

САЧКОВ АНТОН СЕРГЕЕВИЧ

**ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ И ДЕВИТАЛИЗИРОВАННЫЕ АЛЛО- И
КСЕНОТРАНСПЛАНТАТЫ ДЛЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ
ХИРУРГИИ.**

(Экспериментальное исследование).

14.00.44 – сердечно-сосудистая хирургия.

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук.

Москва - 2008

**Работа выполнена в Научном Центре сердечно-сосудистой хирургии
имени А.Н. Бакулева РАМН.**

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
Академик РАМН

Бокерия Лео Антонович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Шаталов Константин Валентинович
заведующий отделением неотложной хирургии детей раннего возраста
Научного Центра Сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева РАМН,
г.Москва

доктор медицинских наук, профессор Иванов Алексей Сергеевич
заведующий отделением врожденных пороков сердца Российского Научного
Центра Хирургии им.Академика Б.В.Петровского РАМН, г.Москва.

Ведущая организация: **Научно-исследовательский институт
трансплантологии и искусственных органов Минздравсоцразвития РФ.**

Защита диссертации состоится « 13 » февраля 2009 года в 14 часов на
заседании Диссертационного Совета Д 001.015.01. при Научном Центре
Сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН по адресу: 121552,
г. Москва, Рублевское шоссе, 135, конференц-зал №2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научного Центра
Сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН.

Автореферат разослан «....» 2008 года.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета,
доктор медицинских наук

Газизова Д.Ш.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы

В настоящее время существуют три основных типа заменителей клапанов сердца: механические клапаны, биопротезы (ксеногенная ткань фиксированная, например, глутаровым альдегидом) и аллографты – клапаны, полученные от человеческих доноров. Каждый из этих клапанов имеет ограничения и специфические недостатки. Использование механических протезов ассоциировано с риском тромбоэмболических и геморрагических осложнений и требует пожизненной антикоагулянтной терапии. Эти клапаны так же не имеют устойчивости к инфекции, с которой чрезвычайно сложно справиться без удаления протеза. Биопротезы, фиксированные глутаровым альдегидом, не требуют антикоагулянтной терапии, но они гораздо менее долговечны. Криосохраненные аллографты, так же не требуют антикоагулянтной терапии, однако они содержат жизнеспособные клетки и могут, таким образом, вызывать развитие иммунного ответа. Ни один вид доступных протезов клапанов сердца не имеет способности к росту, что особенно важно для детей.

Учитывая недостатки существующих протезов клапанов сердца, усилия многих исследователей направлены на создание жизнеспособного неиммуногенного клапана сердца при помощи методов тканевой инженерии.

Есть два основных подхода к созданию биоинженерных тканей, которые используются последнее время. При первом используются бесклеточные ксеногенные или аллогенные клапаны с последующим засеванием или с ожидаемой репопуляцией клетками хозяина после имплантации. Рядом авторов в эксперименте показана целесообразность такого подхода.

Второй подход заключается в создании полимерной основы в форме клапана сердца, с последующей трансплантацией на нее аутологичных клеток.

После прикрепления, клетки формируют собственный экстрацеллюлярный матрикс. Теоретически, таким образом можно получить жизнеспособный аутологичный клапан, который может быть имплантирован пациенту, у которого исходно были получены клетки. Такой клапан может иметь потенциал к росту, самообновлению, быть устойчивым к инфекции и нетромбогенным.

Большой прогресс достигнут в тканевой инженерии клапанов сердца, но многое еще предстоит сделать. Оптимальная обработка, не повреждающая соединительную ткань биологического матрикса, целесообразность заселения матрикса, его дизайн, источник клеток для заселения, *in-vitro* условия и многие другие направления продолжают активно исследоваться. Конечной целью должно явиться создание аутологичного самообновляющегося клапана способного противостоять гемодинамическому воздействию системной циркуляции.

В России впервые по инициативе В.И.Бураковского криосохраненные жизнеспособные аллогенные клапаны стали применяться в НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН. В 1990 году В.П. Подзолков и в 1992 году Г.И. Цукерман выполнили первые успешные операции по имплантации этих протезов при хирургической коррекции сложных врожденных и приобретенных пороков сердца. До настоящего времени НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН сохраняет приоритет в этом направлении кардиохирургии. За истекшее время была отработана принципиальная технологическая схема, созданы условия для производства криосохраненных аллогraftов и первый в России банк криосохраненных аллогraftов.

В 1992 - 2003 гг. в отделе приобретенных пороков сердца НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН было имплантировано 80 жизнеспособных криосохраненных аллогraftов, в том числе 70 - при коррекции аортального порока, главным образом при инфекционном эндокардите, 10 митральных

аллографтов имплантировано в трикуспидальную позицию больным с эндокардитом трехстворчатого клапана.

