На правах рукописи

СИВЦЕВ
Василий Степанович

Моделирование послеоперационного перикардита и оценка эффективности биодеградируемых пленок на основе желатина с колхицином для профилактики спаечного процесса (экспериментальное исследование)

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
академик РАН Бокерия Л.А.

Москва - 2014

Актуальность темы

Послеоперационные спайки остаются одной из важных проблем современной хирургии. Формирование спаек после первичного хирургического вмешательства на открытом сердце – это реакция организма на посттравматическое воспаление листков перикарда. Наличие грубых спаек весьма осложняет задачу хирурга и повышает риск повторных операций. По данным ряда авторов частота повторных операций в кардиохирургии колеблется от 5 до 17% от общего количества операций на сердце [Cohn L. H et al. 1993, Goodwin A. et al. 2003, Ghoreishi M. et al. 2013]. Причинами повторных операций во взрослой кардиохирургии являются осложнения или неадекватно выполненные первичные операции [Sabiston D. 1986, Цукерман Г.И. с соавт. 1993, Бокерия Л.А. с соавт. 2009, Maciejewski M. et al. 2011]. В детской кардиохирургии часто выполняются плановые отсроченные операции при сложных врожденных пороках сердца, требующие этапного подхода [Elahi M.M et al. 2005, Бокерия Г.Д. 2007]. Иногда наличие послеоперационных спаек в отдаленные сроки может повлиять на гемодинамику и требует коррекции путем частичной или полной перикардэктомии [Malm T. et al., 1992, Nkere U.U. et al., 1993]. Основные проблемы, с которыми сталкивается хирург на повторной операции, связаны со сложным доступом, риском массивного кровотечения, визуальным изменением анатомии, повышенной опасностью травмирования во время кардиолиза магистральных сосудов, сердца или сформированных аортокоронарных шунтов. Летальность после повторных операций на сердце по данным исследователей увеличивается в два-три раза и составляет 9-15% [Christenson J.T. et al. 1997, Launcelott S. et al. 2012].

Несмотря на многочисленные исследования, в настоящее время ни для одного средства пока не доказана однозначно высокая эффективность в

предупреждении образования спаек. Данные зарубежной литературы последних лет показывают, что наибольший противоспаечный эффект может обеспечить применение биорезорбируемых «барьерных» средств, препятствующих сближению и склеиванию травмированных серозных поверхностей [Bicer M. et al. 2008, Haensig M. et al. 2011, Bel A. et al. 2012, Kaneko Y. et al. 2012]. В течение уже многих лет интерес исследователей всего мира не ослабевает к биорезорбируемому полимеру природного происхождения – желатину, который находит широкое применение в разных отраслях народного хозяйства, в т.ч. и в медицине [Bozzini S. et al. 2009, Новикова С.П. с соавт. 2011, Tsujimoto H. et al. 2013]. Желатин имеет высокую сорбционную емкость по отношению к лекарственным веществам, в результате чего этот полимер может служить хорошей матрицей для лекарственных препаратов [Kuijpers A.J et al. 2000, Новикова С.П. с соавт. 2012].

В последнее время появились данные, что в качестве лекарственного средства для профилактики постперикардиотомного синдрома может применяться алкалоид растительного происхождения, производный трополона – колхицин, который является мощным противовоспалительным препаратом с мультифасеточным дозозависимым эффектом [Алекберова З.С. соавт. 2010, Robille F. et al. 2013]. Классическими показаниями к применению колхицина являются: подагра, болезнь Бехчета, семейная средиземноморская лихорадка. Колхицин предупреждает дегрануляцию нейтрофилов, частично, либо полностью ингибирует деление клеток в стадии метафазы и анафазы, имеет антимитотическое воздействие. Основные формы применения колхицина: перорально, парентерально и внутривенно, но от внутривенного способа применения в связи с серьезными побочными эффектами отказались [Little A. et al. 2014].

Наиболее эффективным способом локальной доставки колхицина может быть его выделение из пленочных композиций пролонгировано, малыми дозами. Такие работы еще не проводились.

Цель работы. Оценить эффективность биодеградируемых пленок на основе желатина с колхицином для профилактики спаечного процесса на модели послеоперационного перикардита.

Задачи

1. Разработать адекватную экспериментальную модель послеоперационного перикардита для изучения морфологии и морфогенеза возникающей воспалительной реакции и спаечного процесса.

2. Оценить эффективность полимерной биодеградируемой пленочной композиции на основе желатина в профилактике развития спаечного процесса в эксперименте.

3. Оценить роль колхицина в качестве модифицирующего компонента биодеградируемой пленочной композиции на основе желатина.

4. Исследовать полимерные биодеградируемые пленочные композиции на основе желатина с разным количеством колхицина.

Научная новизна

Впервые на кроликах создана экспериментальная модель послеоперационного перикардита с применением комплекса агрессивных факторов, запускающих каскад реакций с развитием спаечного процесса.

Изучены биодеградируемые пленочные композиции на основе природного белка – желатина, которые можно применить в качестве биофизического барьера для профилактики спаечного процесса в полости перикарда. Впервые выполнена иммобилизация колхицина в пленочную композицию на основе желатина, что позволило найти новый способ его доставки непосредственно в очаг воспаления, это снижает токсичность колхицина за счет выделения препарата пролонгировано в малых дозах.

В эксперименте показано снижение формирования спаек в полости перикарда после комплексного воздействия на серозные поверхности при использовании в качестве профилактики барьерной биодеградируемой

пленочной композиции на основе желатина.

В эксперименте показано, что биодеградируемые желатиновые пленочные композиции с иммобилизованным колхицином подавляют воспалительную реакцию в полости перикарда.

Положения выносимые на защиту

1. Для создания адекватной модели послеоперационного перикардита с развитием воспалительной реакции и спаечного процесса у кроликов необходимо комплексное воздействие на серозные поверхности листков перикарда.

2. Биодеградируемая желатиновая пленочная композиция проявляет достаточные барьерные свойства для предупреждения развития спаечного процесса в полости перикарда и может использоваться в адресной доставке лекарственных средств

3. Колхицин в составе биодеградируемой пленочной композиции на основе желатина способен подавлять воспалительную реакцию.

