



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68379** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61L 27/00
A01N 1/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 10193	(72) Винахідник(и): Сандомирський Борис Петрович (UA), Бизов Денис Володимирович (UA), Михайлова Ірина Павлівна (UA), Синчикова Ольга Петрівна (UA), Пугачов Генрих Демидович (UA), Довбня Анатолій Миколайович (UA), Пушкова Євгенія Миколаївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.08.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.03.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.03.2012, Бюл.№ 6	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)

(54) СПОСІБ ПІДГОТОВКИ КСЕНОГЕННИХ АРТЕРІЙ ДЛЯ СУДИННОГО ПРОТЕЗУВАННЯ

(57) Реферат:

Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування включає обробку нативних ксеногенних судин фактором, що впливає на структуру стінки ксенососудини. Обробку біоматеріалів здійснюють шляхом заморожування при температурі з наступним опроміненням потоком електронів.

UA 68379 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до способів виготовлення судинних протезів з ксеногенних артерій, призначених для пластики артерій малого і середнього діаметра.

Ефективне лікування атеросклеротичних уражень судин і судин різних локалізацій при органних трансплантаціях стало можливим лише з розвитком протезування кровоносних судин. Незважаючи на те, що в даний час створені надійні судинні протези для аорти та артерій крупного (>10 мм) калібру, як і раніше гостро стоїть проблема протезування артерій малого (<6 мм) і середнього (<8 мм) діаметрів. Ксеногенні біологічні протези мають високі імплантаційні і біомеханічні властивості, зберігають архітектоніку і конфузорність нативної артерії, нульову хірургічну порозність, тому метод ксенопротезування артеріальних судин може знайти широке застосування в клініці після розробки нових підходів і способів зниження імунного конфлікту та адаптації трансплантата до тканин реципієнта.

Відомий спосіб виготовлення ксенопротезів із сегментів трахеобронхіального дерева птахів, призначених для пластики артерій малого та середнього діаметру, що включає ферментативну обробку терилітином протягом 4-6 год. при 40-45 °С і при витраті ферменту 40-50 ПЕ на 1 г сухої речовини трахеї. До і після ферментативної обробки здійснюють сольові обробки 2-10 % розчинами NaCl протягом 30-35 хв. Після другої сольової обробки очищають поверхню протеза від м'язових структур і обробляють 0,25-0,5 % розчинами глутарового альдегіду протягом 24-30 діб при температурі від -4 до + 10 °С з щотижневою заміною розчину [1].

Відомий спосіб передімплантаційної підготовки ксеноперикардіальної тканини телят і асосудів шляхом обробки біотканини в розчині глутарового альдегіду і поверхнево-активної речовини. При обробці останнім проводять інтенсивне струшування робочого розчину при багаторазовій його зміні [2].

Відомий спосіб підготовки біотканини для ксенопротезування, зокрема для протезування клапанів серця. Після ферментативної обробки та відмивання біотканини послідовно поміщають в 0,10-0,15 % - і 0,25-0,35 % розчини глутарового альдегіду в боратному буфері при температурі 5-25 °С. Потім витримують в більш насиченому розчині, триразово замінюючи його, і стерилізують [3].

Проте всі ці способи мають спільний недолік, який обмежує їх застосування. Відбувається зниження біомеханічних властивостей судин в результаті ферментативної обробки, яка проводиться для руйнування клітинних елементів (імуногенних компонентів), дублення тканини і її структурної стабілізації. В результаті протез здобуває «твердість» і втрачає еластичні властивості. Надлишок глутарового альдегіду може також привести до додаткової мінералізації біотканини - кальцифікації.

