

Получение перспективного материала для кардиохирургии из плавательного пузыря толстолобика

Аннотация

Большим спросом в медицине в настоящее время пользуются коллагеновые пластины и матрицы для регенерации тканей. На сегодняшний день известными и широко применяемыми в хирургии являются ксеноматериалы, т. е. материалы, полученные из тканей животных. Весьма перспективным в кардиохирургии в качестве пластин для сосудистых заплаток и створок искусственных биологических клапанов сердца может быть материал, полученный из стенок плавательного пузыря карповых рыб, обладающего коллагеновым составом очень высокого качества. Наиболее подходящей по габаритным, морфологическим, биологическим свойствам для изготовления имплантируемых медицинских пластин является стенка передней камеры плавательного пузыря белого толстолобика, широко распространенного и являющегося объектом аквакультуры нашей страны. В рассматриваемой работе продемонстрирован способ получения перспективного биосовместимого и эффективного в использовании материала для кардиохирургии из стенки плавательного пузыря белого толстолобика.

Введение

На сегодняшний день трансплантология и тканевая инженерия являются неотъемлемыми частями современной медицины. Спрос на трансплантируемые медицинские изделия в мире огромен и продолжает расти.

Имплантаты, вводимые вместо удаленных внутренних органов или их фрагментов, принято называть эндопротезами [1]. Все имплантируемые изделия принято условно классифицировать по происхождению. Они бывают искусственными и биологическими. В отличие от искусственных, биологические отличаются наличием естественной пространственной структуры, более близкой организму реципиента, чем искусственный аналог. Биологические материалы – это материалы, взятые от доноров. Они также подразделяются на аутогенные, т. е. взятые от собственного организма, но из иной области; аллогенными, полученными от одного и того же вида, обычно от трупов, и ксеногенными – это ткани животного происхождения. Аутогенные материалы считаются золотым стандартом в хирургии и имплантологии, поскольку они наиболее близки организму, их практически не требуется обрабатывать, однако получение их связано с большими проблемами. Требуется дополнительная операция по забору тканей, которая сопряжена с дополнительными травмами для пациента, а иногда просто нет возможности сделать забор его собственной ткани. Использование аллогенных и ксеногенных тканей для изготовления медицинских изделий сопряжено с риском отторжения вследствие иммунных реакций организма реципиента на организм донора, поскольку ткань получена от другого человека или другого вида, а также с риском передачи инфекционных заболеваний [2]. К тому же использование аллотканей связано с морально-этическим аспектом их получения. Ксеногенные материалы получить гораздо легче, их многообразие просто огромно. Огромный потенциал их применения в различных областях медицины, где требуются реконструктивное вмешательство и замещение дефекта ткани. Это стоматология, челюстно-лицевая хирургия, ортопедия, сердечно-сосудистая хирургия, урология и даже нейрохирургия [3].

Для любых использований в медицине любых материалов ксеногенного происхождения важным моментом является придание им биосовместимых свойств при сохранении прочностных характеристик. Это достигается подбором наиболее оптимальных режимов обработки, суть которой сводится к удалению собственных клеток – децеллюляризации и других биологических компонентов, способных вызывать иммунный ответ, а также стабилизации ткани в сшивающих агентах. Большинство способов получения тканевых биоимплантов из ксеногенных тканей основаны на продолжительной обработке различными детергентно-энзимными и консервирующими растворами (глутаровый альдегид, эпоксиэтиленгликоль), гипо- и гипертоническими растворами. Благодаря этим способам достигается продление их функциональной полноценности в постимплантационный период [4], [5].

В кардиохирургии большую популярность как материал для изготовления створок искусственных биологических клапанов сердца и сосудистых заплат приобрел ксеноперикард. Это обычно бычий или свиной перикард, прошедший комплекс специальных обработок. Данный материал хорошо себя зарекомендовал и находит все более широкое применение в кардиохирургии [6]-[9].

Однако на сегодняшний день существует серьезная проблема при использовании ксеноперикарда в кардиохирургии – это быстрая или медленная его кальцификация в организме донора. Эта проблема существует с момента создания самых первых моделей биопротезов, единая теория патогенеза минерализации ксеноткани отсутствует до настоящего времени. Анализ накопленного опыта позволяет сделать вывод, что среди факторов, влияющих на резистентность биопротезов к кальцификации, помимо особенностей обменных процессов в организме реципиента важную роль играют трансформации, происходящие в ксеноткани под влиянием консервирующего агента [10]. В решении этой проблемы могут использоваться как химические методы по поиску наиболее оптимальных способов его обработки и стабилизации, так и поиск альтернативных ксеноматериалов со сходными физико-механическими свойствами, но обладающими меньшей способностью кальцифицироваться в организме донора. При поиске нового материала для данных целей большую роль играет также доступность исходного сырья.