Послеоперационная оценка функции аллографтов основывалась на ультразвуковых методах, магнитно-резонансной томографии и клинических методах обследования. Пациенты повторно обследовались в различные сроки после операции. Срок первого обращения находился в пределах от 6 месяцев до 3 лет. Наибольший срок наблюдения превышает 10 лет. Данные обследования выявили удовлетворительную функцию пересаженных жизнеспособных аллографтов у большинства взрослых пациентов.

В России ТИ клапанов сердца все еще находится на начальных этапах развития. Однако в НЦССХ РАМН им.А.Н.Бакулева последние годы ведутся исследования в этом направлении. В ходе совместной работы с ИТЭБ РАН разработана оригинальная девитализирующая антикальцинозная обработка биотканей для снижения иммунного ответа и кальциноза (Патент РФ на изобретение №2291675). Методика исследовалась на модели крысы с имплантацией девитализированной ткани под кожу на 2 месяца. Степень дегенерации биоматериала оценивалась по уровню кальциноза ткани после эксплантации. Была установлена высокая эффективность нашей методики в плане предотвращения кальциноза. Основываясь на экспериментальных данных с 2004 года начато клиническое применение девитализированных аллографтов. Накопленный клинический материал на данном этапе не позволяет выявить значимых различий между жизнеспособными и девитализированными аллографтами. В связи, с чем было решено провести сравнительную оценку криосохраненных жизнеспособных и девитализированных аллографтов в хроническом эксперименте на модели крупного животного с имплантацией биоматериала в кровотоки. Учитывая труднодоступность аллографтов и ограниченное количество протезов маленького диаметра, так же решено было

исследовать в эксперименте клапаны ксеногенного происхождения девитализированные по нашей методике.

Цель и задачи работы. Основной целью работы является экспериментальная оценка различных видов клапанных трансплантатов и обоснование возможности их использования в сердечно-сосудистой хирургии.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние процесса криоконсервации и стерилизации на жизнеспособность аллографта и на состояние его соединительнотканного матрикса.
2. Изучить характер изменений, происходящих с клетками и соединительнотканым матриксом алло- и ксеноматериала, в результате девитализирующей обработки.
3. Провести сравнительный макро- и микроскопический анализ изменений, происходящих в имплантатах из девитализированной аллогенной и жизнеспособной аллогенной тканей, через 4 месяца после имплантации.
4. Выявить особенности адаптации девитализированной ксеногенной ткани в сравнении с жизнеспособным алломатериалом при имплантации в системный кровоток.

Научная новизна исследования.

Настоящее исследование отражает один из этапов работы, проводимой совместно НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН и ИТЭБ РАН по разработке новых образцов биологических клапанов для кардиохирургии.

Научная новизна работы заключается в исследовании принципиально нового, не имеющего мировых аналогов, вида обработки биологических материалов. В работе впервые определены основные закономерности морфологических изменений девитализированных дигитонином и ЭДТА ксено- и аллогенных сосудистых тканей на модели собаки с имплантацией

биоматериала в системный кровоток сроком на 4 месяца. По результатам хронического эксперимента выявлены благоприятные характеристики девитализированной аллоткани, позволяющие надеяться на ее успешное клиническое применение. Выявлены критические параметры обработки, в будущем требующие модификации и усовершенствования.

Разработана хирургическая модель для оценки биологических тканей в системном кровотоке без использования искусственного кровообращения и предложен вариант ее усовершенствования.

Практическая ценность.

В результате комплекса научно-поисковых работ определены направления дальнейших исследований, которые в будущем позволят создать аутологичный жизнеспособный заместитель клапанов сердца и сосудов.

Оценка полученных экспериментальных данных показала, что в имплантированной в кровоток собакам жизнеспособной аллогенной ткани происходили изменения, сходные, с таковыми в ткани аллогraftов, имплантированных человеку. На основании этого можно предположить, что модель собаки позволит более точно прогнозировать судьбу тканей при имплантации человеку. Сравнительная оценка эксплантированных через 4 месяца тканей показала, что девитализированная аллогенная ткань является наиболее перспективной с точки зрения отсутствия развития иммунного ответа и сохранения структурной целостности имплантата. Все это позволяет ожидать удовлетворительных результатов при использовании данного вида биоматериала в клинике.

Положения, выносимые на защиту.

1. Девитализированная дигитонином и ЭДТА аллогенная ткань по результатам экспериментального исследования обладает хорошими пластическими качествами. В организме реципиента она оставалась полностью инертной и не подвергалась дегенеративным изменениям в

сроки до 4-х месяцев, вследствие отсутствия кальциноза и иммунной реакции.

2. В эксперименте девитализация ткани ксеногенного происхождения при помощи дигитонина и ЭДТА приводила к структурной дегенерации из-за развития выраженной иммунной реакции.
3. Криосохраненная жизнеспособная аллогенная ткань обладает удовлетворительными качествами при имплантации в кровоток. Однако выявленные признаки умеренной структурной дегенерации и иммунного ответа могут привести к последующему развитию дисфункции аллогraftа в отдаленные сроки.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ. Их список прилагается.