Відомий спосіб підготовки донорської сполучної тканини для формування багатосудинного регенерату, що є галогенним тканинним трансплантатом. Донорську тканину послідовно протягом 6-12 годин обробляють аніонними та катіонними детергентами, вибраними з групи (додецилсульфат натрію, цетилпіридин хлориду, Твін-80, Тритон X-100). Потім протягом 1-3 годин обробляють речовинами, які екстрагують жир і коагулюють білки (діетиловий ефір + етиловий спирт) з метою мембранолізу. Обробку проводять при одночасному контролі за розблокуванням зв'язків протеогліканів і глікопротеїнів у пучках колагенових волокон і елімінацією глікозаміногліканів. Після досягнення 90 %-го розблокування зв'язку протеогліканів і глікопротеїнів та не більше 50 %-ої елімінації глікозаміногліканів обробку припиняють. Модифікована таким чином структура біоматеріалу дозволяє істотно знизити антигенні властивості, зберігаючи при цьому фізико-механічні властивості первісної донорської тканини. Біоматеріал відмивають від реагентів, фасують у скляні флакони, заливають консервантом і проводять радіаційну стерилізацію з використанням прискорювача електронів [4].

Недоліком цього способу є те, що обробка детергентами не забезпечує розчинення клітинних мембран сполучної тканини, в якій клітини замуrowані між щільно упакованими пучками колагенових волокон, і тому потрібно попереднє порушення цілісності клітинної стінки, то істотно ускладнює технологію обробки тканин і отже використання способу в серійному виробництві. Крім цього реагенти, застосовані для обробки біоматеріалу, є токсичними, внаслідок чого потрібно тривале (до 36 год.) відмивання тканини, і при цьому не гарантується відсутність токсичного впливу біоматеріалів після імплантації.

Найбільш близьким до заявленого способу за своєю суттю та ефекту, що досягається, є спосіб підготовки біоматеріалів для серцево-судинної хірургії. Як біоматеріал для виготовлення ксенопротезів в способі використовують внутрішні грудні артерії і перикард великої рогатої худоби. Біоматеріал обробляють консервуючим 2-5 % розчином епоксисполук при pH 3,0-11,0 і при температурі 4-45 °С протягом 2-21 доби. Потім промивають і обробляють розчином хлоргексидину з концентрацією не менш 1 % при pH 3,0-8,0 і температурі 15-45 °С протягом 2-

16 год., знову промивають і обробляють повторно консервуючим розчином. Повторну обробку здійснюють протягом 1-3 діб [5].

Істотним недоліком цього способу є те, що він передбачає обробку ксеноматеріалів хімічними реагентами, які погіршують якість ксенобіопротезів і підвищують ризик ускладнень після імплантації в судинне русло.

Загальною закономірністю взаємодії епоксидних препаратів і біоматеріалу є хімічна основа утворення інтра- і інтермолекулярних поперечних зв'язків за рахунок зшиваючої активності фібрилярних білків при фіксації нативного біоматеріалу. Це забезпечує більш компактне розташування колагенових волокон в ксеногенних тканинах і структурну цілісність ксенотрансплантата, але при цьому призводить до погіршення фізико-механічних властивостей ксенобіопротезів. Знижуються міцнісні характеристики і пластичні властивості ксеноматеріалу, що є критичним для судинних біопротезів.

Ксенобіопротези, отримані зазначеним способом, після імплантації можуть викликати ускладнення, пов'язані з токсичним впливом на організм реципієнта. Навіть після тривалого, ступінчастого відмивання біоматеріалу не гарантується відсутність токсичного впливу, оскільки складно контролювати ступінь та повноту відмивання. Разом з тим в результаті хімічної обробки ксеноматеріалу підвищується ймовірність додаткових процесів мінералізації за рахунок утворення відкладень що містять кальцій на поверхні або в об'ємі трансплантата, що пов'язано з утвореними при взаємодії імплантату з середовищем організму структурами: тромбами, капсулою псевдоінтими. Серед ускладнень переважають тромбози, найбільш частими причинами яких є неспроможність шляхів «відтоку», прогресування облітеруючого захворювання та наявність виражених неоінтимальних стенозів зони анастомозу.

В основу корисної моделі поставлена задача створення такого способу підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування, в якому б, шляхом застосування фізичних чинників, забезпечувалася можливість виключити використання хімічних реагентів і тим самим підвищити якість одержуваного ксенобіопротеза та знизити ризик ускладнень після імплантації.