Ряд передовых зарубежных исследований на данную тему показывает огромный потенциал в использовании стенки передней камеры воздушного пузыря в качестве каркасов для сосудистых трансплантатов и биологических створок для искусственного клапана сердца (ИКС) [11]. А наилучшие результаты по биосовместимости и физико-механическим свойствам показал децеллюлированный и стабилизированный глутаровым альдегидом материал из белого толстолобика [12]. В этих работах в качестве преимущества данного материала заявляется его большая резистентность к кальцификации в организме донора по сравнению с другими материалами ксеногенного происхождения, в том числе перикарда. Это открывает окно для исследований стенки пузыря толстолобика с применением отработанных нами ранее методов обработки других видов биотканей с целью сохранения их для изготовления и использования в отечественной кардиохирургии в соответствии с требованиями к физико-механическим и биосовместимым свойствам материала. Группой наших ученых уже были исследованы физико-механические свойства стенки пузыря карповых рыб, обработанной по разработанному методу децеллюляризации и снижения антигенности без применения фиксации в глутаровом альдегиде в сравнении с образцами перикарда [13]. Результаты данного исследования были хоть и положительными, но весьма неоднозначными, скорее промежуточными, поскольку не отвечали всем условиям для разработки полностью удовлетворяющего всем требованиям материала для кардиохирургии, обладающего заодно явным преимуществом в резистентности к кальцификации.

В связи с этим дальнейшая разработка этого интересного материала видится весьма перспективной и требующей внимания.

Материалы и методы

В данной работе материалом исследования является передняя камера воздушного пузыря белого толстолобика. Пузыри извлекались из рыбы разной массы. Полученное сырье очищали от посторонних примесей, далее передние камеры пузырей отделяли от верхней оболочки, тщательно промывали в дистиллированной воде, разрезали по окружности таким образом, чтобы они были раскрыты. Вслед за этим для удаления остатков крови на поверхности передние камеры плавающих пузырей обрабатывали 7%-ным раствором NaCl в течение 48 ч. После промывки из равномерных по толщине участков, которые составляли приблизительно 70...80 % всей поверхности, вырезали круги. Измеряли диаметр вырезанных кругов в сантиметрах и толщину стенки в миллиметрах. На этой стадии было выяснено, что диаметры кругов рыб около 1 кг живого веса были менее 5 см, а толщина стенки составляла $0,1 \pm 0,02$ мм, у рыб весом 3 кг и более диаметр полезной площади был более 10 см, а толщина стенки пузыря составляла 0,5 мм и более. Так как установленным опытным путем критерием по толщине для изготовления пластин и заготовок для створок искусственного клапана является толщина стенки в среднем от 0,2 до 0,3 мм, а диаметр полезной площади не менее 6...8 см, то оптимальным для получения пригодного материала оказались рыбы весом от 1,5 до 3 кг. Данные замеры позволяют значительно снизить количество брака.

Далее проводились децеллюляризация и очистка от иммуногенных составляющих полученного материала по разработанной нами схеме комплексным химико-физическим методом, основанным на ранее испытанном методе на другом мягкотканном коллагеновом материале с подбором наиболее щадящего воздействия для сохранения физико-механических свойств изделия [14]. Стенки пузырей расправляли на пяльцах и помещали в реактор установки со сверхкритическим диоксидом углерода, где обрабатывали при $P = 180$ атм., $T = 35...45$ °C в течение 1 ч. По окончании обработки медленно сбрасывали давление, материал извлекали и помещали в раствор СДС 0,1 % на 48 ч, промывали дистиллированной водой и стабилизировали в 0,25%-ном растворе глутарового альдегида в течение суток. После этого материал выдерживали в буферном растворе Перес до стабилизации pH 7,5, а затем опять помещали в 0,25%-ный глутаровый альдегид для сохранения. В результате обработки был получен материал, из которого можно выкраивать как сосудистые заплатки, так и створки для искусственных биологических клапанов сердца (рис. 1).



Рис. 1. Стенка воздушного пузыря толстолобика после обработки

Полученный материал на данном этапе разработки исследовали на сохранение после обработки физико-механических свойств и качество извлечения клеточных составляющих.