4. Решающим фактором является не столько масса колхицина в исследованных дозах, сколько фактор пролонгированности его выделения в малых дозах.

Практическая значимость

В результате проведенного исследования разработана экспериментальная модель послеопарциионного перикардита с развитием воспалительной реакции и спаечного процесса вследствие воздействия комплекса интраоперационных агрессивных факторов, которая внедрена в Лаборатории моделирования и изучения патологии сердца и сосудов экспериментального отдела НЦССХ им. А.Н. Бакулева. Целесообразно применение биодеградируемой пленочной композиции на основе желатина с иммобилизованным колхицином в профилактике послеоперационного спаечного перикардита, как биофизического барьера между скомпрометированными серозными поверхностями. Установлено, что противовоспалительный эффект может обеспечиваться малыми дозами

иммобилизованного в пленочную композицию колхицина и его пролонгированным адресным выделением.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 статьи в центральных рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на I всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков. Инновационные технологии в медицине XXI века. Москва, 6-7 декабря, 2012 г.; XVIII ежегодной сессии Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН с Всероссийской конференцией молодых ученых. Москва, 18-20 мая, 2014 г.; XX Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов. Москва, 23-26 ноября, 2014 г.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста, состоит из введения, пяти глав, содержащих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных иследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа содержит 2 таблицы, 8 диаграмм и 44 рисунка. Указатель литературы включает 40 отечественных и 251 зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изготовление пленочных материалов на основе желатина

Пленочные композиции были изготовлены в Лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии НЦССХ им. А.Н. Бакулева. Для получения композиций использовали высокомолекулярный природный полимер желатин (Ж) – гранулированный, марка К-13, ГОСТ 11293-89 «Желатин. Технические условия», производство ОАО «Можелит», г. Могилев, получен по «щелочному» способу.

Композиции получали в виде пленок методом полива из водного

раствора желатина - концентрация 5%. Раствор отливали на полипропиленовую подложку, сушили при комнатной температуре 36-72 ч. Для приготовления раствора использовали деионизированную воду. pH получаемых растворов 5,2-6,2. В качестве лекарственного противовоспалительного препарата использовали алкалоид – колхицин (КХЦ). Препарат вводили в различных количествах в объем рабочего раствора желатина (0,7; 1,3; 2,0; 4,5; 7,0 мг КХЦ / г Ж).

Для физико-химических, экспериментальных исследований использовали пленки размером 1 $см^2$, 2 $см^2$, 4 $см^2$, 6 $см^2$, толщиной 100 мкм, весом 0,01; 0,02; 0,05; 0,07 г с количеством колхицина 0,05 мг; 0,09 мг; 0,14 мг; 0,32 мг; 0,5 мг или 8,3 мкг/$см^2$, 15 мкг/$см^2$, 23 мкг/$см^2$, 53 мкг/$см^2$, 83 мкг/$см^2$.

В качестве пластификатора использовали глицерин в соотношении полимер:глицерин = 1:(0,6÷0,4).

Композиции структурировали сшивающим агентом - глутаровым альдегидом (ГА), производство Panreac, Испания. ГА вводили в объем материала - соотношение по массе полимер:ГА = 50:1.

Стерилизация пленочных композиций проводилась окисью этилена. Контроль стерильности осуществлялся методом прямой инокуляции в жидкие питательные среды (среда контроля стерильности, среда Сабуро), а также путем инкубации подготовленного диспергированного материала с применением лабораторного миксера в среде контроля стерильности. Стерилизации подвергались пленки различной толщины от 20 до 200 мкм. При исследовании образцов роста микроорганизмов, включая споровые формы, не выявлено. Все исследованные материалы были стерильны.

Были проведены физико-химические, физико-механические исследования композиций:

- выделение колхицина из композиций оценивали спектрофотометрически на спектрофотометре Shimadzu UV-1240;
- сроки гидролитической деструкции оценивали по изменению веса

при выдерживании образцов в физиологическом растворе pH=3 при температуре 37°C до растворения образцов;

- прочность, относительное удлинение (эластичность) при разрыве определяли в условиях одноосного растяжения при температуре 25°C и скорости испытания 10 мм/мин на универсальной разрывной машине Zwick/Roell BZ2.5/TN1S;

- влияние стерилизации (окись этилена) на основные характеристики композиций.

Статистическая обработка результатов исследований заключалась в оценке достоверности (надежности, значимости) результатов путем определения доверительных интервалов ($X = \overline{X} \pm \Delta X_{дов}$), для чего вычисляли среднее арифметическое значение параметра ($\overline{X}$), среднеквадратичную ошибку среднего ($\sigma_{ср}$), параметр Стьюдента при заданной достоверности (P).

Экспериментальная часть

Экспериментальное исследование на животных было проведено в лаборатории моделирования и изучения патологии сердца и сосудов экспериментального отдела НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН.

Моделирование и профилактика послеоперационного спаечного перикардита было выполнено на 75 кроликах разного пола весом от 3 до 4 кг. Во всех группах проведено одинаковое моделирование постперикардиотомного перикардита с воздействием комплекса агрессивных факторов. Для эксперимента животные были разделены на 5 групп: группа №1 – контрольная группа без применения бырьерных пленочных композиций; группа №2 – группа с применением барьерной желатиновой пленочной композиции; группа №3 – группа с применением барьерной желатиновой пленочной композиции с иммобилизованным колхицином в дозе 8,3 мкг/см^2; группа №4 – группа с применением барьерной желатиновой пленочной композиции с иммобилизованным колхицином в дозе 23 мкг/см^2; группа №5 – группа с применением барьерной желатиновой пленочной

композиции с иммобилизованным колхицином в дозе 83 мкг/см^2.

Все операции проводили в условиях искусственной вентиляции легких при помощи аппарата ИД-РО-9 в режиме нормальной вентиляции с возможностью динамического (по давлению выдоха) изменения дыхательного объёма 18-20 мл/кг/мин и частоты дыхания 16-22 в мин, с подачей кислорода во вдыхаемую смесь до 100%. Для интубации трахеи использовали трубку №2,5/3,0. Миорелаксация и углубление наркоза для проведения основного этапа операции осуществляли внутривенным введением растворов пропофола 10 мг/кг, золетила-100 7,5 мг/кг и ксиланита 5 мг/кг. Операции проводили в условиях нормотермии.

