

Карагандинский государственный медицинский университет

УДК 617.55-007.43

На правах рукописи

БАДЫРОВ РУСЛАН МУРАТОВИЧ

**Экспериментальное обоснование применения внеклеточного матрикса
ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки**

6D110100 – «Медицина»

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные руководители:
кандидат медицинских наук, профессор
Абатов Нуркаси Тулепбергенович
доктор медицинских наук, профессор
Тусупбекова Майда Масхаповна
Научный консультант:
доктор PhD,
Альбертон Иосиф Натанович

Республика Казахстан
Караганда, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Применение эндопротезов при герниопластике	13
1.2 Роль биологических имплантатов в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки	15
1.2.1 Матрично-пластические материалы природного происхождения	16
1.2.2 Матрично-пластические материалы на основе донорских тканей	18
1.2.3 Материалы на основе ксеногенной брюшины	20
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Разработка опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины	23
2.1.1 Методика изготовления опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины	23
2.1.2 Стерилизация γ -излучением и микробиологический контроль полученных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины	24
2.1.3 Методы морфологической оценки образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины	26
2.2 Экспериментальное исследование применения образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины	26
2.2.1 Материалы исследования	26
2.2.2 Морфологические методы изучения гистоструктуры зоны имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины с тканями передней брюшной стенки экспериментальных животных	27
2.2.2.1 Дизайн исследования	27
2.2.2.2 Имплантация биологических материалов	28
2.2.2.3 Забор материала у экспериментальных животных	30
2.2.2.4 Гистологическая количественная оценка клеточного инфильтрата	31
2.2.2.5 Гистологическая оценка активности и степени созревания соединительной ткани	31
2.2.3 Методы оценки спаечного процесса после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»	32
2.2.4 Методы изучения биомеханических свойств внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»	33
2.2.5 Методы статистической обработки данных	35
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
3.1 Результаты морфологической оценки образцов недецеллюляризированной ксеногенной брюшины	36

3.2	Результаты морфологической оценки образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины	37
3.3	Результаты стерилизации образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины	38
3.4.	Результаты экспериментального исследования применения образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины	40
3.4.1	Оценка состояния экспериментальных животных после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»	40
3.4.2	Оценка локального статуса	41
3.4.3	Макроскопическая оценка периимплантационной зоны	42
3.4.4	Результаты оценки спаечного процесса после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»	44
3.4.5	Результаты исследования морфологической картины взаимодействия внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» с тканями передней брюшной стенки экспериментальных животных	48
3.4.6	Результаты изучения биомеханических свойств внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»	66
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	69
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	73
	ПРИЛОЖЕНИЯ	79

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления;

ГОСТ 3813-72 Межгосударственный стандарт. Методы определения разрывных характеристик при растяжении;

ГОСТ 938.11-69 Межгосударственный стандарт. Метод испытания на растяжение.

Постановление Правительства РК с изменениями и дополнениями от 07.08.2012г №1030, пункт 52. Утилизация лабораторных животных по окончании проведения лабораторных исследований.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Децеллюляризация – это процедура, в ходе которой клетки того или иного органа уничтожаются, и на их месте остается лишь каркас из соединительной ткани.

Детергент – вещества, используемые в биологических и биохимических лабораториях, представляют собой мягкие поверхностно-активные вещества (поверхностно-активные реагенты), которые используются для разрушения мембраны клеток (лизиса клеток) и трансформации внутриклеточного материала в растворимую форму.

Внеклеточный матрикс – внеклеточные структуры ткани, представленные в большинстве своем гликопротеинами (коллагеном). Составляют основу соединительной ткани, обеспечивая механическую поддержку клеток и транспорт химических веществ.

Имплантат – класс изделий медицинского назначения, используемых для вживления в организм в роли протезов.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- ВКМ – внеклеточный матрикс
PTFE – политетрафторэтилен
ТИК – тканеинженерные конструкции
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ПИ – повидон-йод
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
ПЦР – полимеразная цепная реакция
LAL-тест – (Лизат амебоцитов *Limulus*), чувствительный и специфичный набор для определения и измерения бактериального эндотоксина, вызывающего лихорадку продукта грам-отрицательных бактерий
КРС – крупный рогатый скот

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. За последние 20 лет имплантируемые хирургические сетки, применяющиеся для реконструкции передней брюшной стенки претерпели большие изменения в попытке улучшить результаты хирургической коррекции грыж живота. Имплантаты эволюционировали от однослойных синтетических материалов до двухслойных сетчатых протезов и биологических материалов, получаемых в виде трансплантатов от человека и животных. Бесперывный поиск и разработка эффективных протезирующих материалов возникает из клинической необходимости создания имплантата, который обладал бы способностью ремоделировать нативные ткани организма хозяина. Так, долгое время общепринятым положением считалось применение сеток в случаях реконструкции больших дефектов передней брюшной стенки, однако, несмотря на то, что синтетические материалы постоянно улучшались по комплексу признаков, не решенным оставался вопрос большого числа рецидивов грыж [1, с. 578-579].

Несмотря на успехи в хирургической технике и эволюции имплантируемых сеток, отдаленные результаты, в том числе продолжительность пребывания имплантата, необходимость повторных операций, частота рецидивов, не привели к желаемым результатам с течением времени [2, с. 129-131]. Более того, в ряде работ указывается, что риск развития несостоятельности послеоперационной раны, нагноение, формирование сером в разы выше при пластике грыжевых ворот с применением синтетических материалов, чем при других чистых общехирургических вмешательствах [3, 4, с.78-79, 5]. Приведенные в литературе данные свидетельствуют о том, что у пациентов, имеющих в анамнезе нагноение раны, в случае применения сетчатого имплантата риск развития раневых осложнений возрастает до 41%, в то время как пациенты с «чистой историей» подвержены риску только в 12% случаях грыжесечения [4, с. 80-84].