Апробация работы.

Материалы и основные положения диссертации доложены и обсуждены: на 11,12,13 Всероссийских съездах сердечно-сосудистых хирургов, на объединенной конференции отделения неотложной хирургии приобретенных пороков сердца, лаборатории по экспериментальной разработке новых биоматериалов для сердечно-сосудистой хирургии, лаборатории моделирования и изучения патологии сердца и сосудов с оперблоком и вивариумом, отдела патологической анатомии с прозектурой НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН.

Объем и структура исследования.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, охватывающего 21 отечественных и 222 иностранных источников. Работа изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 29 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В исследовании были использованы:

- криосохраненные жизнеспособные аортальные аллографты.
- криосохраненные девитализированные аортальные аллографты.
- криосохраненные девитализированные аортальные ксенографты.

Всего было исследовано по 5 образцов каждого типа. Аллографты – клапанно-аортальные комплексы собаки, забирались тотчас после выполнения острого эксперимента. Ксенографты – клапанно-аортальные комплексы свиньи забирались на мясокомбинате в течение 30 минут после забоя животных.

1. Методика получения и обработки биоматериала.

После забора собачьи и свиные сердца помещались в стерильные контейнеры со средой RPMI-1640 при 40С с гентамицином 400 мкг/мл и флуконазолом 20 мкг/мл и в таком виде доставлялись к месту обработки в лабораторию.

1. Методика выделения клапанно-аортальных комплексов.

Все манипуляции по выделению аортального аллографта, а также их дальнейшая обработка осуществляется в условиях стерильности в ламинарном боксе с помощью стерильных инструментов.

1. Выполняется продольный разрез правых отделов сердца через устья верхней и нижней полых вен, трикуспидальный клапан, переднюю стенку правого желудочка до верхушки сердца. При этом особое внимание обращают на сохранение целостности выводного отдела правого желудочка и легочного конуса. Излишки ткани правого предсердия и правого желудочка иссекаются.

2. Осуществляется поперечный разрез в области верхушки левого желудочка на 1-1,5 см выше верхушки сердца. Отсеченная верхушка удаляется. Затем разрез проходит по заднебоковой стенке левого желудочка и через середину задней створки митрального клапана продолжается на левое

предсердие. Передняя митральная створка сохраняется, а излишки ткани левого желудочка и левого предсердия иссекаются.

3. Из клетчатки аорты выделяются коронарные артерии, перевязываются и пересекаются на расстоянии около 5 мм от устья.

4. Осуществляется разделение стенок аорты и легочного ствола тупым путем. В области межжелудочковой перегородки рассекают мышечную ткань с таким расчетом, чтобы не повредить створки аортального клапана, после чего аорта и легочный ствол разделяются.

5. Излишки адвентиции вокруг аорты и мышечной ткани удаляются на расстоянии около 1 см ниже уровня клапанного кольца. Иссекается излишняя жировая ткань. При препарировании графтов аорты желательно избегать контакта со створками. После препарирования кондуиты в зависимости от их типа подвергались соответствующей обработке.

2. Девитализация биоматериала.

Выделенные клапанно-аортальные комплексы инкубировались в 0.9% растворе хлористого натрия, забуференном 10 mM HEPES pH 6.0, содержащем дигитонин (0.02%) ЭДТА (10 mM) при 20°C в течение суток. Обработка проводилась при постоянном перемешивании раствора. После девитализации графты трижды отмывались стерильным физиологическим раствором (Патент РФ на изобретение №2291675).

3. Стерилизация биоматериала.

Жизнеспособные алло- и девитализированные ксено- и алло- образцы помещались в 200 мл физиологического раствора с гентамицином 80мг, ципрофлоксацином 200мг, цефоперазоном 500мг и дифлюканом 20мг. Биоматериал инкубировался в антибиотиках в течение 24 часов при температуре 4°C, после чего был готов к кросохранению.

4. Криосохранение.

Трансплантат помещались в стерильный пластиковый пакет, применяемый для замораживания эритроцитов, производства фирмы “GAMBRO” “Haemofreeze Bag”. Пакет “Haemofreeze Bag” с кондуитом заполняется 200 мл криопротекторной смеси, состоящей из 20,0 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и 20 мл 10% альбумина из расчета на 200,0 мл среды RPMI -1640. Пакет с кондуитом запаивался двойным швом с помощью высокотемпературного устройства.

Для замораживания мы использовали программу «Heart Valve» разработанную и рутинно использующуюся в нашем центре. Содержимое контейнера охлаждалось со скоростью 1 град/мин до -40°C. После этого контейнер помещается в пары жидкого азота (-170-180°C), где он может храниться неограниченное время.

5. Хранение биоматериала.

