

СТРУКТУРАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КСЕНОПЕРИКАРДА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДА ОБРАБОТКИ (ЭКСПЕРИМЕНТ *IN VIVO* С ПОСЛЕДУЮЩИМ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЕМ)

В.Н. Храпунов, В. П.Захарова, А.А. Пищурин, А.Г. Горячев,
Р.Р.Сейдаметов, М.А. Татунь, Д.А.Осин, А.Ю.Ткаченко-Ткалич

Национальный институт сердечно-сосудистой хирургии
им. Н.М. Амосова АМН Украины (Киев)

Национальный технический университет Украины
«Киевский политехнический институт» (Киев)

Неудовлетворенность длительными результатами функционирования биологических протезов, изготовленных из ксеноперикарда, обработанного глютаровым альдегидом (ГА) 0,625% (кальцинирование, спонтанная дегенерация), привело к необходимости разработки новых методов консервирования ксеноперикарда. Нами предложен метод поэтапной обработки материала раствором этанола в возрастающих концентрациях (20%, 40%, 60%) с последующей консервацией ксеноперикарда в 0,625% растворе ГА. В результате экспериментальной работы – имплантация образцов перикарда, обработанного обоими методами – лабораторным крысам сроком на полгода и последующее патоморфологическое их исследование показали отсутствие выраженных структурных изменений в перикарде, обработанного по предложенной нами методике. Подобная обработка позволяет увеличивать срок функционирования биоматериала в полтора – два раза по сравнению с материалом, обработанным по стандартной методике.

Ключевые слова: ксеноперикард, этанол, глютаровый альдегид, кальцификация.

Биологические материалы (ксеноперикард, ксеноаортальные биопротезы и пр.) получили достаточно широкое распространение в кардиохирургии. Сдерживающим фактором к более широкому их применению служит относительная недолговечность их функционирования, связанная со структурной перестройкой – кальцификацией, спонтанной дегенерацией и др. Кальцификация биологических материалов происходит в основном с образованием гидроксиапатитов, связанным с наличием в биологических тканях фосфолипидов, холестерина клеточных мембран, а также протеогликанов [2]. Общепринятым методом консервации биологических материалов является обработка их 0,625 % раствором глутарового альдегида (ГА), при этом материал сохраняет свои прочностные и эластические качества, стерилизуется, а также подвергается структурной перестройке в виде образования полимерных «сшивок» коллаген-эластинового каркаса [1]. Этот метод не позволяет удалить фосфолипиды, холестерол и протеогликаны, являющиеся центрами нуклеации образования гидроксиапатитов. Нами предложен метод поэтапной обработки этанолом в восходящих концентрациях, с последующей консервацией материала в 0,625 % растворе ГА.

Цель. С целью объективизации изложенных положений проведена экспериментальное исследование *in vivo* ксеноперикарда, обработанного по обеим методикам с последующим патоморфологическим исследованием образцов.

Материал и методы. Телячий перикард забирался непосредственно при забое животных, прошедших соответствующий санитарный контроль, помещался в стерильный физиологический раствор и доставлялся в лабораторию, где происходила его дальнейшая механическая очистка: удаления остатков жировой клетчатки, обрывков сосудов, соединительной ткани и пр., после чего материал промывался большим количеством физиологического раствора для удаления крови и водорастворимых белков. В дальнейшем ксеноперикард помещался в заполненный фосфатным буфером (рН 7,4) 20 % раствор этанола и в течении суток выдерживался в холодильнике при температуре 3-4 градуса Цельсия. В последующем материал перекладывали в сосуды с этанолом с возрастающей

концентрацией (сутки 40%, сутки 60%). Через трое суток после забора материала он помещался в 0,625% раствор ГА, заполненный тем же фосфатом (рН 7,4), сроком минимум на две недели и с последующим хранением в этом растворе.

Для получения объективных результатов и понимания процессов взаимодействия указанного материала с живыми организмами было проведено экспериментальное исследование на животных. Использовались белые лабораторные крысы, весом 350-400 г, возрастом 4-5 мес. В условиях операционной произведен эксперимент: под наркозом 10 крысам слева и справа от позвоночника были имплантированы по 2 имплантата из ксеноперикарда размерами 10x10x0,25мм. Имплантаты фиксировались в п/к жировой клетчатке (надфасциально), при чем один имплантат обработан традиционным методом (ГА), а другой обработан по предложенной нами методике. Образцы были одинаковых размеров 10 x 10 x 0,25 мм; локализация имплантатов слева и справа от позвоночника на спине животного. Такая схема эксперимента позволяла получить достаточно объективные данные о состоянии чужеродной ткани, обработанной различными методами в условиях одного и того же основного обмена.