Таким образом, пластика грыжевых ворот с применением сетчатых эндопротезов, равно как и другие хирургические манипуляции на передней брюшной стенке сохраняют высокий риск развития раневых осложнений, в том числе инфицирование. При этом отмечено, что, несмотря на значительные успехи в методиках и технологиях герниопластики, частота рецидивов остается на высоком уровне.

Приводимые рядом автором данные рандомизированных исследований свидетельствуют о том, что рецидив грыж передней брюшной стенки после герниопластики синтетическим протезом в среднем возникал в течение 3 лет [1, с. 580-583]. Более того, риск развития рецидива повышается после каждого дополнительного хирургического вмешательства. Научная группа во главе Flum et al. в своем исследовании привели данные, что у пациентов, перенесших герниопластику с применением синтетического имплантата, в 12% случаев отмечается повторная операция по поводу рецидива в течение 5 лет после первой; продолжительность промежутка между повторными операциями

стремительно сокращается после дополнительного хирургического вмешательства. В период 5-летнего наблюдения повторное хирургическое лечение потребовалось в 24% случаев после первой операции, в 35% случаев – после повторной операции, в 39% случаев – после трех повторных операций [2, с. 132-135]. Полученные автором результаты подчеркивают важность минимизации риска развития рецидивов с последующими повторными операциями, посредством использования лучших доказательно-обоснованных подходов к герниопластике с применением имплантатов.

Сложившаяся ситуация побудила поиск оптимальных пластических материалов для проведения успешной пластики дефектов передней брюшной стенки. Искомый материал с более благоприятными свойствами, чем традиционные сетчатые имплантаты может оказать существенное влияние на хирургическую практику и исходы лечения пациентов.

В связи с этим можно считать, что оптимальный вариант пластического материала для герниопластики должен отвечать следующим требованиям:

- быть нетоксичным, не вызывать хронического воспаления и иммунного отторжения, быть устойчивым к инфекции после имплантации.

- полностью ремоделировать поврежденный участок с сохранением механических и биологических свойств ткани организма хозяина. Данный имплантат должен представлять своего рода биологический тканевой каркас и способствовать ревакуляризации, инфильтрации клетками макроорганизма, без инкапсулирования и формирования сером.

- сохранять свою прочность и оригинальную площадь поверхности во время ремоделирования, без сокращения размеров имплантата.

- не вызывать негативную системную или местную реакцию, равно как и представлять опасность риска передачи заболеваний.

- быть устойчивым к формированию спаек брюшной полости, лимитировать риск развития спаечной кишечной непроходимости, и при необходимости обеспечить беспрепятственный доступ в брюшную полость при последующих лапаротомиях.

Научный поиск новых пластических материалов и исследование их поведения в макроорганизме, привело к изучению имплантатов биологического происхождения. Биоимплантаты, получаемые из донорского материала человека (аллографт) или животного (ксенографт: свиной, бычий), с применением технологий тканевой инженерии представляют собой внеклеточный матрикс (ВКМ) [6-8]. Основными превалирующими компонентами ВКМ являются гликопротеины, протеогликаны, гиалуроновая кислота, коллаген, а также в меньшей степени эластин, фибронектины, ламинины, нидогены. Составляя комплекс структурных и функциональных белков, объединенных в уникальную тканеспецифичную архитектуру, внеклеточный матрикс, помимо его ведущей роли в поддержании структуры, «каркаса» ткани, участвует в процессах передачи сигнала, регуляции роста клеток и их дифференцировки [9-12]. Такие биопластические материалы на основе внеклеточного матрикса способны индуцировать процесс, называемый

«конструктивное ремоделирование» – формирование функциональной ткани соответственно зоне имплантации [13-17]. Однако способность активизировать конструктивное ремоделирование во многом зависит от методов, применяемых для получения внеклеточного матрикса. Опираясь на эти важные функции, имплантаты на основе внеклеточного матрикса находят широкое применение в регенеративной медицине для реконструкции тканей. Применение данных биоматериалов имеет большой потенциал в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки, так как это может позволить минимизировать воспалительную реакцию в ответ на имплантацию эндопротеза, уменьшить вероятность образования спаек органов брюшной полости с имплантатом, а также снизить риск возникновения раневой инфекции [18].

Однако существование данных биоимплантатов не решает ряда вопросов, связанных с их применением в хирургии грыж живота, а именно – нет консенсуса о том, как и в каких случаях, использовать биологические имплантаты, отсутствует, в достаточном количестве, информация об отдаленных результатах их применения, и что немало важно, имеют высокую стоимость [19]. Несмотря на достаточное количество работ по проблеме использования ксеноимплантатов при герниопластике в доступной нам литературе, следует признать неоднозначность приводимых данных разными учёными, а отсутствие в этих работах исследований по экспериментальному, морфологическому обоснованию применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки определяет актуальность данного исследования.

Цель исследования: изучить в эксперименте возможность применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины в качестве нового биологического материала для пластики дефектов передней брюшной стенки.

Задачи исследования:

1. разработать методику получения опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки;
2. оценить выраженность спаечного процесса брюшной полости после применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины при пластике дефектов передней брюшной стенки;
3. дать морфологическую характеристику зоны имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины с тканями передней брюшной стенки;
4. изучить биомеханические свойства внеклеточного матрикса ксенобрюшины.

Научная новизна:

- впервые для пластики дефектов передней брюшной стенки предложен новый биологический имплантат отечественной разработки – внеклеточный матрикс ксенобрюшины;
- впервые в экспериментальных условиях изучена морфологическая картина зоны взаимодействия внеклеточного матрикса ксенобрюшины с тканями передней брюшной стенки;

- впервые дана характеристика адгезивным и биомеханическим свойствам внеклеточного матрикса ксенобрюшины.

