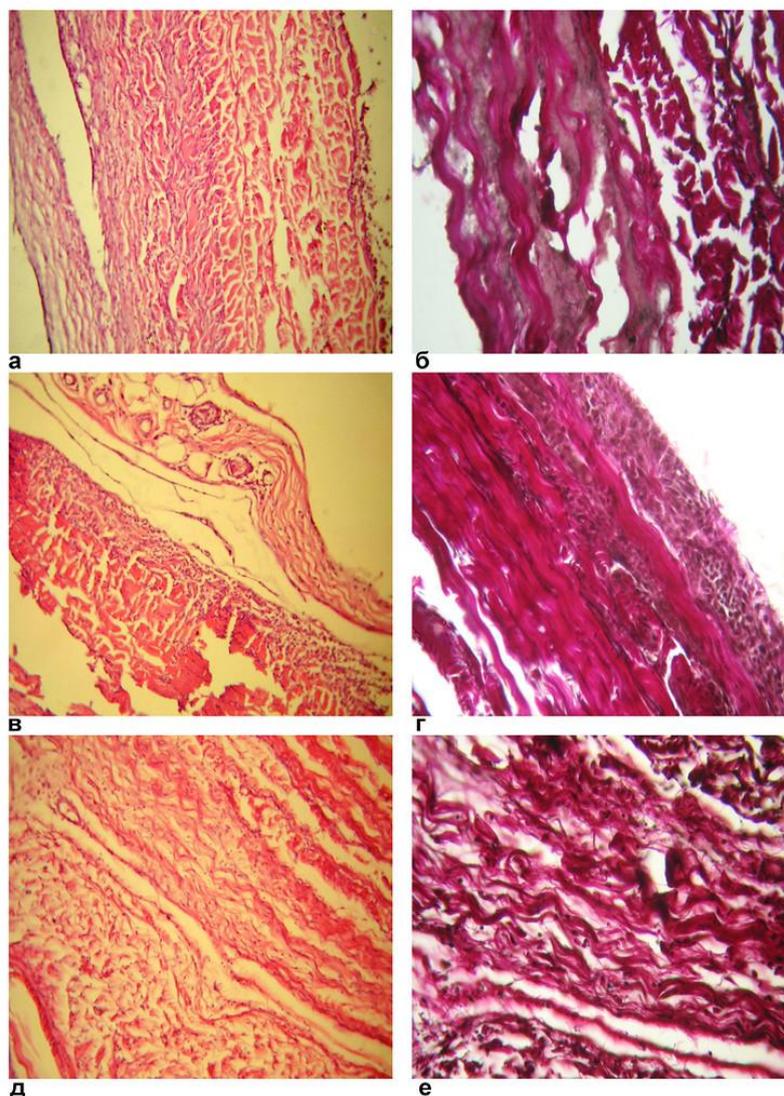


Рисунок 2. Ксеноперикард, обработанный стандартным методом, (а – 14-е сутки, окраска гематоксилином-эозином, х200, б – 14-е сутки, окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, х400; в – 30-е сутки, окраска гематоксилином-эозином, х200; г – 30-е сутки, окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, х400; д – 60-е сутки, окраска гематоксилином-эозином, х200; е – 60-е сутки, окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, х400)

2. Обработка ксеноперикарда модифицированным методом.

При гистологическом исследовании контрольных образцов ксеноперикарда, обработанных модифицированным методом, было выявлено, что при окраске гематоксилином-эозином клеточные элементы не выявлялись; при окраске по Вейгерту-Ван-Гизону состояние эластических волокон и коллагеновых волокон оставалось без изменений, но они имели более рыхлое пространственное расположение.

При гистологическом исследовании ксеноперикарда на 14-е сутки в образцах при окраске гематоксилином-эозином выявлялась умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация: в одном образце отмечались процессы инкапсуляции, в остальных образцах лейкоциты проникали на 1/3 от общей толщины пластины.

При анализе препаратов, окрашенных по Вейгерту-Ван-Гизону, отмечалось частичное разрушение коллагеновых и эластических волокон на всю глубину лимфогистиоцитарной инфильтрации, а в толще ксеноперикардальной пластины наблюдались коллагеновые и эластические волокна без изменений, что говорит о слабо активных процессах биодеградации исследуемого объекта.

К концу 1-го месяца эксперимента в тканевом ложе трансплантата отмечаются выраженные пролиферативные процессы. Материал трансплантата имел однородную структуру, по поверхности был инфильтрирован лимфоцитами и гистиоцитами. Трансплантат был окружен выраженным инфильтрационным валом. В составе клеточного инфильтрата выявлялись лимфоциты, гистиоциты, плазматические клетки, клетки фибробластического ряда. В области контакта собственных тканей с материалом имплантата преобладали лимфоциты и гистиоциты, по периферии грануляционного вала – пролиферирующие фибробласты и очаги новообразованного коллагена. В реактивной зоне вокруг ксеноперикарда выявлялись новообразованные кровеносные сосуды. При окраске по Вейгерту-Ван-Гизону были найдены формирующиеся собственные коллагеновые и эластические волокна.