После достижения температуры -40°C контейнер извлекается из криостата и погружается в хранилище с жидким азотом, в парах которого (-140°C -160°C) хранится до момента использования. В нашем случае максимальный срок хранения достигал 3 месяца

6. Транспортировка, согревание и подготовка к имплантации.

Графты размораживали в условиях лаборатории и в размороженном состоянии доставляют в операционную. Важно, что после согревания клапан должен находиться в криопротекторной смеси минимум времени из-за возможности токсического действия ДМСО. Поэтому тотчас после доставки в операционную он должен быть извлечен из контейнера и отмыт от криопротектанта.

Размораживание производилось при постоянной температуре от +5 до +10°C. случаев растрескивания ткани не было.

В операционной для обработки кондуита накрывался отдельный стерильный стол. Пакет обрабатывался йодом и стерильными ножницами

вскрывался. Хирург пинцетом за дистальную часть кондуита извлекал его из пакета и помещал в металлический стакан емкостью 200 мл. В него наливался 100,0 питательной среды и 100,0 смеси из контейнера с графтом (5% ДМСО). Трансплантат отмывался в течение 1 минуты. Затем графт извлекался на стерильную салфетку. Жидкость из стакана выливалась. Вновь из флакона наливалось 100,0 питательной среды и 50,0 смеси из контейнера (2,5% ДМСО), и графт в течение 1 минуты отмывался в этой смеси. Жидкость выливалась. Затем графт отмывался в чистой среде RPMI 1640 в течение 1 минуты, которая также выливалась. В стакан наливалось 100,0 чистой питательной среды, в которой кондуит находился вплоть до имплантации.

2. Экспериментальная модель и техника операции.

В качестве экспериментальных животных использовались беспородные собаки в возрасте 2-3 года и весом 20-25 килограмм. Некоронарный синус со створкой, выделенный из клапанно-аортального комплекса имплантировался в дефект грудной аорты.

Анестезиологическое пособие и мониторинг. Для премедикации использовался кетамин 4.0 в/м, седуксен 4.0 в/м и атропин 0.3 п/к. Животное доставлялось в предоперационную, где подготавливалось операционное поле и на передней правой конечности в периферическую вену устанавливался катетер. Индукция анестезии в/в: тиопентал 7,5-10 мг/кг, ардуан 0,05мг/кг и фентанил 1-2мл. Затем интубировалась трахея и начиналась искусственная вентиляция легких кислородно-воздушной смесью. В правую общую бедренную артерию для прямого мониторингирования артериального давления секционным способом устанавливался катетер, также регистрировались ЭКГ, проводилась пульсоксиметрия. Для поддержания наркоза дробно вводились: тиопентал 2,5-5 мг/кг, ГОМК 50 мг/кг, фентанил 1 мл.

Техника операции. Выполнялась левосторонняя торакотомия в пятом межреберье. Для оптимизации экспозиции легкое отодвигалось вниз при

помощи держалок. Грудная аорта мобилизовалась от брахиоцефальных сосудов до третьей пары межреберных артерий. Первые три пары межреберных артерий обходились и брались в турникеты. На грудную аорту накладывались кисетные швы: проксимальный на 2-2,5см. дистальнее отхождения брахиоцефальных артерий, дистальный на уровне 3-ей пары межреберных артерий. Затем вводился гепарин из расчета 100 ед/кг и грудная аорта канюлировалась двумя Г-образными канюлями French-18, которые затем соединялись, и таким образом создавался временный шунт. Так же для мониторингования артериального давления в аорту устанавливался еще один катетер между перешейком и проксимальной канюлей. Из клапанно-аортального комплекса вырезался некоронарный синус со створкой. Аорта на канюлях пережималась, пережимались межреберные артерии. Аорта вскрывалась между канюлями, и в её стенке создавался дефект прямоугольной формы. Непрерывным проленовым швом 5-0 дефект аорты закрывался заплатой с моностворкой, с таким расчетом, чтобы створка в открытом состоянии полностью перекрывала просвет аорты. Пускался кровоток по аорте. Аорта деканюлировалась, выполнялся гемостаз. Рана грудной клетки послойно ушивалась, левая плевральная полость дренировалась. После пробуждения, восстановления самостоятельного дыхания и адекватного тонуса, животное экстубировали. Дренаж удалялся через 3-4 часа после экстубации. В течение трех суток после операции собака получала антибактериальную терапию (цефоперазон). Антикоагулянты в послеоперационном периоде не использовали.

Через 4 месяца после имплантации животные были выведены из эксперимента, биоматериал эксплантировался и исследовался макро- и микроскопически, так же проводилась количественная оценка содержания связанного кальция.

3.Методы исследования тканей.

3.1 Микроскопический анализ.