Животное укладывали на правый бок. После предварительного бритья проводили обработку операционного поля по всем правилам асептики и антисептики. Доступ к сердцу осуществляли через боковую торакотомию слева по 4-5-му межреберью. Защиту левого легкого выполняли обложением марлевыми тампонами, смоченными в 0,9% физиологическом растворе. После вскрытия полости перикарда на 0,5 см выше n.phrenicus выполняли моделирование спаечного перикардита. Стандартный спаечный процесс вызывали с помощью комплекса агрессивных интраоперационных факторов, воздействующих на серозные оболочки сердца при кардиохирургическом вмешательстве: механическая травма, подсушивание, введение в полость перикарда частиц талька и хлопковых волокон, наложение шва на париетальный листок. Рану оставляли открытой в течении 20 минут, за это время дополнительно для подсушивания и механической травмы поверхность эпикарда протирали с умеренным усилием 5 раз сухим марлевым тампоном.

В исследуемых группах в полость перикарда помещали различные биодеградируемые желатиновые пленочные композиции с иммобилизованным колхицином. Перед имплантацией в полость перикарда пленки смачивали в стерильном физиологическом растворе (рисунок 1). При имплантации влажная пленочная композиция имеет свойства легкого и

быстрого прилипания к серозным поверхностям, создавая биофизический барьер между скомпрометированными поверхностями. В силу неустойчивости к проколу и прошиванию пленочную композицию не фиксировали к тканям. Операцию заканчивали наложением на париетальный листок узлового шва из пролена 6/0 и послойным ушиванием кожного разреза. Профилактику пневмоторакса проводили эвакуацией оставшегося воздуха на выдохе из плевральной полости серым катетером (браунюля) размером 16G. Оценка результатов проводилась на 3 сутки, 7 сутки и 30 сутки. Для профилактики инфекционных осложнений в течение трех дней после вмешательства внутримышечно вводился цефазолин в дозе 100 мг/кг.

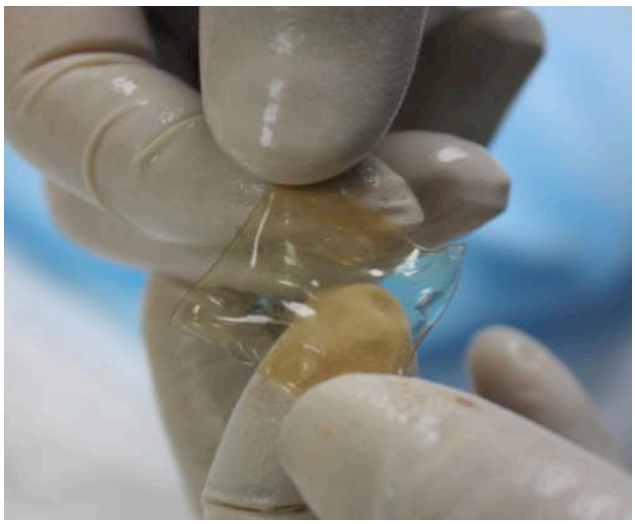

Рис. 1. Стерильная пленочная композиция после смачивания в физиологическом растворе

Морфологические методы

Патолого-гистологические исследования микропрепаратов выполнены в Отделе патологоческой анатомии НЦССХ им. А.Н. Бакулева. Оценка результатов проводилась на 3 сутки, 7 сутки и 30 сутки. Из сформированных групп на каждом сроке наблюдения из эксперимента выводили по 5 кроликов. Для чистоты эксперимента в результатах не учитывались кролики, имевшие осложненные послеоперационные раны и погибшие по причине неадекватного наркоза, инфекции, острой сердечно-дыхательной недостаточности.

По истечению срока наблюдения сердце с перикардом и окружающими

тканями осторожно выделяли и извлекали для макро- и микроскопического исследования. Сердца в месте воздействия разрезали поперечно через стенки левого желудочка, межжелудочковую перегородку и правого желудочка. Препараты готовили единым блоком, включающим миокард ЛЖ, МЖП и ПЖ. Поперечный блок из сердца толщиной 3 мм готовили таким образом, чтобы его верхняя и нижняя плоскость были равноудалены от основания и верхушки сердца соответственно. Для гистологического исследования материал фиксировали в 10% буферном формалине в течении не менее 24 часов, обезвоживали в спиртах и заливали в парафин в гистопроцессор ASP 300S фирмы Leica. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм получали на ротационном микротоме RM2135 фирмы Leica. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином в гистостайнере Autostainer XL фирмы Leica и изучали на световом микроскопе DMRB фирмы Leica.

Морфологическая оценка материала выполнена полуколичественным методом, предложенным M. Bicer, J.H. Lu, H. Tsukihara [Lu J.H. et al. 1998, Tsukihara H. et al. 2006, Bicer M. et al. 2008]. Статистическую обработку полученных результатов проводили по непараметрическому методу U-критерия Манна-Уитни [Гланц С. 1998].

При макроскопическом исследовании проводили оценку степени выраженности спаек в полости перикарда и «различимости» коронарных артерий. Выраженность спаечного процесса в полости перикарда определяли по методике оценки, предложенной W. Heydorn’ом [Heydorn W.H. et al. 1987]: 0 степень – нет спаек; 1 степень – легкая степень выраженности спаек: прозрачные спайки в виде пленок, легко разделяющиеся при разведении листков перикарда без диссекции (достаточно только пальцевого разделения); 2 степень – средняя степень выраженности спаек: фиброзные спайки, требующие комбинированного разделения тупым и острым путем, с преобладанием первого; 3 степень – тяжелая степень выраженности спаек: плотные фиброзные спайки, требующие в основном разделения острым путем.

Под уменьшением «различимости» коронарных артерий мы понимаем воспалительные изменения (отек, клеточный инфильтрат, выпадение масс фибрина), липоматоз и фиброз эпикарда после экспериментального воздействия. Определение ее степени оценивали по методике, предложенной M. Bicer [Bicer M. et al. 2008]: 0 – хорошо различимые коронарные артерии; 1 - частично различимые коронарные артерии; 2 - неразличимые коронарные артерии.