Через 6 месяцев, что коррелируется с 20-25 годами человеческой жизни, произведен забой лабораторных животных и извлечение фрагментов ксеноперикарда. Всего получено 20 образцов, из них 2 выведены из эксперимента из-за нагноения, вызванного внешними причинами. Материал в течении 2 суток фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, а затем по стандартной методике из него изготавливали парафиновые срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, фуксилином по Вейгерту, а также по методу MSB. Многообразие использованных методов обусловлено необходимостью дифференцированного изучения коллагена, эластических волокон, клеточных и ядерных элементов, фибрина и пр. Количество исследованных образцов 32.

Результаты и обсуждение. Визуально образцы, обработанные ГА, представляли собой желтоватого цвета пластинки, расположенные в фиброзной капсуле, элементы которой представляли собой измененные окружающие ткани. На

ощупь образцы были плотные, но сохранявшие эластичность. Образцы же, обработанные по предложенной методике, представляли собой беловатые пластинки, с чуть желтоватым оттенком, свободно лежащие в надфасциальном пространстве. На ощупь мягкие, эластичные, без фиброзной капсулы.

При микроскопическом исследовании образцов, обработанных ГА обнаружено, что наружная поверхность перикарда была выстлана слоем рыхлой соединительной ткани, под которой определялись более компактные коллагеновые волокна с нарушенными тинкториальными свойствами: при окраске гемотоксилином и эозином они приобретали коричневый цвет, а при обработке пикрофуксином по ван Гизону-желтоватый. В толще перикарда обнаруживались признаки кальциноза. В некоторых зонах на фоне отека и умеренной диффузной лейкоцитарной инфильтрации определялись облаковидные зоны соединительной ткани, находящиеся на ранней стадии кальциноза. В других препаратах кальцинаты имели вид компактных осумкованных пластинчатых депозитов. В наружном слое исследуемых образцов присутствовали очаги жировой клетчатки с инфильтрацией по периферии клетками лимфоидного ряда. Снаружи дифференцировался один слой мезотелиоцитов с вытянутыми ядрами. Ксеноперикард в этой группе наблюдений был окружен обрывками коллагеновых волокон, которые, являлись фрагментами капсулы реципиента.

При исследовании образцов, обработанных последовательно спиртом и ГА, при окраске гемотоксилином и эозином в периферических слоях определялись кое-где сохраненные ядра фибробластов и единичные лимфоциты. Центральные слои перикарда в этих зонах были лишены ядер и кое-где – гомогенизированы. Отмечалась фрагментация коллагеновых волокон с несколько расширенными пространствами между ними, что связано с экстракцией протеогликанов в процессе обработки. Эластические волокна при окраске фуксилином по Вейгерту не имели четких контуров. Ни в одном из исследованных препаратов признаков кальциноза не выявлено.

Результат эксперимента на животных показал хорошую приживаемость

биологического материала, о чем говорит хорошее состояние животных на протяжении всего времени эксперимента. Два случая нагноения мы не относим к общей реакции на материал как таковой, а расцениваем как результат привнесенной во время эксперимента инфекцией. Сохранность образцов биологической ткани была хорошая на протяжении всего времени эксперимента, однако в группе образцов, обработанных по предложенной методике, мы не определили ни одного случая кальцификации образцов в отличие от контрольной группы образцов, обработанных по стандартной методике (ГА). Эти данные соответствуют многочисленным сообщениям об экспериментальном и клиническом применении данных биоматериалов [3,4]. Предложенная нами обработка ксеноперикарда позволяет рассчитывать на длительное функционирование объектов, приготовленных из данного биоматериала без- или сведенных к минимуму структурных изменений. Чаще всего сроки функционирования биологических протезов определяются 12-16 годами [1]. В случае применения биологических протезов из ткани, обработанной по предлагаемой нами методике, мы можем рассчитывать на 20-25 летний срок функционирования. К тому же, мы не исключаем возможность применения доступного и дешевого пластического материала в различных отраслях медицины, требующих пластических операций: в общей хирургии, легочной хирургии, хирургии лор заболеваний и пр.