А) Световая микроскопия. Кусочки ткани фиксировались в 10% нейтральном формалине, заливали парафином, и делали срезы, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону. Полутонкие препараты (срезы, толщиной 1 микрон, полученные на ультратоме ЛКБ-4 и окрашенные толуидиновым синим) просматривали в световом микроскопе «Олимпус ВХ-51» и проводили компьютерное микрофотографирование. Анализировали состояние клеток и соединительнотканного матрикса. (ММА им.И.М.Сеченова)

Б) Люминесцентная микроскопия. Фрагменты ткани фиксировали в растворе формалина (10%) и глутарового альдегида (0.2 %) 16 ч, отмывали от фиксатора 8 часов, делали криосрезы толщиной 10 мкм при -18°C . Криосрезы анализировали на люминесцентном микроскопе, окрашивая ткани перед фиксацией ядерным красителем Hoechst 33342. Анализировалась собственная флуоресценция матрикса и флуоресценция ядер клеток при возбуждении в диапазоне 340-380 нм и запирающем фильтре 425 нм. Флуоресцентный анализ выполняли на микроскопе Leica DM 4000. Ядра клеток флуоресцировали ярко синим цветом на фоне более слабой собственной синей флуоресценции волокон тканевого матрикса. (ИТЭБ РАН г.Пушино).

3.2. Анализ жизнеспособности тканей до и после имплантации.

Жизнеспособность клеток во фрагментах клапанно-аортальных комплексов изучали микроспектрофлуориметрическим методом с применением флуоресцентных ядерных красителей этидиум бромид (ЭБ) (окрашивает ядра только в погибших клетках, красная люминесценция), и Hoechst 33342 (окрашивает ядра живых и погибших клеток, сине-зеленая люминесценция). После одновременного окрашивания этими красителями ядра живых клеток флуоресцировали сине-зеленым цветом за счет проникновения в них и связывания с ДНК красителя Hoechst 33342, а ядра погибших клеток флуоресцировали желтым или оранжевым цветом за счет связывания их ДНК с

ЭБ и Hoechst 33342. Кроме того, этот метод позволяет оценить митотическую активность живых клеток в ткани по распределению хроматина характерному для метафазы и анафазы митоза, а также форму гибели клеток (апоптоз или митоз) по аберрантному распределению хроматина.

Кусочки ткани размером 5x5 мм инкубировали 5 мин в среде RPMI-1640, содержащей 5 мкг/мл ЭБ или 2 мкг/мл Hoechst 33342, при температуре 37°C, помещали в камеру, накрывали покровным стеклом и устанавливали на предметный столик микроскопа Люмам ИЗ (ЛОМО, С.-Петербург) или Leica DM 4000. Для возбуждения люминесценции ЭБ и Hoechst 33342 использовали свет с длиной волны от 365 до 500 нм. Люминесценцию фрагментов ткани регистрировали на длине волны от 510 до 600 нм

3.3. Измерение кальция в образцах.

Связанный кальций в образцах определяли методом абсорбционной спектроскопии. После забора образцов их инкубировали в течение 1 сут в фосфатном буфере без Ca^{2+} , высушивали в течение 4 часов при 100°C и затем измеряли связанный кальций на приборе AAS-5100/Zeeman фирмы Perkin-Elmer. Количество минерализованного кальция оценивали как среднее по 5 образцам у разных собак $\pm$ средняя квадратическая ошибка. Достоверность отличия от контроля оценивали по критерию Стьюдента ($P < 0.05$)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

1. Результаты операции по имплантации заплаты с моностворкой в дефект грудной аорты собаки.

После операции выжили все животные, кровотечения не отмечалось, общая кровопотеря была минимальной и не превышала 50 мл. Заплата с моностворкой не нарушала кровотока в брюшной аорте, что оценивалось непосредственно после имплантации по морфологии кривой артериального давления, отсутствию градиента между общей бедренной артерией и дугой аорты, а в дальнейшем по функции почек. Во время операции временный шунт

создавал значительный градиент, а на ЭКГ регистрировались признаки перегрузки левых отделов, однако артериальное давление в брюшной аорте было достаточным для нормального функционирования внутренних органов.

В послеоперационном периоде собаки чувствовали себя удовлетворительно и через 4 месяца после операции были выведены из эксперимента.

2. Результаты исследования влияния криосохранения и девитализирующей обработки на ксено- и аллоткань.

При комплексном гистологическом исследовании биоматериала (стенка аорты и створки) до имплантации выявлено, что после обработки дигитонином и ЭДТА во внутреннем и наружном слое аорты клетки хуже воспринимали краситель гематоксилин, были видны мутноватые клеточные оболочки, вокруг них участки просветления. В глубине стенки аорты, где контакт с химическими агентами затруднен, клетки оставались интактными. На полутонком препарате створки можно наблюдать все стадии деградации клеточных элементов в результате обработки: практически интактные клетки, начало лизиса хроматина в ядрах, дефекты оболочки ядер, лизис цитоплазмы, выход органелл в межклеточное пространство, незначительный лизис матрикса вокруг клеток. Однако, общая соединительно-тканная гистоструктура створок и стенки аорты соответствовала нативным образцам.