Микроскопическую оценку изменений проводили на тотальных поперечных срезах сердца. Степени выраженности воспаления оценивали по 4-х бальной методике Lu J.H. [Lu J.H. et al. 1998]: 0 степень – отсутствие воспалительных изменений, клеточной инфильтрации нет; 1 степень – скудная, очаговая инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами, лимфоцитами и плазматическими клетками; 2 степень – очаговая инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами, лимфоцитами и плазматическими клетками; 3 степень – диффузная, выраженная инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами, плазматическими клетками и лимфоцитами.

Оценку степени выраженности фиброза эпикарда проводили также по методике предложенной и примененной Lu J.H. [Lu J.H. et al. 1998]: 0 степень – нет фиброза; 1 степень – редкая, очаговая фиброзная соединительная ткань с отложением фибрина; 2 степень – тонкий слой очаговой фиброзной рыхлой соединительной ткани с отложением фибрина; 3 степень – толстый слой диффузной фиброзной плотной соединительной ткани с отложением фибрина.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ПЛЕНОЧНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА И КОЛХИЦИНА

В настоящее время одной из наиболее предпочтительных матриц для размещения различных агентов в медицине являются полимерные биоразлагаемые пленочные композиции на основе природных полимеров, например желатина, которые можно использовать в качестве средств

доставки лекарственных препаратов.

Желатин находит широкое применение в медицине в виде капсул, гелей, губок, пленок в стоматологии, офтальмологии, гинекологии, проктологии, дерматологии, оториноларингологии [Малов А.Н. 2006, Ананьев В.Н. 2011].

В хирургии желатиновые композиции находят применение в качестве покрытий поверхности изделий, контактирующих с кровью (протезы кровеносных сосудов, кардиохирургические заплаты), с целью улучшения функциональных свойств этих изделий – тромборезистентных, антимикробных, нулевой хирургической пористости [Бокерия Л.А. с соавт. 2008, 2012].

Среди свойств желатина особо следует выделить такие его физико-химические, технологические, функциональные свойства, как: биосовместимость, нетоксичность, неканцерогенность; способность к биодеградации; деструкция до нетоксичных веществ; высокая гелеобразующая способность; пленкообразование; хорошая растворимость; гемостатическое действие; способность стимулировать процессы регенерации поврежденных тканей; хорошая адгезионная способность; наличие амфотерных свойств (в кислой среде - положительный заряд, в щелочной – отрицательный); совместимость со многими лекарственными веществами [Фурин В.А. 2004, Григорьева М.В. 2011].

Желатин имеет высокую сорбционную емкость, поэтому этот полимер может служить хорошей матрицей для лекарственных препаратов.

Для оценки выделения колхицина из полученых желатиновых композиций был использован спектрофотометрический метод. Колхицин имеет максимум поглощения света при длине волны 245 нм. При оценке выделения колхицина из пленочных композиций, содержащих разные количества колхицина, было установлено, что активное наибольшее выделение колхицина происходит в первые минуты, когда из композиции с количеством колхицина min 0,7 мг и max 7,0 мг / г Ж за 30 мин выделяется основная масса несвязанного колхицина - 65-75% препарата, затем (через 1

час) скорость выделения резко уменьшается, через 2 часа выделялось 10-7%, через 40 часов – 4,3-1,5%. Независимо от количества вводимого в композицию колхицина выделение его в физиологический раствор после 1 часа происходит очень медленно (рисунок 2). Достигается пролонгированность выделения малыми дозами (n=5, P<0,95). К 40 ч в пленке остается 16-20% колхицина.

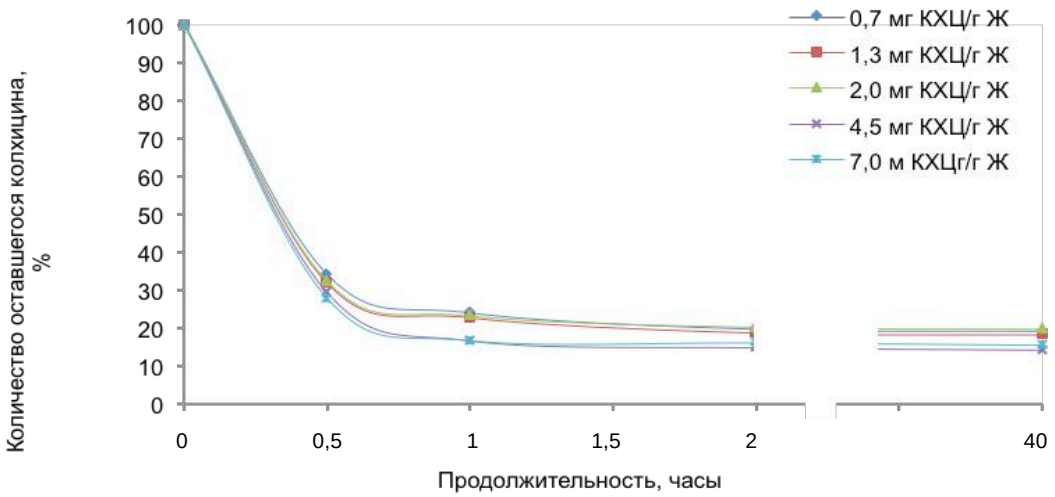

Рис. 2. Количество колхицина, оставшееся в пленочной композиции после выдержки в физиологическом растворе, %

При оценке гидролитической деструкции пленочных композиций (как модели биорезорбции) было установлено, что добавление колхицина в объем материала разрыхляет структуру полимерной матрицы. У образцов с колхицином гидролитическая деструкция проходит быстрее и составляет 27±3 дня, для желатина без колхицина – 33±3 дня (P<0,95; n=5).

Опытным путем нами были установлены оптимальные физико-механические характеристики полимерных пленочных композиций: прочность при разрыве – не менее 1 МПа, относительное удлинение – не менее 60%. Такие параметры удовлетворяют манипуляционным требованиям к материалам.

Пленочная композиция с колхицином имеет механическую прочность на 18% меньше, чем без колхицина; эластичность меньше на 10%, но обе характеристики остаются при этом в оптимальных пределах (n=5, P=0,95) (рисунок 3).