Основные положения, выносимые на защиту:

- предложенная методика децеллюляризации не оказывает деструктивного влияния на ультраструктуру коллагеновых волокон и эластиновых фибрилл опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины;

- применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки в эксперименте характеризуется формированием слабовыраженных спаек брюшной полости и не имеет зависимости от срока экспозиции материала;

- при использовании внеклеточного матрикса ксенобрюшины в качестве нового биологического материала для пластики дефектов передней брюшной стенки наблюдается адекватное течение раневого процесса в постимплантационном периоде с формированием зрелого, состоятельного контакта с тканями передней брюшной стенки и достоверно минимальными тканевыми воспалительными реакциями;

- внеклеточный матрикс ксенобрюшины демонстрирует достаточную механическую прочность на стендовых испытаниях, с повышением данного показателя после имплантации по отношению к исходным данным, без потери прочностных характеристик на протяжении всего эксперимента.

Практическая значимость

Проведенные в диссертационной работе исследования расширяют имеющиеся представления об использовании биологических материалов для пластики дефектов передней брюшной стенки, а именно представлен новый биологический имплантат отечественной разработки – внеклеточный матрикс ксенобрюшины.

Накопленная научная база обосновывает потенциальную возможность применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины в клинической практике в качестве альтернативного материала для герниопластики.

Внедрение в практику

Получено «Свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права» - Метод реконструкции передней брюшной стенки с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины / Абатов Н.Т., Бадыров Р.М., Асамиданов Е.М., Каукенов Б.Н.; выдано 10.08.2016 г., № 1671 (Приложение А).

Получена Приоритетная справка по поданной заявке на патент Республики Казахстан на изобретение «Внеклеточный матрикс ксенобрюшины для пластики грыж передней брюшной стенки» № 2017/0864.1. Авторы: Абатов Н.Т., Бадыров Р.М., Огай В.Б., Абатова А.Н., Асамиданов Е.М. (Приложение А).

Издана научная монография «Внеклеточный матрикс ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки» Н.Т. Абатов, Р.М.

Бадыров, М.М. Тусупбекова. - Караганда, 2018, 56с. Тираж 300 экз. (Приложение А).

Отдельные результаты диссертационной работы, полученные в ходе исследования, оформлены в виде лекционного материала «Применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки» и внедрены в учебный процесс кафедры хирургических дисциплин КГМУ. Акт внедрения результатов НИР от 08.06.2018г. (Приложение А).

Личный вклад автора

Диссертантом совместно с научным руководителем профессором Абатовым Н.Т. разработан новый метод пластики дефектов передней брюшной стенки с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины у лабораторных животных.

Самостоятельно реализовано экспериментальное исследование на 128 лабораторных животных (моделирование дефекта передней брюшной стенки у экспериментальных животных, забор материала для гистологического исследования, выведение животных из эксперимента) по изучению структурных изменений зоны имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины с проведением морфометрического исследования клеточного инфильтрата, оценке адгезивных и биомеханических свойств имплантата.

Диссертационная работа выполнялась в рамках научно-исследовательской работы по грантовому финансированию МОН РК № государственной регистрации 0115РК00305 по теме: «Разработка и применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки», соискатель являлся ответственным исполнителем НИР, в рамках которого выполнялась диссертационная работа.

Под руководством научного руководителя д.м.н., профессора Тусупбековой М.М. проведено морфологическое исследование полученных в эксперименте образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины на базе патоморфологической лаборатории кафедры патологической анатомии КГМУ, самостоятельно соискателем проведен морфометрический анализ клеточного инфильтрата зоны имплантации.

Весь материал систематизирован, документирован и оформлен в виде диссертации лично автором.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены: на международном зарубежном конгрессе «XXXI International Congress of the International Academy of Pathology and 28th Congress of the European Society of Pathology» (г. Кёльн, Германия, 2016г.), на международной зарубежной конференции «Critical Surgical Abdomen Consensus Conference» (г. Дублин, Ирландия, 2016г.), на международном зарубежном конгрессе «52nd Meeting of the European Society for Surgical Research» (г. Амстердам, Нидерланды, 2017г.), на Международном симпозиуме «Астана Биотех 2018» (г. Астана, Казахстан, 2018г.), на заседании кафедры хирургических дисциплин Карагандинского

государственного медицинского университета и на заседании научно-экспертной комиссии хирургических дисциплин КГМУ.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них: 3 в научных изданиях рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК; 3 публикации в международных научных изданиях, входящих в информационную базу Thomson Reuters: 1 публикация в «Virchows Archiv» The European Journal of Pathology, 2 публикации в European Surgical Research Journal; 1 публикация в международном научном издании, входящем в информационную базу Scopus – «Georgian Medical News».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 90 страницах компьютерного набора текстового редактора Microsoft Word, состоит из введения, 3 разделов основной части, заключения и списка использованных источников. Диссертация имеет 2 приложения. Диссертация иллюстрирована 15 таблицами и 47 рисунками. Список литературы включает 92 источника на русском и английском языках.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Применение эндопротезов при герниопластике

Операции по поводу грыж живота занимают лидирующие позиции среди плановых хирургических вмешательств, как в Казахстане, так и за его пределами, и составляют по данным разных источников от 8 до 24 % всех операций в абдоминальной хирургии.

Особенно сложными в решении проблемы являются рецидивные и многократно рецидивирующие грыжи, грыжи с обширными и геометрически сложными дефектами брюшной стенки, комбинированные грыжи. Увеличившееся число сложных грыж среди лиц трудоспособного возраста, сохраняющаяся низкая эффективность обычных методик грыжесечения, большое число местных и общих послеоперационных осложнений и рецидивов, частая инвалидизация, ограничение работоспособности и снижение качества жизни позволяет рассматривать данную проблему, как одну из важнейших социально-экономических задач практического здравоохранения [20-22].

В последнее столетие большинство герниопластик выполнялось под «натяжением», принцип которого впервые был предложен в 1884 году хирургом из Падуи Бассини. Тогда разработанная им концепция реконструкции дна пахового канала произвела революцию в оперативном лечении паховых грыж. Методика и принципы пластики, используемые Бассини, явились основой для самых различных вмешательств, однако суть всех их может быть сведена к нескольким положениям: восстановление анатомических соотношений, усиление слабых мест апоневротическими дубликатами, мышцами или какими-либо протезами (аллоплантами, трансплантатами и т.п.). К настоящему времени применяется большое количество модификаций и усовершенствований данной техники различными авторами. Но полностью удовлетворяющий всех метод так и не был разработан. Частота рецидивов после традиционных методик, включая пластику по Шолдису («золотой стандарт»), остается высокой, достигая 10%, а при сложных видах грыж — 30% и более [23, 24].