Ця задача вирішується тим, що у відомому способі підготовки біоматеріалів для серцево-судинної хірургії, що включає обробку нативних ксеногенних судин фактором, що впливає на структуру стінки ксенососудини, згідно з корисною моделлю, обробку біоматеріалів здійснюють шляхом заморожування при температурі -196°C з наступним опроміненням потоком електронів в діапазоні доз від 25 до 50 КГр.

Ксенобіопротези, виготовлені запропонованим способом, забезпечують збереження пластичних і міцнісних характеристик на рівні нативних ксеносудин, що перевершує такі характеристики судин, оброблених за способом - найближчим аналогом. Пластичні характеристики ксенобіопротеза знаходяться в межах варіабельності нативних артерій. Заморожування з наступним опроміненням ініціює формування поперечних кросслінкінг-зв'язків між волокнами колагену, що додає імплантату міцність. Вплив низьких температур селективно підвищує механічну міцність судин в поздовжньому напрямку, а опромінення електронами підвищує міцність в радіальному напрямку. Фізико-механічні властивості пропонованого протеза близькі до артерій еластичного типу людини.

Ксенобіопротези після глибокого заморожування і опромінення потоком електронів є нетоксичними щодо організму реципієнта, що знижує ризик виникнення ускладнень після імплантації. Крім того, відсутність хімічної природи обробки ксеноматеріалу дозволяє виключити етапи відмивання і істотно скоротити терміни виготовлення ксенобіопротезів для судинного протезування. У заявленому способі не створюються додаткові передумови для локального накопичення кальцію, які обумовлені методом хімічної модифікації біоматеріалу. Це дозволяє запобігти процеси мінералізації, які призводять до втрати функціональних властивостей біопротезів.

Кріодія низьких температур частково знижує імуногенність біологічних тканин, що пов'язано зі зміною поверхневих клітинних антигенів під впливом процесів заморожування-відігрівання. Під дією іонізуючого опромінення відбувається ініціація молекулярних механізмів інтерфазної загибелі клітин. Комплексне використання фізичних факторів забезпечує зниження антигенних властивостей ксенотрансплантатів, при цьому уражуються основні мішені імуногенності - відбувається повна деендотелізація і руйнування гладком'язових клітин (ГМК) в судинному матриксі. Це дає можливість отримати біологічно інертний матеріал при максимальному збереженні структурної цілісності сполучнотканинних волокон. Збереження колагено-еластинових волокон в ксенобіопротезі значною мірою визначає його більш ніж достатню міцність і пластичність.

Крім того іонізуюче опромінення забезпечує повноцінну вірусну і бактеріальну стерилізацію, на відміну від звичайної обробки розчинами антисептиків, в тому числі хлоргексидином.

На фігурі 1 показана «Механічна міцність ксеноартерій в поздовжньому напрямку, N (strength-test), n=50, p<0,05».

На фігурі 2 показана «Механічна міцність ксеноартерій в радіальному напрямку, КПа (burst-test), n=50, p<0,05».

На фігурі 3 показані «Механічні властивості артеріальної стінки свині після різних фізичних впливів». Вказані середні значення. (В групі нативних артерій дані наведені у вигляді: середнє значення \pm стандартна девіація).

На фігурі 4 показані артерії свині. Забарвлення гематоксилином і еозином, x200. А – нативна артерія; В – артерія після заморожування та опромінення в дозі 25 КГр; С – артерія після заморожування та опромінення в дозі 50 КГр (1 – ендотеліальний шар; 2 - Сполучнотканинні і м'язові волокна та ядра ГМК).

На фігурі 5 показані фрагменти зруйнованих ГМК (стрілка), розташованих між двома збереженими еластичними мембранами (ЕМ), в медії ксеноартерії після заморожування та опромінення дозою 50 МГр.

Спосіб здійснюють таким чином.