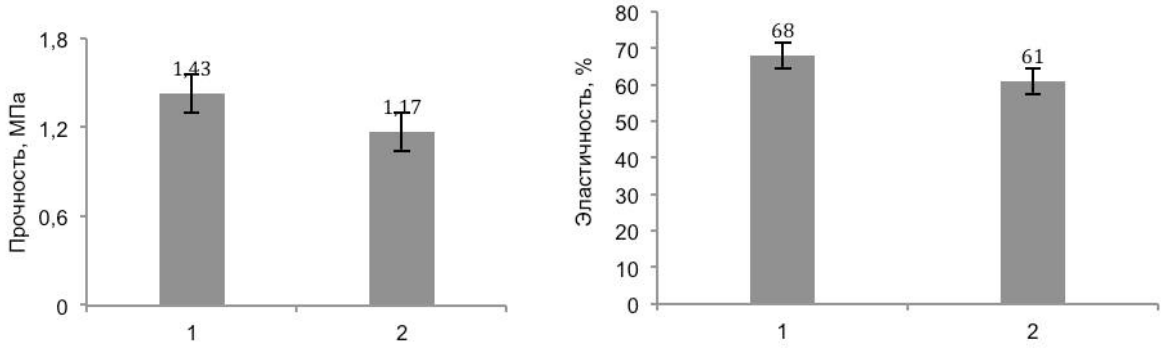

Рис. 3. Влияние колхицина на прочностные характеристики стерильных пленочных композиций на основе желатина
1) желатин; 2) желатин +колхицин (7 мг КХЦ / г Ж)

При оценке влияния стерилизации установлено, что стерилизация незначительно влияет на прочность и эластичность пленок на основе желатина и желатина с колхицином, но в некоторой степени разрушает связи колхицина и желатина, в результате чего после стерилизации выделяется на 8% больше колхицина.

Таким образом, проведена оценка возможности получения пленочных композиций на основе желатина с различным количеством колхицина. Терапевтической дозой при пероральном применении колхицина считается 1,5 мг/сут, курсовая – 46 мг [Imazio M. 2013]. Так как нам не известно заранее, какое количество колхицина, введенное в пленку (на грамм полимера-желатина), наиболее предпочтительно, то мы исходили из количеств, равных терапевтической (суточной) дозе, увеличенной в 4 раза и уменьшенной в 2,5 раза, то есть курсовая доза была меньше в 8-80 раз. Нами были получены композиции с колхицином, вводимым в полимер в количестве от 0,05 до 0,5 мг в испытуемые образцы (2х2 см=4 см^2), в которых колхицина было от 0,7 до 7,0 мг на 1 г желатина.

Предполагается, что малые дозы вводимого в желатиновую матрицу препарата и его адресное пролонгированное выделение могут быть безопасны и вполне эффективны для профилактики ряда заболеваний и осложнений.

ИССЛЕДОВАНИЕ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ ПЛЕНОЧНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КОЛХИЦИНОМ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO

Для подтверждения эффективности применения разработанных в НЦССХ им. А.Н.Бакулева полимерных пленочных композиций в качестве барьерных противоспаечных средств проведено экспериментальное исследование in vivo на кроликах, сроки наблюдения 3, 7 и 30 суток.

Так как представления о сроках биорезорбции в организме полученных полимерных композиций у нас не было, то конечный срок наших наблюдений 30 суток мы выбрали, исходя из оценки гидролитической деструкции разработанных композиций in vitro в физиологическом растворе при pH=3. Срок этой деструкции составляет 27-33 дня ($P<0,95$; $n=5$).

Макроскопическое изучение сердец разных групп на 3 сутки выраженных различий не выявил, во всех случаях отмечалось утолщение париетального перикарда, шероховатость эпикарда и наличие в полости перикарда фибрина. Развития спаек между листками перикарда не отмечено ни в одном случае. «Различимость» коронарных артерий в первые сутки была хорошей во всех исследованных образцах.

Анализ, полученных при гистологическом исследовании результатов, показал, что в первые сутки после комплексного воздействия в полости перикарда возникают разной степени выраженности процессы воспалительной реакции с клеточной инфильтрацией тканей и отложением фибринозного экссудата. На 3 сутки воспалительной реакции в клеточной инфильтрации преобладали нейтрофильные гранулоциты, также встречались очаги лимфоцитов и гистиоцитов. Наибольшая степень воспалительной реакции с очаговой или диффузной клеточной инфильтрацией отмечалась в контрольной группе (2,6±0,55) и группе №2 с применением желатиновой пленочной композиции без колхицина (2,4±0,55). В группах с применением колхицина выраженность воспаления была ниже (1,6±0,55 и 1,8±0,45) и по сравнению с контрольной группой имела статистически достоверную разницу. На 3 сутки после воздействия комплекса агрессивных факторов уже

можно было наблюдать фиброзные изменения эпикарда, которые представляли из себя неравномерные утолщения эпикарда за счет рыхлой соединительной ткани. Аналогичные изменения встречались и в париетальном листке перикарда. Наибольший фиброз эпикарда отмечался в контрольной группе, где среднее значение составило 1,2±0,45. На 3 сутки между группами статистически достоверной разницы по степени выраженности фиброза не выявлено (рисунок 4).