Причинами, обсуждаемыми в хирургических кругах, высокого процента рецидивов заболевания являются выраженное натяжение тканей по линии швов, обусловленное повышением внутрибрюшного давления, и послеоперационные раневые осложнения.

Общепризнанно, что ключ к решению проблемы грыж живота лежит в разработке научно обоснованного и высокотехнологичного способа реконструкции брюшной стенки с использованием материалов (эндопротезов, имплантируемых конструкций), по своим свойствам максимально приближенных к тканям пациента. В поисках путей уменьшения процента рецидивов I. L. Lichtenstein с соавт. (1989, 1992) разработали концепцию «ненатяжной» методики. Внедрение в хирургическую практику различных заместительных материалов для укрепления передней брюшной

стенки, позволяющих снизить натяжение тканей в зоне операции, избегая при этом редукации объема брюшной полости и повышения внутрибрюшного давления, значительно расширило возможности герниологии и позволило добиться повышения эффективности хирургического лечения грыж.

Аллопластика нашла широкое применение, особенно при появлении на рынке полипропиленовых протезов [25-29]. Так, в настоящее время во всем мире для пластики грыж используются три синтетических материала: политетрафторэтилен (PTFE, тефлон), полиэстер (дакрон, мерсилен) и полипропилен (пролен, марлекс, сурджипро, атриум, трелекс, линтекс). Они не канцерогенны [30] и не вызывают аллергической реакции. Установлено, что PTFE прочнее двух других видов полимеров, однако мы не встретили информации о механическом разрушении ни одного из них. На сегодняшний день полипропилен, являясь оптимальным материалом для изготовления сетчатого имплантата, стал «золотым стандартом» в хирургической герниологии. Но при этом полипропиленовая сетка практически непригодна для интраперитонеального применения из-за массивного спаечного процесса в брюшной полости с риском эрозий стенок полых органов [31]. Большинство авторов убеждены в существенных различиях результатов протезирования в зависимости от материала и количества сетчатого протеза [32]. Многочисленные экспериментальные исследования на животных доказали, что большее количество протезного материала инициирует большую реакцию тканей на его имплантацию. Характер реакции определяется также материалом протеза, его структурой, поверхностью. Облегченные полипропиленовые протезы, величина ячейки которых составляет менее 1 мм, вызывают реакцию хронического воспаления с образованием периимплантационной рубцовой сетки, в то время как имплантация тяжелых протезов, величина ячейки которых более 1 мм, порождает изначально острую воспалительную гранулоцитарную реакцию с образованием рубцовой пластинки [33]. Хроническое воспаление во многом обуславливает внутрибрюшную адгезию даже при экстраперитонеальной позиции имплантата и может быть причиной спаечной кишечной непроходимости.

Таким образом, обладая целым рядом преимуществ, синтетические эндопротезы имеют свои недостатки, к которым следует отнести:

- выраженное асептическое воспаление в окружающих тканях с образованием грубого соединительнотканного рубца;
- слабое сопротивление инфекционному процессу, что ограничивает его применение при ущемленных грыжах;
- при надапоневротическом расположении отмечается высокий процент образования хронических сером;
- высокий риск возникновения сращений между органами брюшной полости и эндопротезом при его подапоневротическом расположении.

1.2 Роль биологических имплантатов в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки

Поиск альтернативных материалов, которые бы обеспечивали прочность, одномоментную пластику грыжевого дефекта (особенно в условиях бактериального загрязнения), не снижая функциональность передней брюшной стенки, и как следствие, улучшение качества жизни пациента после операции, привел к необходимости изучения и применения новых биосовместимых материалов для эффективной регенерации тканей передней брюшной стенки [34-38].

Попытки использовать материалы биологического происхождения известны давно. Данная группа эндопротезов не нашла широкого применения в клинике прежде всего из-за риска развития тканевой несовместимости. Более-менее успешными исследования в данном направлении стали возможны после того, как исследователям удалось создать децеллюляризованный биоматериал [39].

Ключевым условием создания подобных материалов считается наличие оптимальных биоинженерных свойств, позволяющих материалам восстанавливать поврежденные ткани с эффектом имитации определенных физиологических процессов в замещаемых биологических структурах, не вызывая при этом иммунологического конфликта [40,41]. Важным свойством биоматериалов является их способность к биодegradации с включением промежуточных и конечных метаболитов в естественные биохимические циклы без их системного и локального накопления, как, например, молочная и гликолевая кислоты включаются в цикл Кребса. При этом такие продукты не должны быть токсичными, а их концентрация в кровяном русле не должна превышать предельно допустимый уровень [42-48].

В настоящее время биопластические материалы разрабатываются на основе биодegradуемых полимеров: альгинаты, коллаген, желатин, хитозан, фиброины шелка, полиэфиры бактериального происхождения – полиоксибутираты и их сополимеры. Эти биополимеры, как правило, обладают свойствами биосовместимости с организмом и могут играть роль эффективных биостимуляторов [49,50]. Способность биопластических материалов встраиваться в процесс физиологического метаболизма предопределяет сбалансированность репаративных процессов без выраженных явлений воспалительных реакций, избегая при этом развития иммунологического отторжения [51, 52].

Разработка новых биодegradуемых материалов основывается на изучении кинетики резорбции и оценки влияния на процессы регенерации. Характер и степень выраженности этого воздействия определяются совокупностью физико-химических свойств собственно материала и интенсивностью ответных физиологических реакций организма-реципиента. Принцип биохимической комплементарности лежит в основе создания матриц, состоящих из макромолекулярных комплексов, доступных для собственных

энзимных систем организма. В связи с этим можно считать, что оптимальный вариант пластического материала должен отвечать следующим требованиям:

— макромолекулярная конструкция с заданным периодом биodeградации, осуществляемой естественными метаболическими путями, которая не вызывает иммунные и воспалительные процессы;

— включение промежуточных и/или конечных продуктов деструкции в естественные биохимические циклы организма;

— максимальное соответствие по времени периода биodeградации материала и длительности репаративного процесса.