Жизнеспособная аллогенная ткань в результате криосохранения сохраняла структуру сходную с нативной. Клетки оставались интактными, соединительнотканый матрикс выглядел компактным, сохранялась слоистая структура без признаков повреждения.

При люминесцентной микроскопии девитализированной ткани с окрашиванием витальными красителями все клетки окрашивались оранжевым цветом, что свидетельствовало об их гибели. Люминесцентное исследование необработанных аллогraftов подтвердило сохранение значительного

количества жизнеспособных клеток после криоконсервации. Так же выявлено, что девитализирующая обработка дигитонином и ЭДТА вызывала сходные изменения в тканях ксеногенного и аллогенного происхождения.

Таким образом, девитализирующая обработка не повреждала соединительно-тканый матрикс, и при этом, эффективно обеспечивала гибель всех клеток, а криосохранение сохраняло жизнеспособность значительного количества клеток, не нарушая структуру ткани.

3. Результаты исследования эксплантированного через 4 месяца биоматериала.

3.1. Результаты макроскопического исследования.

После эксплантации в сериях с девитализированной и жизнеспособной аллогенной тканью в 40% случаев створка оказывалась припаянной к стенке имплантата, в серии с девитализированной ксеногенной тканью в 60% соответственно. Ткань была эластичной, со стороны кровотока определялась гладкая, блестящая поверхность в независимости от типа биоматериала. Аневризматических расширений заплат не выявлялось, что свидетельствовало о сохранении механической прочности.

3.2. Результаты микроскопического исследования.

3.2.1. Результаты микроскопической оценки криосохраненной жизнеспособной аллоткани через 4 месяца после имплантации.

Сохранение значительного количества живых клеток до имплантации было подтверждено люминесцентной микроскопией с окрашиванием витальными красителями (см. выше).

Во всех криосохраненных жизнеспособных аллоимплантатах через 4 месяца после имплантации определялась следующая гистологическая картина. Внутренняя поверхность заплаты частично выполнена неоинтимой, частично отложениями фибрина в разной степени организации. В неоинтима отмечаются процессы деградации: мало полноценных клеток, разволокнение

новообразованного коллагена, образование сетевидных структур, особенно на границе с имплантатом. В самом имплантате эти сетевидные структуры, которые свидетельствуют о деградации коллагена, так же определяются, но представлены в меньшем количестве. При этом клеточные элементы пикнотичные (сморщенные), все эти явления отмечены ближе к анастомозу. Основная масса имплантата была бесклеточной с неизменной структурой соединительной ткани. Однако также как и в зоне анастомоза, но в гораздо меньшей степени, выявлялись участки сетевидного разрыхления меди, с внедрением фибробластов, новообразованием коллагена и замещением ткани имплантата собственной рубцовой тканью. При этом изменялась архитектура меди, циркулярное расположение волокон заменялось радиальным. В дальнейшем, через год и более, на месте заплат вполне можно ожидать образования собственной соединительной ткани по типу «рыхлого рубца».

Донорские клеточные элементы определялись с трудом и так же были представлены бледными тенями. Иммунные проявления на имплантат были выражены слабо, отмечались лишь единичные небольшие скопления лимфоидных клеток, в области неоинтимы.

Участки с нарушением структуры соединительнотканного матрикса, внедрением клеток из адвентиции так же можно было наблюдать и при люминесцентной микроскопии.

3.2.2. Результаты микроскопической оценки девитализированной криосохраненной аллоткани через 4 месяца после имплантации.

Через 4 месяца после имплантации девитализированная криосохраненная аллогенная ткань по морфологическим признакам имела значительные преимущества, что выражалось в хорошо сформированной неоинтиме по всей площади заплат, в отсутствии отложений фибрина на внутренней поверхности. Сами имплантаты выглядели компактными, выявлялись тени донорских клеток, коллагеновые и эластические волокна были ориентированы

циркулярно и параллельно друг другу, признаков расслоения не выявлялось. В адвентиции большое кол-во vasa vasorum при полной отсутствии клеточной инфильтрации. В области шва морфологическая картина менее благоприятна: имелись признаки кальциноза и участок хрящевой метаплазии – изменения типичные для зоны сосудистого анастомоза, однако макрофагальная и гистио-лимфоидная инфильтрация отсутствовала.

Ту же картину можно было наблюдать при люминесцентной микроскопии: плотная богатая клетками неоинтима, сохранение волокнистой структуры соединительнотканного матрикса и отсутствие клеточной инфильтрации матрикса.

Следовательно, при имплантации девитализированной аллоткани была установлена высокая инертность биоматериала в отношении иммунологических проявлений, в тоже время формирование неоинтимы по всей площади заплаты свидетельствует о более высокой биосовместимости девитализированного алломатериала.

3.2.3. Результаты микроскопической оценки девитализированной криосохраненной ксеноткани через 4 месяца после имплантации.