Через 60 суток обнаруживались явления биодеградации материала на наружной его поверхности, было выявлено практически полное прорастание в пластину собственной соединительной ткани и новообразованных сосудов. Отмечалось значительное уменьшение количества лимфоцитов и макрофагов в воспалительном инфильтрате. Пролиферирующие фибробласты активно формировали соединительнотканый каркас вокруг трансплантата.

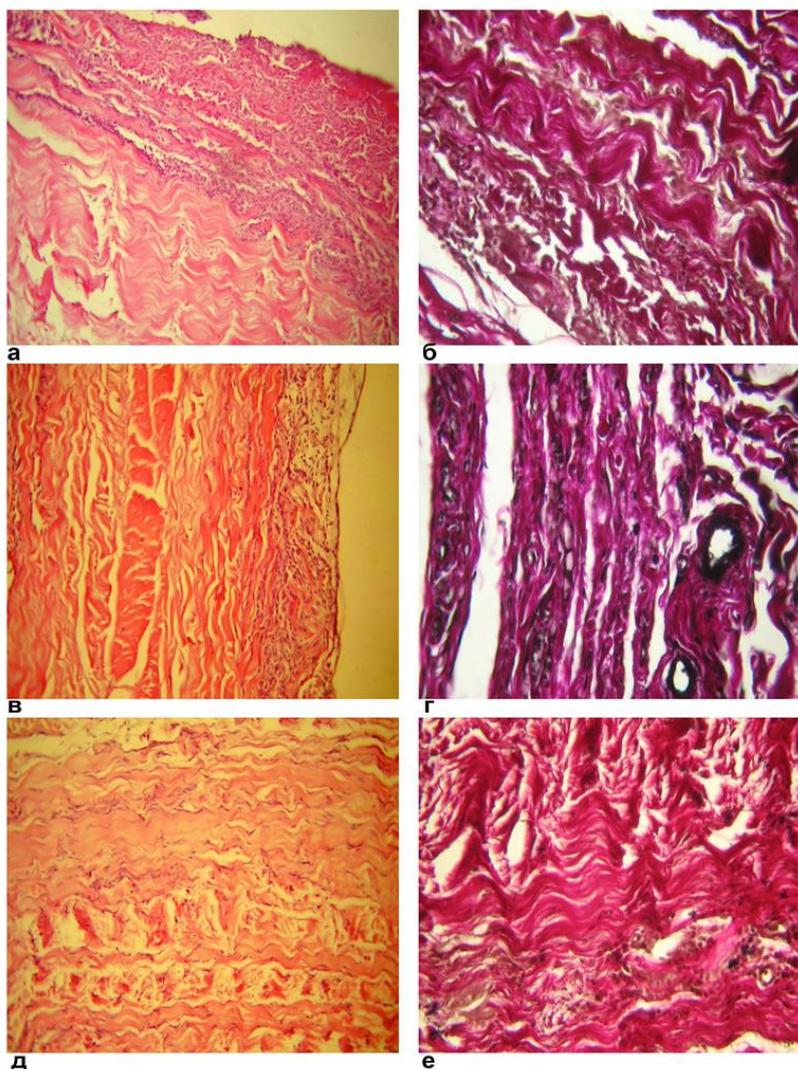


Рисунок 3. Ксеноперикард, обработанный модифицированным методом (а – 14-е сутки, окраска гематоксилином-эозином, $\times 200$; б – 14-е сутки, окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, $\times 400$; в – 30-е сутки, окраска гематоксилином-эозином, $\times 200$; г – 30-е сутки, окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, $\times 400$; д – 60-е сутки, окраска гематоксилином-эозином, $\times 200$; е – 60-е сутки, окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, $\times 400$)

При окраске по Вейгерту-Ван-Гизону выявлялось значительное количество собственных коллагеновых и эластических волокон. Выявленные тканевые изменения подтверждали наличие активного процесса биодеградации ксеноперикарда и интеграции в него собственной соединительной ткани с последующим замещением ксеноперикарда (рис. 3).

Обсуждение

Полученные в ходе проведенных экспериментальных исследований данные показывают, что ксеноперикардальная пластина, обработанная модифицированным методом, обладает более высоким модулем упругости, большей прочностью и меньшей растяжимостью, в отличие от материала, обработанного запатентованным химико-ферментативным методом, меньше деформируется. Повышение прочности и упругости, но снижение растяжимости образцов экспериментальной группы связано с обработкой глутаровым альдегидом в более высокой концентрации. В результате такой обработки происходит образование большего количества поперечных сшивок между коллагеновыми волокнами.