Одним из перспективных направлений применения биопластических материалов в последнее время является их использование в качестве структурной основы для тканеинженерных конструкций (ТИК). ТИК повышают выживаемость клеток, обеспечивают их более активную пролиферацию за счёт адгезии на матриксе. Материал ТИК, выступает в роли объемообразующего агента, способствует активной индукции ангиогенеза и репаративной регенерации [53].

На основе совокупности морфофункциональных и технологических признаков все биопластические материалы выполняют в условиях раневого процесса преимущественно заместительную (пластическую) функцию в области применения как газообмен, гидробаланс, роль каркаса для адгезии, миграции клеток реципиента, защита от инфицирования, а затем по мере метаболизации стимулируют замещение собственными тканями организма, что позволило их объединить в группу матрично-пластических биоматериалов.

Биопластические материалы этой группы можно классифицировать в зависимости от источника получения:

- материалы, полученные на основе тканей животного происхождения;
- материалы как результат обработки трупных донорских тканей.

1.2.1 Матрично-пластические материалы природного происхождения

Ведущим представителем данной группы является разработанный пластический материал на основе свиного кожного коллагена Permacol Biological Implant (компании Covidien, Mansfield, США), одобренный FDA в марте 2005 года [54, с. 627; 55-61] Permacol предназначен для пластики грыжи и дефектов брюшной стенки, укрепления мышечных лоскутов.

Hsu P.W. с коллегами (2008) провели исследование с применением биоимплантата Permacol для реконструкции передней брюшной стенки на 28 пациентах. Все случаи грыженосительства были неосложненными, без инфицирования [62]. За период послеоперационного наблюдения (18 месяцев) отмечалось осложнение в виде рецидива заболевания в 10,7% случаев.

Другая группа исследователей во главе с Connolly P.T. et al. (2008) доложили об опыте применения данного биоимплантата в реконструктивной хирургии кишечных свищей ассоциированных с лапаростомией [63] Было проведено исследование на 61 пациенте с вышеописанной патологией, из них в

12 случаях применялся ацеллюлярный свиной дермальный коллаген Permacol. По результатам исследования был выявлен высокий процент осложнений (41,7 %) в виде рецидива свища и грыжи. Авторы пришли к мнению, что свиной дермальный коллаген Permacol следует применять с большой осторожностью в случаях, когда реконструкция передней брюшной стенки требует одномоментной пластики грыжи и закрытия свищевого хода.

Известны случаи успешной пластики грыж передней брюшной стенки в условиях бактериального обсеменения. Так, Armellino et al. (2006) привели 6 случаев пластики осложненной послеоперационной грыжи с использованием Permacol [54, с. 628-630]. В одном случае у женщины наблюдалась послеоперационная грыжа на фоне тонкокишечно-влагалищного свища. В трех случаях были представлены тяжелые раневые инфекции, осложнившие послеоперационный период после пластики с использованием полипропиленовой сетки. Ни у одного из пациентов не наблюдались послеоперационные или связанные с трансплантатом осложнения. За период последующего наблюдения (24 месяца) рецидивы не отмечались.

Одним из представителей этой группы является материал Surgisis™, полученный путем обработки свиной подслизистой тонкой кишки, применяемый для пластики паховых и вентральных грыж [64-68]. Считается, что данный биологический материал полностью замещается нативной тканью в течение 6 месяцев после имплантации.

Пилотное исследование, описанное Franklin et al. (2002) [69] показало высокую эффективность применения Surgisis – ни одного рецидива (0%) в 19 случаях пластики послеоперационных/вентральных грыж за двадцатимесячный период наблюдения. Позже, в 2008 году, той же группой исследователей проведен анализ оперативного лечения 116 пациентов с грыжами передней брюшной стенки различной локализации: послеоперационные, паховые, пупочные. Все случаи грыженосительства были инфицированы либо потенциально обсеменены. По результатам послеоперационного наблюдения в течение 20 месяцев рецидивы отмечались в 5,3% случаях [70].

По данным литературы, согласно материалам группы ученых во главе с Ueno et al. (2004) проведено когортное исследование по изучению применения биоимплантата Surgisis на 20 пациентах, которые подверглись герниопластике в условиях бактериального инфицирования [71]. Средний срок послеоперационного наблюдения составлял 16 месяцев, за которые было зафиксировано 6 случаев (30%) рецидивов заболевания. Helton et al. в своем докладе по применению Surgisis приводит данные об 53 пролеченных пациентах с вентральными грыжами в условиях потенциального «загрязнения» («чистые» – 41,5%, потенциально обсемененные – 24,5%, «загрязненные» – 34%) [72]. Общая частота рецидивов составила 17% (9 случаев). Существенное влияние на риск развития рецидива оказало состояние послеоперационной раны: при инфицированных ранах частота рецидивов достигала 39%, в то время как при «чистых» ранах процент рецидива не превышал 5%.

Veritas Collagen Matrix – это имплантируемый хирургический пластырь, состоящий из несшитого бычьего перикарда [73, с. 60; 74]. Veritas Collagen Matrix предназначен для использования в качестве имплантата для хирургического восстановления дефектов мягких тканей: восстановление брюшной и грудной стенок, усиление мышечного лоскута, и пластика грыжи (например, диафрагмальная, бедренная, послеоперационная, паховая, поясничная, параколотомическая, скротальная, пуповинная грыжи). Однако отмечается недостаточность научных доказательств клинической эффективности Veritas Collagen Matrix для использования в качестве имплантатов для хирургического восстановления дефектов мягких тканей. По данным литературы определено только одно ретроспективное исследование, проведенное Limpert et al. по оценке эффективности бимоимплантата Veritas в качестве материала для герниопластики [73, с. 61-65]. У 26 пациентов, прооперированных по поводу первичных или рецидивирующих грыж передней брюшной стенки, частота рецидива в период шестимесячного наблюдения составила 19%.