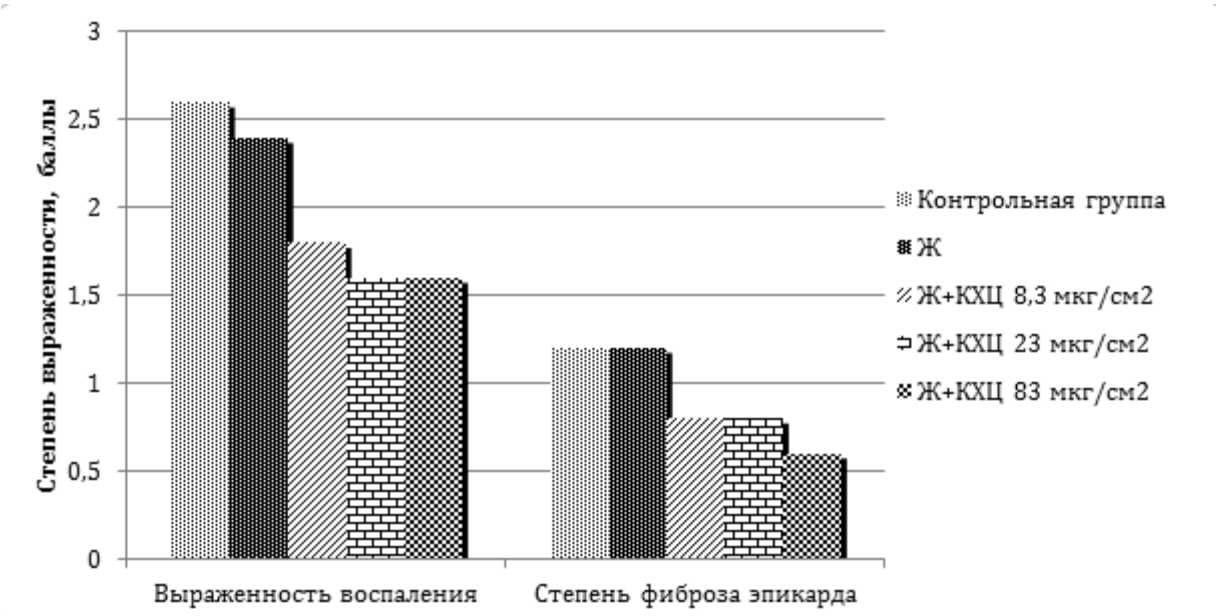

Рис. 4. Сравнительная диаграмма морфологических изменений перикарда на 3 сутки после комплексного воздействия. Ж – желатин; КХЦ – колхицин

Во всех группах на 7 сутки после воздействия комплекса агрессивных факторов в полости перикарда отмечалось развитие спаек разной степени выраженности (рисунок 6). В группах с применением барьерных пленочных композиций выраженность спаечного процесса была по сравнению с контрольной группой ниже, за счет участков прилегания пленок, где развития спаечного процесса не отмечено ни в одном случае. Спайки формировались в зонах свободных от пленочных композиций вблизи места прямого воздействия комплекса агрессивных факторов. Пленочные композиции визуально не имели признаков биодеградации, но прочность была снижена. Большинство спаек соответствовало 1 и 2 степени выраженности, но в контрольной группе и в группе желатиновой пленки без колхицина отмечали по одному случаю с 3 степенью выраженности

спаечного процесса. Таким образом, выраженность спаечного процесса на 7 сутки в контрольной группе и группе с применением желатиновой пленки без колхицина составила 2,0±0,71 и 1,6±0,89 соответственно. В группах с применением пленочных композиций модифицированных колхицином выраженность спаечного процесса была значительно ниже, а в трех случаях (20%) из пятнадцати формирования спаек в полости перикарда и вовсе не наблюдалось. В «колхициновых» группах средние значения выраженности спаечного процесса колебались в пределах от 0,8±0,45 до 1,0±0,71, и имели статистически достоверную разницу по сравнению с контрольной группой. «Различимость» коронарных артерий на 7 сутки была хуже, чем мы наблюдали на 3 сутки. Наихудшую «различимость» коронарных артерий отмечали в контрольной группе (1,0±0,71), но статистически достоверной разницы с результатами в других группах не выявлено (рисунок 5).

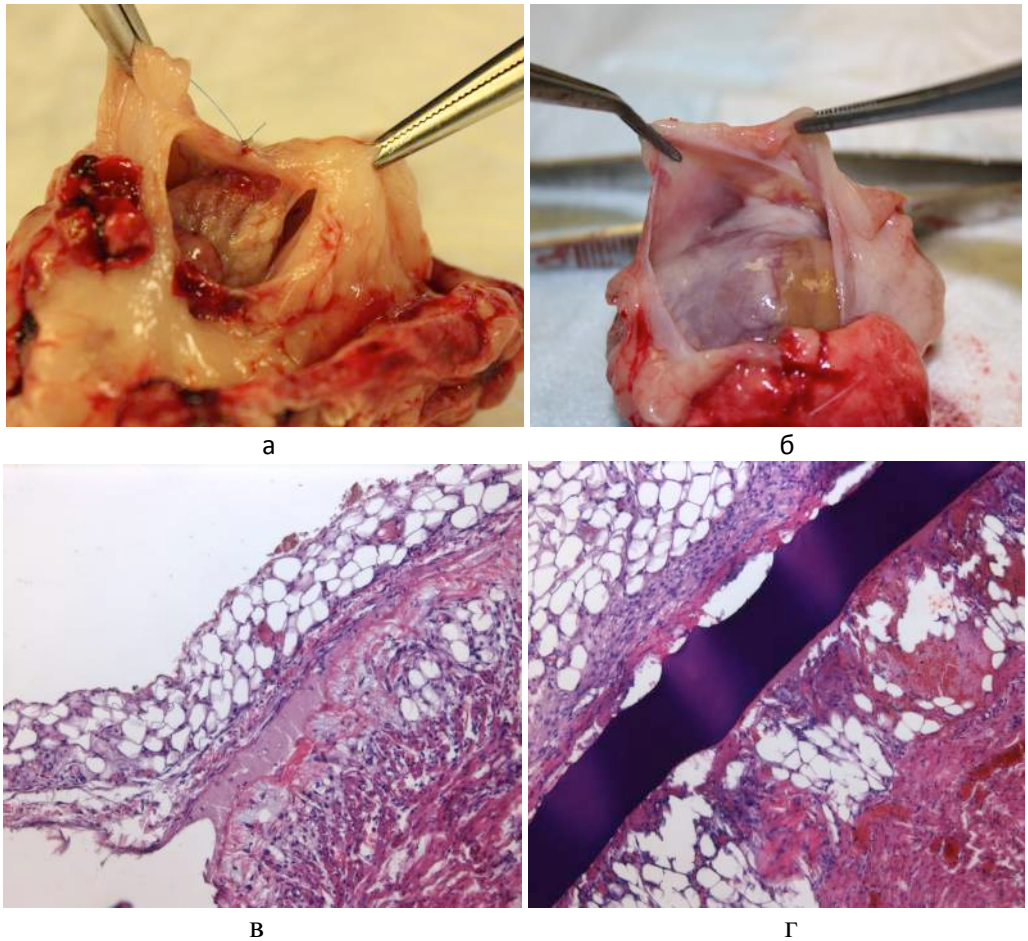

Рис. 5. Грудина и сердце кролика на 7 сутки после вмешательства: а - контрольная группа; б – группа с желатиновой пленочной композицией с колхицином 23 мкг/см^2.
Сердце кролика на 7 сутки после вмешательства. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. об. 10 х ок. 10: в - контрольная группа; г – группа с желатиновой пленочной композицией с колхицином 23 мкг/см^2.