Нативні внутрішні грудні артерії свині ретельно препарують, тричі промивають охолодженим до +4 °С стерильним фізіологічним розчином з додаванням антибіотиків, поміщають у стерильні кріостійкі контейнери та заморожують шляхом занурення в пари рідкого азоту (-196 °С). Після відігрівання на водяній бані їх опромінюють потоком електронів. Режим опромінення здійснюють в діапазоні доз від 25 КГр до 50 КГр, дискретно, розподіливши в часі. У процесі опромінення температуру зразків контролюють, щоб вона не перевищувала 25 °С. Стерильні контейнери з ксенобіопротезами зберігають до використання в рідкому азоті або морозильній камері.

Приклад.

Для приготування ксенобіопротеза використовували внутрішні грудні артерії (a. thoracica interna) 6-8-місячних безпорідних свиней. Артерії виділяли протягом 20 хв після забою, при дотриманні правил асептики і максимально атравматично. Артерії ретельно препарували, видаляли жирові привіски і надлишки сполучної тканини збоку адвентиціальної оболонки. Внутрішній діаметр виділених артерій варіював від 2,5 до 5 мм, довжина - від 5 до 10 см. Судини тричі промивали охолодженим до +4 °С стерильним фізіологічним розчином з додаванням антибіотиків. Промиті артерії поміщали в стерильні кріостійкі контейнери ("Eurotubo, Deltalab", Spain), при цьому не допускали перегину судин. У подальшому пробірки занурювали в пари рідкого азоту, де і зберігали. Часовий інтервал від моменту виділення артерій до заморожування не перевищував 4 годин. Відігрівання пробірок здійснювали на водяній бані. За допомогою лінійного прискорювача електронів «ЛУЭ-2000» їх опромінювали потоком електронів в діапазоні доз від 25 КГр до 50 КГр. З метою додаткової мінімізації шкідливої дії опромінення на колагеновий судинний каркас, опромінення здійснювали дискретно, розподіливши в часі. У процесі опромінювання контролювали температуру зразків (не вище 25 °С). Стерильні контейнери з артеріями після опромінення зберігали в морозильній камері.

Фізико-механічні параметри біоматеріалу в значній мірі впливають на фізіологічні аспекти функціонування ксенобіопротеза, включаючи процеси фагоцитозу, гемоциркуляції і клітинної адгезії і залежать, в основному, від взаємного розташування, структурної цілісності і молекулярних конформацій колагенових і еластинових волокон судинної стінки. Визначення міцності в поздовжньому напрямку (strength-test) і пластичності оброблених артерій проводилося на універсальному деформуючому пристрої FP 100/1 (VEB TIW Rauenstein, Germany). Вивчення міцності артерій в радіальному напрямку (burst-test) проводили на пристрої, що складається з ресивера з електронним датчиком тиску MPX-5700DP (Freescale Semiconductor, China). Статистичні дані оцінювалися за універсальним критерієм Манна-Уїтні за допомогою програми SPSS 17. Відмінності вважалися достовірними при p<0,05. Кількісні дані представлені у вигляді середніх величин і стандартних девіацій. Діаграми і графіки вибудовували і обробляли за допомогою програм Origin Pro8, Microsoft Excel 2007. Фізико-механічні властивості ксенобіопротезов, оброблених заявленим способом, представлені на фіг. 1-3.

Визначення міцності в поздовжньому напрямку продемонструвало, що міцність заморожених-опромінених ксеноартерій не відрізняється від групи нативних артерій (фіг. 1). Вимірювання міцності в радіальному напрямку продемонстрували статистично значуще збільшення міцності заморожених-опромінених артерій у порівнянні з нативними судинами (фіг. 2). Цей показник є важливим, тому що він характеризує фізіологічний різноспрямований векторний розподіл деформуючих сил, який моделює тиск крові.