Для исследования физико-механических свойств материала из стенок разных пузырей одной группы нарезали полосы толщиной 10 мм в количестве 30 шт. до обработки (контрольная группа) и 30 шт. после обработки (опытная группа). Измеряли толщину каждой полосы в 5 точках, определяя среднюю, а затем измеряли прочностные характеристики на разрывной машине «Instron 5900», закладывая исходные данные.

Для оценки качества децеллюляризации на образцах материала производили гистологическое исследование на наличие клеточных элементов. От пузырей с края и из середины вырезали кусочки 1 x 1 см в количестве 3 шт. до обработки и 3 шт. после. Образцы тканей фиксировали в нейтральном 7%-ном формалине, проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5...7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином, делали снимки.

Результаты и обсуждения

По физико-механическим свойствам были получены результаты, приведенные в табл. 1.

Таблица 1

Прочностные характеристики стенки пузыря

Группа образцов	Средняя толщина образцов, мм	Напряжение при растяжении с макс. нагрузкой, МПа	Максимальная нагрузка, Н
До обработки (нативный материал)	0,3	7,5	10,7
После обработки	0,35	4,8	8,7

Результаты анализа гистологических срезов стенки пузыря белого толстолобика представлены на рис. 2.

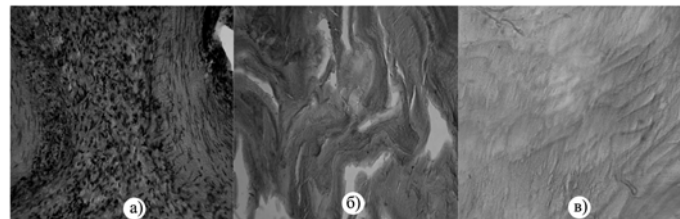


Рис. 2. Гистологический анализ стенки пузыря до и после обработки: а) пузырь до обработки; б) пузырь после СКФ-СО₂; в) пузырь после СДС (финиш)

Как мы можем видеть из полученных результатов, физико-механические свойства понижаются, однако незначительно и в пределах допустимых для изготовления изделий для кардиохирургии. По результатам гистологического анализа клетки после воздействия высокого давления сохранялись в меньшем количестве, однако имелись явные признаки нарушения их структуры. После обработки в щадящем режиме низкоконтентрированным раствором СДС (додецилсульфата) клетки полностью отсутствовали. В то же время структура коллагеновых волокон не была нарушена. Это говорит о том, что данная обработка позволяет осуществлять качественное удаление клеток как основных факторов иммуногенности, не повреждая коллагеновой структуры материала и сохраняя в допустимых пределах для применения в изделиях физико-механические свойства материала, получаемого из стенки воздушного пузыря белого толстолобика.

Выводы

На основании произведенных исследований можно сделать следующие выводы.

Материал имеет потенциал быть полностью биосовместимым с сохранением требуемых показателей прочности для использования в кардиохирургических изделиях.

Для рекомендации к использованию обработанной стенки воздушного пузыря толстолобика в качестве материала для изготовления пластин для кардиохирургии и створок искусственного биологического клапана сердца требуются исследования на биосовместимость *in vitro* и *in vivo*, а также оценка *in vivo* на кальцификацию в сравнении с другими видами подобных материалов.

Список литературы:

1. Штильман М.И. Биоматериалы – важное направление биомедицинских технологий // Вестник РГМУ. 2016. № 5. С. 4-15.
2. Кирилова И.А., Садовой М.А., Подорожная В.Т. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства // Хирургия позвоночника. 2012. № 3. С. 72-83.
3. Азарова О.А., Азарова Е.А., Харитонов Д.Ю., Подопригора А.В., Шевченко Л.В. Современные аспекты применения остеопластических материалов в хирургической стоматологии // Медицина. Фармация. 2019. Т. 42. № 2. С. 1-9.
4. Манченко А.А., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Морфология тканевой реакции у крыс при подкожной имплантации ксеноперикарда и створок аортального клапана свищи девитализированных криорадиоационным методом // Оригинальные исследования. 2016. Т. 4. № 1. С. 30-38.
5. Сергеевичев Д.С., Сергеевичева В.В., Субботовская А.И., Васильева М.Б., Докучаева А.А., Краськов А.М., Козлов В.А. Децеллюляризация как способ предотвращения иммунного ответа на аллогенные легочные клапаны сердца // Гены и клетки. 2013. Т. 8. № 4. С. 55-60.
6. Борисов И.А., Беткин А.Н., Савичев Д.Д. Биологические протезы клапанов сердца в современной кардиохирургии // Клиническая медицина. 2012. № 2. С. 4-5.
7. Базылев В.В., Немченко Е.В., Карнахин В.А., Коценок А.С. Применение ксеноперикардальной заплатки «Кардиоплант» при реконструкции корня аорты по методике nicks-nopez / В сб. труд.: Инновационные импланты в хирургии Ч. 3. – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2014. С. 84-90.