При гистологическом изучении микропрепаратов выявлен продуктивный характер воспаления. Клеточная инфильтрация тканей была представлена в основном лимфогистиоцитарными очагами и клетками фибробластического ряда. Количество нейтрофильных гранулоцитов сократилось и они встречались только в контрольной группе и группе желатиновой пленки без колхицина. В «колхициновых» группах степень выраженности воспалительной реакции была значительно ниже по сравнению с контрольной группой, что подтверждалось статистически достоверной разницей. Выраженность фиброза эпикарда имела рост во всех группах. Наибольшая степень фиброза отмечалась в контрольной группе, но статистически достоверной разницы с другими группами нами не выявлено. На 7 сутки в местах отсутствия барьерных пленок отмечали развитие спаек, которые состояли из рыхлой соединительной ткани с сосудистым компонентом, а в местах присутствия барьерных пленок спаек не было, так как происходило разобщение листков перикарда (рисунок 5).

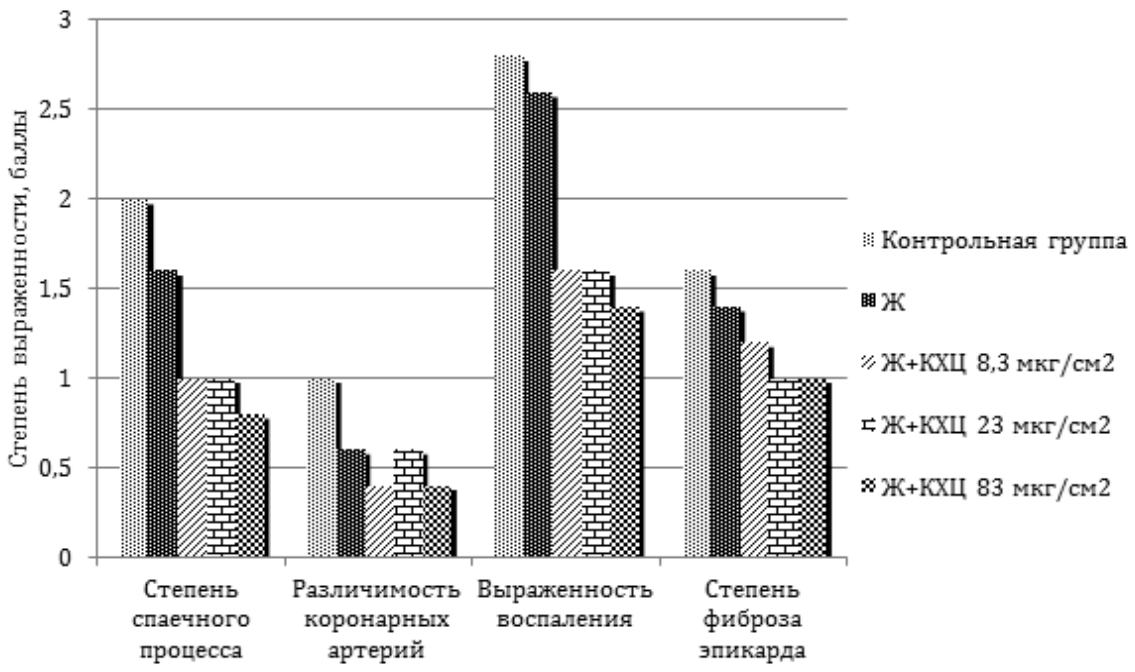

Рис. 6. Сравнительная диаграмма морфологических изменений перикарда на 7 сутки после комплексного воздействия. Ж – желатин; КХЦ – колхицин

Макроскопическое изучение сердец на 30 сутки показало развитие спаечного процесса в полости перикарда разной степени выраженности

(рисунок 7). В местах прилегания пленочных композиций спаечный процесс отсутствовал. В контрольной группе наблюдали наиболее выраженный спаечный процесс (3,0±0,00), где во всех образцах присутствовали спайки 3 степени. В группе с применением желатиновой пленки без модификации колхицином спайки 3 степени развились в двух случаях из пяти и среднее значение спаечного процесса составило 2,4±0,55. В группах с применением пленок модифицированных колхицином спайки 3 степени не наблюдались, средние значения выраженности спаечного процесса равнялись 1,2±0,45 (в группах с применением колхицина 8,3 мкг/см^2 и 83 мкг/см^2) и 1,4±0,55 (в группе с применением колхицина 23 мкг/см^2), что имело статистически достоверную разницу по сравнению с контрольной группой и группой с применением желатиновой пленки без модификации колхицином. Таким образом, было установлено, что в «колхициновых» группах степень выраженности спаечного процесса вне пленки значительно ниже, чем группе с применением желатиновой пленочной композиции без колхицина. Полную биодеградацию пленочной композиции на 30 сутки наблюдали в трех случаях (15%) из 20. Прочность сохранившихся пленочных композиций была значительно снижена, что указывало на продолжающийся процесс биодеградации. Степень «различимости» коронарных артерий в «колхициновых» группах была лучше за счет меньшего фиброза и выраженности спаек, что имело статистически достоверную разницу по сравнению с контрольной группой.

При гистологическом исследовании микропрепаратов во всех группах наблюдалось снижение воспалительной реакции, проявляющаяся скудной или очаговой клеточной инфильтрацией с преобладанием клеток фибробластического ряда, лимфогистиоцитарных и макрофагальных очагов. На 30 сутки статистически достоверной разницы по выраженности воспаления между группами не выявлено. В контрольной группе и группе с применением желатиновой пленочной композиции без колхицина отмечался выраженный фиброз эпикарда, проявляющийся его диффузным утолщением

за счет волокнистой соединительной ткани. В группах с применением пленок с колхицином выраженность фиброза колебалась от 1,8±0,45 до 1,6±0,55, что соответствует слабовыраженному очаговому фиброзу. Разница по степени фиброза эпикарда между контрольной группой и группами с применением пленок с иммобилизованным колхицином имела статистическую достоверность. Спайки на 30 сутки представляли из себя плотную бессосудистую соединительную ткань. Вокруг сохранившихся пленок отмечалось формирование фиброзных капсул.