Показники стрес-деформації характеризують пластичність матеріалу, що є важливим параметром біологічних об'єктів, що містять сполучну тканину. На фіг. 3 наведені усереднені по

всіх виміряних зразкам криві залежностей напруга-деформація нативних і оброблених артерій. Як видно, всі криві мають характерну для сполучнотканинних структур форму, з чітко диференційованими ділянками, відповідними в'язкому ходу і пружній деформації, що є проявом подовження волокон колагену. Початковий етап деформації артерій характеризується значним подовженням при малих навантаженнях, що переважно пов'язано з ковзанням фібрил відносно одна до одної (в'язка течія). Наступний, більш крутий відрізок кривої характеризує подовження волокон колагену і є лінійним (пружна деформація). Відзначалась наявність широкої варіабельності показника пружності в групі нативних судин. При цьому крутизна областей пружної деформації, що характеризує пластичність судинної стінки порівнянна, у всіх досліджуваних групах артерій. Показники пружності артерій на етапах підготовки біопротеза знаходились в межах варіабельності нативних артерій (фіг. 3). Відносну деформацію судинної стінки вираховували за формулою:

$$e = \frac{L_1 - L}{L} * 100 \%$$

де

L - первісна довжина артеріального сегмента; L₁ - довжина деформованого артеріального сегмента при певному навантаженні.

Морфологічну структуру ксеносудин досліджували методом світлової мікроскопії з фарбуванням препаратів різними способами: гематоксилін-еозином - для аналізу клітинних структур, пікрофуксином за Ван-Гізона - для оцінки структури колагенових волокон. Після заморожування та опромінення в дозі 25 КГр виявлені великі ділянки десквамації (злущування) ендотелію і деформовані ядра гладком'язових клітин (ГМК). Після опромінення в дозі 50 КГр ендотелій не визначався, відзначалась наявність сегментованих і деформованих ядер ГМК, що вказує на інтерфазну загибель клітин. Структурна цілісність судинної стінки і просторова орієнтація сполучнотканинних волокон зберігалися у всіх досліджуваних зразках. Після заморожування і наступного опромінення в обох групах виявлено збереження архітекτονіки судинної стінки за рахунок збереження структури екстрацелюлярного сполучнотканинного матриксу. Сполучнотканинні волокна нативних артерій мали виражену звивистість. Після обробки ксеноартерій відзначалося зниження звивистості, ущільнення і потовщення волокон (фіг. 4). Описані зміни сполучної тканини демонструють формування поперечних зшивок між окремими волокнами колагену (поява додаткових С-С зв'язків), що візуально проявляється у вигляді їх компактного розташування. Базальна мембрана після опромінення залишалася інтактною.

Ультраструктурний аналіз судинної стінки артерії свині після заморожування в рідкому азоті і опромінення потоком електронів з дозами 25 КГр і 50 КГр свідчив про глибокі деструктивні зміни клітинних компонентів тканин. В обох випадках весь ендотеліальний шар зазнав десквамації (відлущення). У більшій частині відлущених ендотеліальних клітин виявлено явні ознаки деструкції. Підендотеліальний шар представлений пухкою сполучною тканиною, яка містить розволочнені колагенові волокна (КВ). Спостерігалися локальний лізис плазмолем і фрагментація базальних мембран ГМК. При опроміненні в діапазоні доз 25-50 КГр в медії артерії виявлялася значна кількість сильно зруйнованих ГМК і великих електронно-світлих порожнин, що містять клітинний детрит. Зони прикріплення КВ до еластинових мембран (ЕМ) практично не пошкоджені. Встановлено, що каркасні структури (еластичні мембрани і пов'язані з ними пучки колагенових волокон) більш стійкі до використовуваних впливів і менш схильні до структурної деградації (фіг. 4). Отримані електронно-мікроскопічні дані добре корелюють з результатами, що стосуються збільшення міцності артерій в поздовжньому і радіальному напрямках. Міцнісні властивості значною мірою пов'язані з частковим або повним руйнуванням ГМК, що забезпечують в початковому стані нативно просторовий розподіл і утримання каркаса. Руйнування клітин м'язового шару призводить до утворення внутрішніх порожнин в міжмембранному просторі, забезпечуючи можливість зближення еластичних мембран, що призводить до підвищення структурної жорсткості судинної стінки. Крім того, значний вплив на пластичні властивості артерій має розпушення колагенових пучків, внаслідок зміни міжбілкових взаємодій за рахунок формування поперечних зшивок молекул колагену.