Во всех эксплантированных образцах определялась следующая микроскопическая картина. На границе ткань-имплантат отмечаются процессы, типичные для имплантации сосудистых биопротезов: зона ишемии в области швов, макрофагальная реакция на шовный материал. На внутренней поверхности заплаты отмечается образование неоинтимы из регенерирующих гладкомышечных клеток реципиента и «наплывание» ее на покрытый фибрином имплантат. Ближе к середине заплаты неоинтима истончается. Здесь возможно отложение свежего фибрина и появление признаков резорбции и дегенерации материала заплатки. В адвентиции в спайках с окружающей тканью выявляются участки резорбции имплантата макрофагами частичное расслоение, васкуляризация, замещение жировой клетчаткой. К этому периоду

донорские клеточные элементы или не определяются, или представлены в виде «бледных теней». Стенка имплантата представлена частично разрыхленными, расслоенными коллагеновыми волокнами, отмечается внедрение макрофагальных тяжей из адвентиции в толщу имплантата. В толще имплантата определяются участки гистио-лимфоцитарной инфильтрации, с активной резорбцией соединительнотканного ксеноматрикса по периферии инфильтрата. Клеточный состав инфильтратов в толще стенки ксеноимплантата был представлен макрофагами, плазматическими клетками и единичными лимфоцитами, что свидетельствовало об иммунной реакции на ксеноматериал.

При люминесцентной микроскопии изменения, описанные выше, выявлялись в той же степени: образование неоинтимы на поверхности ксеноимплантата, нарушение структуры соединительнотканного матрикса ксеноткани и наличие клеточной инфильтрации в его толще.

3.3. Результаты измерения содержания связанного кальция в биоматериале через 4 месяца после имплантации.

При анализе содержания минерализованного кальция в эксплантированных образцах через 4 месяца достоверной минерализации ни в одном виде ткани не выявлено (таб. 1).

Таблица 1. Содержание связанного кальция в различных видах ткани через 4 месяца после имплантации.

	Жизнеспособный аллогraft	Девитализированный аллогraft	Девитализированный ксенографт
До	0,5 ± 0,4 мг/г	0,7 ± 0,6 мг/г	0,8 ± 0,8 мг/г
После	4,5 ± 2 мг/г	1,1 ± 0,9 мг/г	0,9 ± 0,6 мг/г
Р	Отличие не достоверно (P>0.05)	Отличие не достоверно (P>0.05)	Отличие не достоверно (P>0.05)

Выводы:

1. Криосохранение и стерилизация в антибиотиках, как этап технологической схемы изготовления аллогraftов для клинического использования, обеспечивают сохранение нативной структуры соединительнотканного матрикса и значительного количества жизнеспособных клеток, которые после имплантации способны стимулировать развитие иммунного ответа с последующей дегенерацией и дисфункцией аллогraftа.
2. В результате девитализирующей атикальцинозной обработки дигитонином и ЭДТА повреждений соединительнотканного матрикса ткани не выявлялось, при этом происходила полная гибель всех клеток донора.
3. Имплантаты из жизнеспособных криосохраненных аллогraftов продемонстрировали удовлетворительные результаты. Структура матрикса в целом оставалась стабильной. Однако так же выявлены умеренные признаки иммунного ответа и его дегенерации, что при более длительных сроках наблюдения может привести к дегенерации с последующим нарушением функции аллогraftа.
4. Девитализированная аллогенная ткань обладает благоприятными свойствами для использования в сердечно-сосудистой хирургии. Над всей поверхностью заплаты происходило новообразование сложной тканевой структуры из эластических и коллагеновых волокон и жизнеспособных клеток, составляющих неоинтиму. Соединительнотканый матрикс оставался устойчивым к дистрофическим изменениям и был полностью инертным, не вызывая развития иммунного ответа.
5. Девитализирующая атикальцинозная обработка не обеспечивает достаточной стабилизации ксеногенной ткани аорты. При экспериментальной имплантации сроком на 4 месяца происходили выраженные дегенеративные изменения в соединительно-тканном матриксе имплантата, вследствие развития иммунной реакции.

6. В сроки до 4-х месяцев после имплантации всех видов тканей значимой миграции интерстициальных клеток реципиента в толщу пересаженной ткани наблюдалось, а донорские клетки и их элементы в эти сроки не выявлялись.