Нет достаточных данных по клиническому применению таких биоимплантатов животного происхождения как Allomax, FlexHD, FortaGen, Peri-Guard, SurgiMend и Tutorpatch, кроме как единичных случаев применения данных материалов в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки.

1.2.2 Матрично-пластические материалы на основе донорских тканей

Разработка материалов этой группы стала возможной благодаря появлению новых методик обработки донорских тканей и решению ряда юридических проблем, связанных с данными технологиями. Подобные пластические материалы по морфофизиологическим критериям максимально соответствуют требованиям клинической трансплантологии. Ярким представителем этой группы признан материал AlloDerm.

AlloDerm (компания Life Cell. Corp., Woodlands, США) – это бесклеточный дермальный матрикс, разработанный из человеческого аллогенного трансплантата кожи с применением технологии низкотемпературной лиофилизации.

Изучению биоимплантата AlloDerm в качестве материала для герниопластики посвящено наибольшее количество работ и публикаций – 984 случая в 23 исследованиях [75,76, с. 419; 77-82, 83, с. 26; 84]. В то же время, исходя из полученных результатов, частота рецидивов варьируется от 0 до 100%. Несмотря на то, что изучены ключевые вопросы применения данного имплантата в клинической практике, проспективные рандомизированные контролируемые исследования отсутствуют.

В сравнительном исследовании Gupta et al. (2006) изучалось применение биоимплантата AlloDerm и биоактивной сетки Surgisis (компания Cook Surgical) для пластики вентральных грыж [76, с. 420-425]. Под наблюдением находилось 74 пациента в период с июня 2002 года по март 2005 года: 41

пациенту выполнена операция с использованием биоактивной сетки Surgisis, а 33 пациентам – с применением AlloDerm. Анализ полученных данных показал, что послеоперационный диастаз и рецидив грыжи возникали в 24,2% случаев в группе пациентов, где для герниопластики применялся биоимплантат AlloDerm. С другой стороны, формирование серомы, выраженные послеоперационные боли часто возникали при использовании сетки Surgisis.

В своем докладе Sailes et al (2010) приводит данные 10-летнего опыта применения синтетических и биологических материалов для пластики грыж передней брюшной стенки [85]. Из 545 пациентов, прооперированных за этот период, у 100 больных был применен биоимплантат AlloDerm в качестве пластического материала для герниопластики. Полученные результаты показали, что частота рецидивов остается на высоком уровне – 19% случаев.

Hiles M. с коллегами [83, с. 27-37] отметили, что биопластические материалы для абдоминальной хирургии требуют разработки новых показаний и технологий операционной техники. Поиск научных публикаций в базах данных PubMed и ScienceDirect по использованию различных биопластических материалов для общей хирургии показал, что существует большой опыт их применения для вентральной пластики и практически отсутствует при других локализациях грыж передней брюшной стенки.

В систематическом обзоре Ellis C.V., Kulber D.A. исследовали преимущества использования бесклеточного дермального матрикса в реконструкции брюшной стенки [86]. Бесклеточный дермальный матрикс используется в реконструкции брюшной стенки в широком диапазоне клинических ситуаций, в том числе при травмах, резекциях опухоли и пластике грыжи. Оперативные методы широко варьируются в клинических исследованиях. В условиях гетерогенности популяции пациентов и ограниченной интерпретации данных были выявлены вопросы, касающиеся высоких показателей рецидивов грыж при использовании бесклеточного дермального матрикса. Авторы пришли к выводу, что высококачественные данные, полученные из исследований I, II и III уровня, нуждаются в определении показаний для применения бесклеточного дермального матрикса и оптимальных хирургических методов для максимизации результатов в реконструкции брюшной стенки.

Однако широкое распространение матрично-пластических материалов на основе донорских тканей сдерживается проблемами ограниченного количества их забора и развития в ряде случаев клинических случаев иммунологического отторжения данных материалов.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что в течение последних 10-15 лет были разработаны и внедрены в клиническую медицину новые средства для регенерации дефектов тканей, обозначенные нами как «биопластические материалы». Следует отметить, что термин «биопластический материал» по сути, отражает класс биodeградируемых биоконструкций, отвечающих следующим критериям:

- морфологическое сходство с нативными тканями;

- поддержка ключевых физико-химических параметров газообмена и гидробаланса тканей области раны;
- защита раны от инфицирования;
- стимуляция гистоспецифической регенерации;
- выполнение функции матрицы для трансплантируемых алло- или аутоклеточных элементов.

Однако с материалами этой группы до сих пор остаются нерешёнными вопросы иммунологической толерантности, вирусологической безопасности исходных донорских тканей и ограниченности применения данных материалов в условиях обширных и глубоких дефектов тканей с дефицитом тканево-клеточного резерва реципиента. К сожалению, данные материалы имеют технологические ограничения по объёму выпуска и высокую себестоимость, что в совокупности приводит к их малой доступности для широкой клинической практики.

Не решенным остается вопрос, какое первичное сырье лучше использовать для получения биологических имплантатов. Считается, что разные способы изготовления биоимплантатов определяют эндогенные свойства для каждого материала в отдельности, и может быть причиной различных биологических ответов после имплантации *in vivo*. Опираясь на данные обстоятельства, в настоящий момент не прекращается поиск высокотехнологичных, биологически «сходных» к организму человека, и при этом недорогих имплантатов, которые можно применить для герниопластики.