Для вивчення ступеня імуногенності оброблених артерій виконували їх імплантацію під шкіру щурам лінії Вістар. Дослідження проводилися на 80 самках, віком 2 міс. В експерименті вивчали такі групи артерій: а) заморожені-відігріті судини, б) заморожені-відігріті судини, опромінення 25 КГр; в) заморожені-відігріті судини, опромінення 50 КГр. Групою контролю були нативні артерії свині. На термінах 3, 7, 14 доби, 4 і 8 тижнів після операції тварин виводили з експерименту, імплантовану ділянку артерії витягували. Оцінювали макроскопічну реакцію тканин на імплант. З метою оцінки вираженості клітинної інфільтрації виконували гістологічне

дослідження вилучених зразків. На всіх термінах спостереження у заморожених і опромінених артерій інфільтрація судинної стінки і оточуючих тканин була відсутня. Через 8 тижнів після імплантації заморожені і опромінені артерії зберігали структурну цілісність, зазначалося їх заселення клітинами фібробластичного ряду, що свідчить про процес ремоделювання біоматеріалу. При цьому процеси біодеградації не визначалися. Реакції запалення і відторгнення в них, а також в навколишніх імплант тканинах відсутні.

Для вивчення функціональності і біосумісності підготовлені заявленим способом ксенобіопротези діаметром 2,5-3,0 мм і довжиною 15-25 мм імплантували в черевну аорту кролика. Дослідження проводили на безпородних кролях віком 2 роки, масою 3,2-4,5 кг. Виконано 12 операцій судинного протезування. Термін спостереження склав 270 діб, до кінця якого всі протези зберігали прохідність. Вже на 7 добу починалися процеси формування ендотеліальної вистілки в зоні анастомозу, а за 4 тижні відбувалося утворення та поступова ендотелізація внутрішньої вистілки ксенотранспланта, що перешкоджало розвитку пізніх тромбозів. На місці імплантації були відсутні ознаки відторгнення і макрофагальної інфільтрації. Всі протези виявилися прохідними. Утворення нової зовнішньої сполучнотканинної капсули не призводило до появи жорсткості стінки транспланта у віддалені терміни після операції. Ознаки кальцинозу судинної стінки не спостерігалися.

Таким чином, ксенобіопротези, отримані після обробки заявленим способом, зберігають каркасність і архітектоніку судинної стінки, мають міцність і високу пластичність, біологічну інертність, нульову хірургічну порозність, а також відмінні імплантаційні властивості.

Джерела інформації:

1. Пат № 2026618, РФ. А61N 1/00, Публ: 20.01.1995 Спосіб изготовления сосудистого ксенотранспланта.

2. Пат № 2120212, РФ. А01N 1/02, Публ: 20.10.1998 Спосіб предимплантационной обработки биологических протезов сосудов и клапанов.

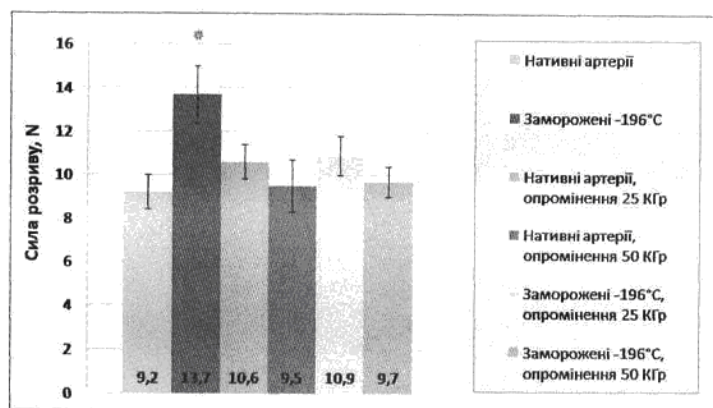
3. Пат № 2151505, РФ. А01N 1/00, А61L 2/16, Публ: 27.06.2000 Спосіб подготовки биоткани для ксенопротезирования.