Выводы

1. Предлагаемый метод обработки биологического материала (ксеноперикарда) показал его биологическую инертность.
2. Использование предложенной методики обработки ксеноперикарда позволяет избежать наиболее отрицательного осложнения – кальциноза биоматериала в организме реципиента.
3. Полученные данные о длительном сохранении в организме животного ксеноперикарда, обработанного по предложенной методике, позволяют рекомендовать его для более широкого использования в пластической хирургии в целом.

Литература

1. Фурсов Б.А., Быкова В.А – «Биопротезирование клапанов сердца», авт. дисертація, М., 1984.
2. Farzaneh-Far A. Vascular and valvar calcification: recent advances / Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, Weissberg PL. // Heart. – 2001. – V. 85. – P. 13-7.
3. Thandroyen F. Severe calcification of glutaraldehyde-preserved porcine xenografts in children / Thandroyen F., Whitton I., Pirie D. // Amer. J. Cardiol. – 1980. – Vol.45, №2. – P.690-696.
4. Turina J., Turina M. Cardiac bioprosthesis in 1990s. / Turina J., Turina M. // Circulation. – 1993. - P. 775-81.

СТРУКТУРАЛЬНІ ЗМІНИ КСЕНОПЕРИКАРДА ЗАЛЕЖНО ВІД МЕТОДУ ЙОГО ОБРОБКИ (ЕКСПЕРИМЕНТ *IN VIVO* С НАСТУПНИМ ПАТОМОРФОЛОГІЧНИМ ДОСЛІДЖЕННЯМ)

**В.М. Храпунов, В. П.Захарова, О.А. Піщурін, А.Г. Горячев,
Р.Р.Сейдаметов, М.О. Татунь, Д.О.Осин, О.Ю.Ткаченко-Ткаліч**

Невдоволеність тривалими результатами функціонування біологічних протезів, виготовлених із ксеноперикарда, обробленого 0,625% глутаровим альдегідом (ГА) (кальцинування, спонтанна дегенерація), привело до необхідності розробки нових методів консервування ксеноперикарда. Нами запропонований метод поетапної обробки матеріалу розчином етанолу у зростаючих концентраціях (20%, 40%, 60%) з наступною консервацією ксеноперикарда в 0,625% розчині ГА. У результаті експериментальної роботи – імплантація зразків перикарда, обробленого обома методами – лабораторним пацюкам строком на півроку й наступне патоморфологічне їхнє дослідження показали відсутність виражених структурних змін у перикарді, обробленого по запропонованій нами методиці. Подібна обробка дозволяє збільшувати строк функціонування біоматеріала в півтора – два рази в порівнянні з матеріалом, обробленим за стандартною методикою.

Ключеві слова: ксеноперикард, етанол, глутаровий альдегід, кальцифікація.

**STRUCTURAL CHANGES OF XENOPERICARDIUM SUBJECT
TO TREATMENT METHOD (*IN VIVO* EXPERIMENT
WITH SUBSEQUENT PATHOMORPHOLOGICAL STUDY)**

**V.N. Khrapunov, V.P. Zakharova, A.A. Pishchurin, A.G. Goryachev, R.R.
Seydametov, M.A. Tatun, D.A. Osin, A.Y. Tkachenko-Tkalitch**

Dissatisfaction with the elongated results of biological prostheses functioning made of xenopericardium treated with gluteraldehyde (GA) 0.625% (calcination, spontaneous degeneration), has generated the need to develop new methods of preserving xenopericardium. We have proposed a phased method of processing the material with ethanol solution at increasing concentrations (20%, 40%, 60%), with a subsequent preservation of xenopericardium at 0,625%. As a result of experimental work – implantation of pericardium samples treated using both methods – on laboratory rats for a period of six months and their subsequent pathomorphological study have shown the absence of pronounced structural changes in the pericardium processed using our method. Such treatment allows to increase the term of functioning of the biomaterial by one and a half – two times compared to the material processed using standard methods.

Key words: xenopericardium, ethanol, GA, calcification.