1.2.3 Материалы на основе ксеногенной брюшины

История вопроса использования ксеногенной брюшины в качестве пластического материала имеет более чем вековую давность. Halsted в 1893 году впервые предложил использовать свинную брюшину в хирургической практике. Несколько позже Morris (1902) воспользовался висцеральной бычьей брюшиной, стерилизованной паром, с целью предотвращения образования спаек после операций на органах брюшной полости. Hanel и Prime (1909) висцеральной брюшиной баранов накрывали дефекты твердой мозговой оболочки, а Смирнов А.В. (1918), повторив подобные эксперименты, пришел к выводу, что гетерогенная брюшина через 5 месяцев после трансплантации, полностью рассасывается и замещается соединительной тканью. Pudenz и Odom (1942), применив в эксперименте для закрытия дефектов твердой мозговой оболочки бычью висцеральную брюшину слепой кишки, стерилизованную как кетгут, уже на сроках от 4 до 19 суток после трансплантации отмечали начало рассасывания имплантата и прорастание его соединительной тканью [87, с. 44].

Многочисленные экспериментальные исследования и клинические наблюдения, проведенные рядом авторов, таких как Кузнецов Н.Н. (1952), Хохлов П.П. (1957), Елисеев Н.Т. (1968), Попов П.Я. (1963), Слободчиков М.Е. (1965) и др., доказали ценные пластические свойства ксеногенной брюшины,

открывающие большие перспективы для дальнейшего расширения диапазона ее применения в различных областях хирургии. Доказано, что имплантированная консервированная ксеногенная брюшина, как висцеральная, так и париетальная, не вызывает выраженной воспалительной реакции окружающих тканей, а также каких-либо анафилактических явлений со стороны организма реципиента. Данный имплантат характеризуется высокими физико-механическими свойствами, медленными темпами рассасывания, исключая потерю прочности пластического материала в тканях организма [87, с. 45].

Хохлов П.П. (1957) впервые широко применил в хирургической практике консервированную париетальную брюшину крупного рогатого скота, которая была использована для остеосинтеза трубчатых костей, закрытия дефектов твердой мозговой оболочки, герметизации открытого пневмоторакса, при оперативном лечении нефроптоза, для лечения термических ожогов в медицинских учреждениях г. Караганды и Карагандинской области. Известен опыт применения консервированной гетерогенной ксенобрюшины для пластики паховых вентральных грыж [87, с. 47]. Данный имплантат был получен путем консервирования париетальной брюшины крупного рогатого скота в 2% растворе хлорамина, являющийся на тот момент одним из наиболее сильных антисептических веществ. Листы париетальной брюшины КРС, очищались от жира, тщательно промывались в проточной воде с мылом и помещались в стеклянную банку с 2% раствором хлорамина при соблюдении правил асептики. Через двое суток образцы ксеногенной брюшины промывались в проточной воде, помещались в стерильную банку и заливались 2% раствором хлорамина, который сменялся ежедневно в течение 12 суток. После данных процедур брюшина становилась пригодной для использования [87, с. 48-49]. Недостатками данного материала явились возможные постимплантационные реакции отторжения за счет присутствия клеточных элементов и белков. Кроме того, антисептик хлорамин, включающий в свой состав хлор, является агрессивной средой для тканей реципиента, что приводит к раздражению и воспалению в месте контакта. Данный материал не получил широкого распространения в лечении грыж передней брюшной стенки ввиду недостаточной клинической эффективности [88, с. 2].

Новый виток развития и усовершенствования ксеногенной брюшины стал возможным с развитием и использованием технологий тканевой инженерии. Разработано раневое покрытие для лечения ожогов и ран, на основе брюшины КРС, при совместном сотрудничестве научных коллективов Национального центра биотехнологии и Национального научного центра онкологии и трансплантологии (г. Астана, Казахстан) [88, с. 3-5]. Технология изготовления биологической наружной повязки включала в себя один цикл децеллюляризации детергент-ферментативным методом, где в качестве детергента выступал 4% раствор дезоксихолата натрия, что, по данным электронной микроскопии, приводило к структурным изменениям в виде отека и разволокнения коллагеновых и эластиновых фибрилл, и как следствие такая обработка не предусматривала его использование внутри анатомических

структур организма человека, в частности, в брюшной полости и передней брюшной стенке.

Несмотря на достаточное количество работ по проблеме использования ксеногенных имплантатов при герниопластике в мировой науке, следует признать неоднозначность приводимых данных разными учёными, а отсутствие в этих работах исследований применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины в качестве пластического материала для замещения дефектов передней брюшной стенки определяет актуальность планируемого экспериментального исследования.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Разработка опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины

2.1.1 Методика изготовления опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Разработка и изготовление опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины осуществлялось совместно с сотрудниками Национального центра биотехнологии (г. Астана, Казахстан).

После забора первичного сырья – бычьей брюшины, ее очищали от жира, трижды промывали стерильным физиологическим раствором большими объемами, погружали в контейнер со стерильным физиологическим раствором, содержащий цефтриаксон – антибактериальный препарат широкого спектра действия. Децеллюляризация образцов ксеногенной брюшины осуществлялась в 2 цикла с помощью детергент-ферментативного метода [89, с. 19-20].

На первом этапе, образцы ксеногенной брюшины размером 5×5 см промывали трижды (20 минут каждый раз) стерильной проточной водой содержащей 1% раствор повидон-йода (ПИ). Затем промывали два раза по 20 минут в стерильной дистиллированной воде (содержащей 1% раствор ПИ), дважды в стерильной ультрачистой воде, содержащей 200 Ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл амфотерицина В.

Учитывая данные, полученные при изготовлении прототипа изучаемого материала, а именно, использование в качестве детергента 4% раствора дезоксихолата натрия приводило к структурным изменениям в виде отека и разволокнения коллагеновых и эластиновых фибрилл, на втором этапе был использован более щадящий детергент (рисунок 1).