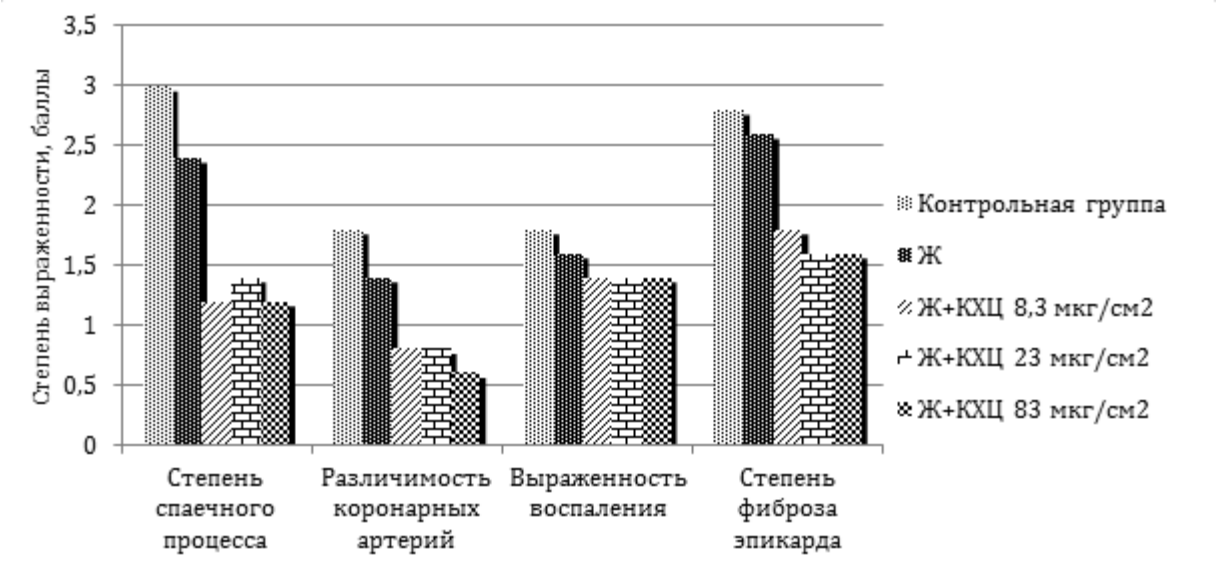

Рис. 7. Сравнительная диаграмма морфологических изменений перикарда на 30 сутки после комплексного воздействия. Ж – желатин; КХЦ – колхицин

Таким образом, разработанная в данном исследовании экспериментальная модель послеоперационного перикардита на кроликах проявляет основные характерные изменения, развивающиеся после операции на сердце, а предложенные и исследованные новые методы профилактики спаечного процесса в полости перикарда с применением биодеградируемой пленочной композиции на основе природного полимера желатина с иммобилизованным колхицином являются эффективными и перспективными для дальнейшего практического использования.

Выводы

1. Показано, что для создания экспериментальной модели послеоперационного перикардита с развитием спаечного процесса следует применить комплексное воздействие агрессивных факторов: механическая травма, подсушивание, введение в полость перикарда частиц талька и хлопковых волокон, наложение шва на париетальный листок перикарда.
2. В эксперименте на животных показано, что биодеградируемые желатиновые пленочные композиции проявляют барьерные свойства, снижающие интенсивность формирования спаек в полости перикарда путем разобщения скомпрометированных серозных поверхностей.
3. Модификация колхицином усиливает противоспаечные свойства желатиновых пленочных композиций, подавляя воспалительную реакцию и развитие фиброза.
4. Статистически достоверных различий в результатах между группами с применением разных количеств колхицина, выбранных в данной работе, не выявлено. Решающим фактором является не масса колхицина, а фактор пролонгированности его выделения в малых дозах.

Практические рекомендации

1. Разработанная экспериментальная модель послеоперационного перикардита на кроликах с характерным развитием воспалительной реакции и спаечного процесса в полости перикарда может быть использована для сравнительного исследования различных средств профилактики постперикардиотомного синдрома.
2. Материал в виде пленочной композиции на основе желатина может быть использован для адресной доставки лекарственных средств с их пролонгированным выделением.
3. Для профилактики развития спаек в полости перикарда и местного подавления воспалительной реакции целесообразно применение

биодеградируемой пленочной композиции на основе желатина с иммобилизованным колхицином.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Фатулаев З.Ф., **Сивцев В.С.**, Климчук И.Я., Петросян А.Д. Послеоперационные спайки в перикарде и их профилактика в кардиохирургии. Всероссийская научная конференция молодых ученых-медиков. Инновационные технологии в медицине XXI века. Материалы научно-практической конференции. 6-7 декабря 2012 года. Москва. М.; 2012, с. 28
2. **Сивцев В.С.,** Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Городков А.Ю., Новикова С.П., Цыганков Ю.М. Современное состояние проблемы профилактики спаечного процесса после операции на открытом сердце. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2014; 3(15): 144
3. **Сивцев В.С.**, Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Городков А.Ю., Новикова С.П., Серов Р.А., Крестинич И.М., Цыганков Ю.М. Биодеградируемые пленки в профилактике спаечного перикардита в эксперименте. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2014; 6 (15): 240
4. Бокерия Л.А., **Сивцев В.С. Послеоперационный спаечный перикардит: факторы риска, патогенез и методы профилактики. Анналы хирургии. 2014; 4: 5-12.**
5. Бокерия Л.А., Бокерия О.Л., Новикова С.П., Салохединова Р.Р., Николашина Л.Н., Шустрова О.В., **Сивцев В.С. Изучение свойств пленочных композиций на основе желатина и колхицина. Клиническая физиология кровообращения. 2014; 3: 57-66.**
6. Бокерия Л.А., Новикова С.П., Бокерия О.Л., Костров В.И., Салохединова Р.Р., Николашина Л.Н., Шустрова О.В., **Сивцев В.С. Пленочные композиции на основе желатина, структурированные разными способами. Бюллетень сердечно-сосудистые заболевания. 2014; 4(15): 60-72.**