Практические рекомендации:

1. Модель имплантации заплаты со створкой из клапанного аллогraftа в грудную аорту собаке является воспроизводимой и информативной для оценки в длительные сроки после имплантации. Для определения дальнейшей судьбы створок имплантатов необходимо усовершенствование экспериментальной модели путем создания механизма нагрузки на створку.
2. Для предотвращения развития иммунного ответа на ксеногенную ткань необходимо использовать более агрессивные методы обработки. Необходимо добиваться полного удаления клеток и их фрагментов, стараясь при этом минимально воздействовать на соединительнотканый матрикс. Также в будущих исследованиях необходимо исследовать собственную иммуногенность соединительнотканного ксеногенного матрикса.
3. При исследовании девитализированного криосохраненного алломатериала в хроническом эксперименте на модели собаки клетки донора к 4-м месяцам после имплантации не выявлялись и признаки развития иммунного ответа отсутствовали. Учитывая это можно заключить, что при обработке аллогенных тканей для предотвращения иммунного ответа достаточно ограничиться девитализацией, а не пытаться достичь полного удаления клеток донора из ткани.
4. При сравнении в эксперименте тканей аллогенного и ксеногенного происхождения девитализированных дигитонином и ЭДТА получены противоположные результаты. Это говорит о необходимости использования различных способов обработки гетерогенных и аллогенных материалов.

5. Учитывая факт, что матрикс девитализированной аллогенной ткани оставался практически полностью бесклеточным в сроки до 4-х месяцев, в будущих экспериментальных исследованиях необходимо оценить методы, ускоряющие миграцию клеток реципиента в имплантат.

Список научных работ по теме диссертации.

1. Бритиков Д.В., Муратов Р.М., Сачков А.С., Акатов В.С., Милованова З.П., Лосева С.В., Новикова С.П. «Экспериментальная оценка технологии девитализации алло- и ксенографтов» // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». Материалы XI ежегодной сессии НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН с Всероссийской конференцией молодых ученых. –Москва.-2007.-Том 8.№3-С.203.
2. Бритиков Д.В., Сачков А.С., Милованова З.П., Лосева С.В., Новикова С.П., Муратов Р.М. «Гистологическая и прочностная оценка технологии девитализации аллогraftов» // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». Материалы XII Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. –Москва.-2006.-Том 7.-№5.-С.287.
3. Макаренко В.Н., Муратов Р.М., Александрова С.А., Сачков А.С., Титов Д.А., Карасева М.А. «Компьютерная томография в оценке состояния биопротезов после операции Росса» // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». Материалы XII Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. –Москва.-2006.-Том 7.-№5.-С.241.
4. Муратов Р.М., Аль-Хаджабед Х.Ф., Бритиков Д.В., Бабенко С.И., Сачков А.С., Бокерия Л.А. «Реконструкция выводного отдела правого желудочка при помощи клапансодежающих биопротезов при операции Росса». // «Грудная и сердечно-сосудистая хирургия». -2005.-№3.-С.26-29.
5. Муратов Р.М., Аль-Хаджабед Х.Ф., Бритиков Д.В., Макаренко В.Н., Акатов В.С., Сачков А.С., Бокерия Л.А. «Первый опыт использования бесклеточных бескаркасных аллогraftов» // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». Материалы IX ежегодной сессии НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН с Всероссийской конференцией молодых ученых. –Москва.-2005.-Том 6.№3.-С.24.
6. Муратов Р.М., Аль-Хаджабед Х.Ф., Сачков А.С., Бритиков Д.В., Макаренко В.Н., Бабенко С.И., Джангулян Н.Г., Соболева Н.Н. «Оценка функции бесклеточных бескаркасных аортальных аллогraftов с

- помощью ЭХОКГ и КТ». // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». Материалы XI Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. –Москва.-2005.–Том 6.-№5.–С.46.
7. Сачков А.С. «Модель для экспериментальной оценки биологических клапанов сердца, созданных с использованием тканевой инженерии» // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». Материалы XII Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. –Москва.-2006.-Том 7.-№5.-С.303.
 8. Сачков А.С., Муратов Р.М., Бритиков Д.В., Акатов В.С., Милованова З.П., Хаммуд Ф.А., Мацонашвили Т.Р. «Экспериментальная оценка девитализированной ксеноткани в системном кровотоке» // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». - 2008.-Том 9.-№1.-С.88-94.
 9. Сачков А.С., Муратов Р.М., Бритиков Д.В., Акатов В.С., Милованова З.П., Хаммуд Ф.А., Мацонашвили Т.Р. «Экспериментальная оценка девитализированной ксено- и аллоткани в системном кровотоке» // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». Материалы XIII Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. –Москва.-2007.-Том 8.-№6.-С.306.
 10. Сачков А.С., Муратов Р.М., Бритиков Д.В., Акатов В.С., Милованова З.П., Хаммуд Ф.А., Мацонашвили Т.Р. «In vivo репопуляция ксеногенного бесклеточного матрикса в системной циркуляции» // Бюллетень НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». Материалы XI ежегодной сессии НЦССХ им.А.Н.Бакулева РАМН с Всероссийской конференцией молодых ученых. –Москва.-2007.-Том 8.№3-С.201.
 11. Сачков А.С., Муратов Р.М., Бритиков Д.В., Акатов В.С., Хаммуд Ф.А., Мацонашвили Т.Р. «Модель для экспериментальной оценки биологических клапанов сердца, созданных с использованием тканевой инженерии». // «Грудная и сердечно-сосудистая хирургия». -2007.-№1.-С. 28-31.