4. Пат № 2189257, РФ. А61L 27/00, А01N 1/00, Публ: 20.09.2002 Биоматериал аллоплант для регенеративной хирургии.

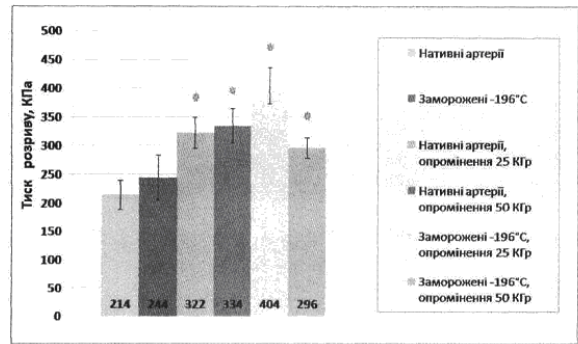
5. Пат № 2196424, РФ. А01N 1/02, Публ: 20.01.2003 Спосіб обработки биоматериалов для сердечно-сосудистой хирургии (наиблизчий аналог).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

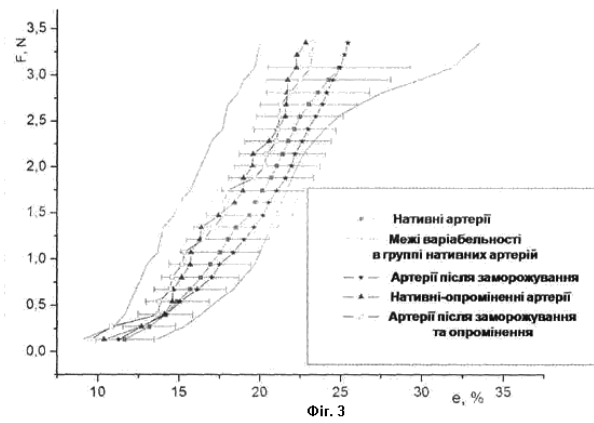
Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування, що включає обробку нативних ксеногенних судин фактором, що впливає на структуру стінки ксенососудини, який **відрізняється** тим, що обробку біоматеріалів здійснюють шляхом заморожування при температурі -196 °С з наступним опроміненням потоком електронів в діапазоні доз від 25 до 50 КГр.



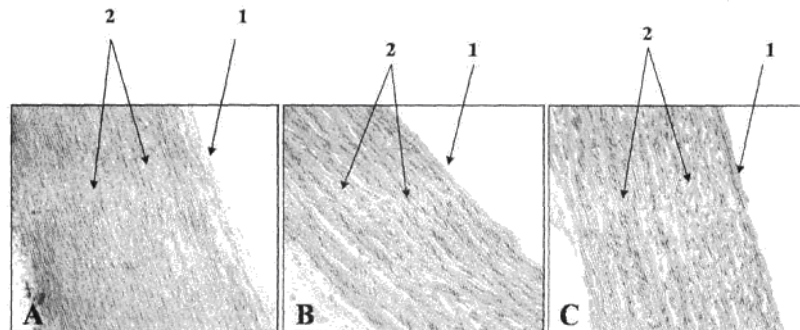
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

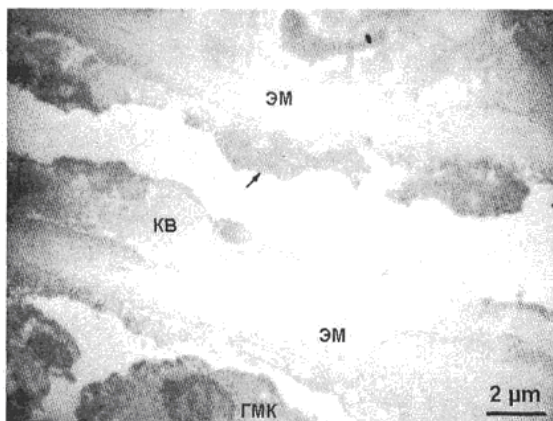


Fig. 5

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601