8. Базылев В.В. Ксеноперикардальная заплатка в протезировании клапана аорты // Кардиология сегодня. 2014. № 3 (9).
9. Россейкин Е.В., Базылев В.В., Венедиктов А.А., Евдокимов А.С., Евдокимов С.В. Аортальный бескаркасный гибкий протез клапана сердца / Патент РФ № 2473321. 2013.
10. Барбараш Л.С., Одаренко Ю.Н., Кокорин С.Г., Нохрин А.В., Рутковская Н.В., Борисов В.В., Журавлева И.Ю. Отдаленные результаты применения обработанных эпоксиодинением ксенобиопротезов в хирургии атриовентрикулярных пороков у лиц молодого возраста // Kardiol. Serdecno-Sosud. Hig. 2012. № 2. С. 77-81.
11. Hualong Bai, Peng Sun, Haoliang Wu, Shunbo Wei, Boao Xie, Wang Wang, Yachen Hou, Jing'an Li, Alan Dardik, Zhuo Li Small The application of tissue-engineered fish swim bladder vascular graft // Communications Biology. 2021. № 4. P. 1153.
12. Binhan Li, Huimin Jing, Zhiting Sun, Xiaoxiao Wang, Deling Kong, Jing Liu, Xigang Leng, Zhihong Wang Comprehensive analyses and prioritization of various swim bladder-derived extracellular matrix in the application of heart valve prosthesis // Smart Materials in Medicine. 2021. № 2. PP. 209-218.
13. Никушин Д.В., Калмин О.В., Баулин А.В. и др. Оценка возможности применения плавательного пузыря пресноводных рыб в качестве биоимплантата // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2016. Т. 6. № 3. С. 90-95.
14. Гурин М.В., Венедиктов А.А. Оценка метода децеллюляризации говяжьего сухожилия при разработке протеза крестообразной связки // Трансплантология. 2020. № 12 (4). С. 286-294.

Максим Вячеславович Гурин,
инженер-исследователь,
Алексей Александрович Венедиктов,
канд. биол. наук, управляющий,
ООО «Кардиоплант»,
г. Пенза,
e-mail: gmv7981@mail.ru

В.Г. Самодай, А.О. Стариков, В.А. Ермолаев

Биохимические особенности ортобиологической методики стимуляции остеогенетического процесса с использованием аллогенных лиофилизированных тромбоцитарных факторов роста

Аннотация

Патологии в регенеративном процессе стали неотъемлемой частью практики современного врача. Повышение технического уровня производств, увеличение энергии травмы, усложнение ее структуры, ухудшение экологии, нарушение обменных процессов в организме – основные факторы «эволюции» регенерации. По последним данным, в 40...50 % случаев заживление переломов происходит с осложнением, в виде замедленной консолидации и с образованием псевдоартрозов. На базе ВГМУ им. Н.Н. Бурденко была разработана методика стимуляции регенеративного процесса при переломах костей с использованием комплекса аллогенных лиофилизированных тромбоцитарных факторов роста. По последним результатам можно сделать вывод, что лиофилизированные тромбоцитарные факторы роста, полученные из аллогенной крови, способны стимулировать репаративный остеогенез. Препарат может быть использован у пациентов с тяжелой сочетанной травмой и ослабленных соматической патологией. Кроме того, проведенный нами эксперимент не выявил каких-либо «возмущений» иммунной системы в экспериментальной группе животных. Настоящая статья рассматривает результаты биохимического исследования консолидации переломов.

Введение

В мировой практике проблема сращения переломов остается актуальной из года в год. Технический прогресс делает жизнь человека не только удобней, но и приносит свой негатив. Увеличивающаяся энергия травмы приводит к неспособности организма восстановить утраченные свойства структур-

ных элементов опорно-двигательного аппарата. Самые тяжелые травмы чаще всего возникают в результате дорожно-транспортных происшествий (ДТП), на производстве и во время боевых действий. Улучшающаяся активная и пассивная безопасность современных автомобилей помогает сохранять жизни пострадавшим. В связи с этим структура травм расширяется, а тяжесть повреждений увеличивается. По официальным