В связи с этим биодеградация и биоинтеграция в образцах, подвергшихся стандартной обработке, активно выявляются уже в конце первого месяца после имплантации, в отличие от ксеноперикарда, обработанного модифицированным способом, у которого данные процессы проявляются к концу второго месяца. Полученные данные подтверждают довольно высокую эффективность применения модифицированной ксеноперикардиальной пластины в реконструктивных операциях, когда необходимо длительное сохранение механической прочности трансплантата.

Заключение

Изучение деформативно-прочностных свойств и микроморфологии ксеноперикардиальной пластины на разных этапах эксперимента подтверждает, что модернизированный метод химико-ферментативной обработки ксеноперикарда позволяет создать биоматериал, обладающий лучшими упруго-эластическими характеристиками и характеризующийся более низкой скоростью биорезорбции и замещения собственной соединительной тканью реципиента. Результаты исследования позволяют предположить большую эффективность применения ксеноперикардиального имплантата, обработанного модифицированным методом, для восстановления соединительной ткани реципиента. Эти ксеноперикардиальные пластины могут применяться как

самостоятельный пластический материал для использования в реконструктивных операциях, требующих имплантаты с указанными свойствами, так и в качестве матрицы для нанесения стволовых клеток, используемых в генной инженерии.

Конфликт интересов

Работа выполнена в рамках приоритетного направления научно-исследовательской деятельности Пензенского государственного университета на 2011-2015 годы № 4 «Биомедицинский кластер».

Литература

1. Сравнительный анализ использования аутотрансплантата из связки надколенника и учетверенного сухожильного трансплантата *m. semitendinosus* и *m. gracilis* для пластики ПКС // VIII конгресс Российского артроскопического общества: программа и тезисы / Д.С. Афанасьев, А.В. Скорогляд, С.С. Копенкин, А.Б. Бут-Гусаим, А.В. Зинченко, В.Ю. Розаев. СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2009. С. 104.
2. Батпенев Н.Д., Баймагамбетов Ш.А., Раймагамбетов Е.К. Реконструкция передней крестообразной связки свободным ауто сухожилием связки надколенника // VIII конгресс Российского артроскопического общества: программа и тезисы. СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2009. С. 104.
3. Кузнецов И.А. Артроскопическая аутопластика передней крестообразной связки с использованием сухожилия полусухожильной мышцы // Сборник материалов зимнего Всероссийского симпозиума «Коленный и плечевой сустав – XXI век». М., 2000. С. 95-97.
4. Демичев Н.П. Сухожильная гомопластика в реконструктивной хирургии. Ростов-на-Дону: Изд-во Рост. ун-та, 1970. 102 с.
5. Кузнецов И.А., Волоховский Н.Н., Рябинин М.В. Применение аллотрансплантатов при артроскопической реконструкции ПКС коленного сустава // Сборник материалов 2-го конгресса РАО. М., 1997. С. 23.
6. Кузьмина Ю.О., Королев А.В., Дедов С.Ю. Анализ осложнений, возникающих после артроскопической пластики передней крестообразной связки аллотрансплантатом из связки надколенник // РУДН, ГKB № 31. М., 2004. С. 56.
7. Burri C. Grundlegendes Kniebandersatzesdurch Kohlenstoff // Unfallheilkunde. 1980. Bd. 83. S. 208–213.
8. Klein W. Die arthroskopis chevordere Kreuzbandplastikmit Semitendinosus chlinge, verstaerkt durch Kennedy-LAD // Arthroskopie. 1990. Bd. 3. S. 7-14.
9. Mironova S.S. Spaetresultate der Rekonstruktion des Bandapparates des Kniegelenkesmit Lawsan // Zbl. Chir. 1978. Bd. 103. S. 432–434.

Информация об авторах

О.В. Калмин – ФГБОУ ВПО Пензенский государственный университет Минобрнауки России, кафедра анатомии человека, заведующий кафедрой, доктор медицинских наук, профессор (**O.V. Kalmin** – Penza State University, Department of Human Anatomy, Head of the Department, Doctor of Medical Science, Professor);

А.А. Венедиктов – Общество с ограниченной ответственностью «Кардиоплант» (**A.A. Venediktov** – Limited Liability Company «Kardioplant»);

Д.В. Никишин – ФГБОУ ВПО Пензенский государственный университет Минобрнауки России, кафедра анатомии человека, доцент, кандидат медицинских наук (**D.V. Nikishin** – Penza State University, Department of Human Anatomy, Docent, Candidate of Medical Science);

Л.В. Живаева – Общество с ограниченной ответственностью «Кардиоплант» (**L.V. Zhivaeva** – Limited Liability Company «Kardioplant»).