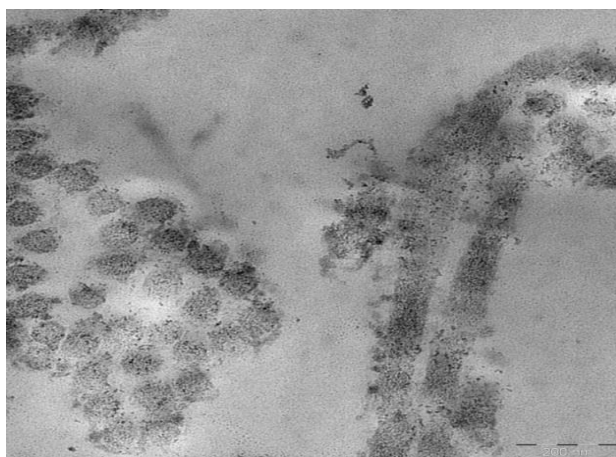


Рисунок 1 – Последствие воздействия детергента 4% раствора дезоксихолата натрия. Коллагеновые фибриллы имеют четкие контуры с различной степенью контрастности, что свидетельствует об отеке фибрилл. Отдельные волокна находятся в состоянии деструкции

Образцы ксеногенной брюшины погружали в раствор для децеллюляризации содержащий 0,25% додецилсульфат натрия и 0,5% Тритон X-100 и непрерывно перемешивали на платформенном шейкере в течение 3 часов при комнатной температуре при 200 об/мин. Данную процедуру повторяли дважды. После каждого цикла децеллюляризации проводилась отмывка образцов ксеногенной брюшины дистиллированной водой 2 раза по 20 минут.

На третьем этапе, образцы после децеллюляризации промывали трижды стерильной ультрачистой водой и переносили в раствор содержащий нуклеазы РНКазы А 20 мкг/мл и ДНКазы I 200 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C, перемешивая на орбитальном шейкере при 200 об/мин, чтобы полностью удалить содержимое ядер клеток и деградировать ДНК и РНК. После трех промывок стерильной дистиллированной водой (20 мин каждый раз), образцы переносили на хранение в стерильную ультрачистую воду с содержанием 200 Ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл амфотерицина В при 4°C. Все этапы по получению экспериментальных децеллюляризованных образцов ксеногенной брюшины выполнялись в стерильных условиях.

2.1.2 Стерилизация γ -излучением и микробиологический контроль полученных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Для радиационной стерилизации, полученные образцы внеклеточного матрикса ксенобрюшины укладывали в стерильные чашки Петри и упаковывали в герметичные медицинские пакеты для стерилизации. Радиационную стерилизацию проводили на модернизированном ускорителе электронов ЭЛВ-4 (мощности γ - источника от 10 до 77 кГр), в научно-производственном центре радиационных технологий Института ядерной физики НЯЦ РК (г. Алматы, Казахстан) [89, с. 22].

После стерилизации образцы внеклеточного матрикса ксенобрюшины подвергались контролю на стерильность тест-системами:

- ПЦР-тест на определение микоплазмы;
- Тест на определение бактериальных эндотоксинов.

Для определения микоплазмы в образцах внеклеточного матрикса ксенобрюшины, использовали набор для определения микоплазмы с помощью полимеразной цепной реакции (PCR Mycoplasma Test Kit, Applichem A3744). Тест для определения микоплазмы позволяет определить следующие виды и их минимальные концентрации (таблица 1).

Таблица 1 – минимальные концентрации различных видов микоплазмы

Вид микоплазмы	Минимальная концентрация
<i>M. fermentans</i>	110 CFU/мл
<i>M. capricolum</i>	240 CFU/мл
<i>M. penetrans</i>	200 CFU/мл
<i>M. hyorhinis</i>	210 CFU/мл

Для подготовки образцов на тестирование перенесли 1 мл супернатантов в 2 мл центрифужную пробирку. Осадили центрифугированием при 250×g в течение 5 мин. Перенесли полученный супернатант в новую стерильную пробирку и отцентрифугировали при 15,000×g в течение 10 мин., чтобы осадить микоплазму. Затем аккуратно, не повредив осадок, удаляли супернатант. Ресуспендировали осадок в 50 мкл буферного раствора и перемешали микропипеткой. Нагрели содержимое пробирки до 95°C и инкубировали 3 мин. Далее, подготовили реакционную смесь в ПЦР микропробирке, смешав компоненты, приведенные в таблице 2.

Таблица 2 – компоненты реакционной смеси

Реагент	Объем
Вода	35 мкл
Реакционная смесь	10 мкл
Тестируемый образец	5 мкл

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, покрыли содержимое микропробирки минеральным маслом (40 мкл). Положили все микропробирки в ПЦР-амплификатор T100 (Biorad, USA). ПЦР проводили при заданных параметрах, описанных на рисунке 2:

94°C 30 сек.	} 35 циклов
94°C 30 сек.	
60°C	
72°C 60 сек.	
94°C 30 сек.	
60°C	120 сек.
72°C	5 мин

Рисунок 2 – параметры проведения ПЦР

ДНК фрагменты амплифицировали с использованием специфических праймеров, приложенных в данном наборе (270 bp). Анализ продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле. Визуализацию ДНК фрагментов проводили окрашиванием раствором этидиум бромид. Снимки получали с помощью геле документирующей системы GelDoc (Biorad, France).

Для определения бактериальных эндотоксинов использовали кинетический хромогенный метод с использованием ЛАЛ-теста, описанный в Европейской фармакопее (ст.2.6.14) и Фармакопее США (ст.85). В фармакопее метод KQCL приводится как метод D. Измерение уровня эндотоксинов в пробах проводилось с помощью прибора для определения эндотоксинов ENDOSAFE PTS (Charles River, USA). Для измерения уровня бактериальных

эндотоксинов в образцах внеклеточного матрикса ксенобрюшины использовали специальный картридж (диапазон чувствительности 0,05 – 5,0 Ед/мл) в которых уже содержится ЛАЛ-реактив. В ячейки картриджа вносили по 25 мкл испытуемого образца и проводили детекцию эндотоксинов в течение 15-20 минут при 37°C.

2.1.3 Методы морфологической оценки образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Для морфологической оценки образцы внеклеточного матрикса ксенобрюшины окрашивались гематоксилином и эозином, для чего небольшие фрагменты полученного имплантата были зафиксированы в 4% растворе параформальдегида (pH=7,2). После промывки в фосфатном буфере, образцы последовательно дегидратировали в 70%, 95%, 95%, 100%, 100% этиловом спирте, затем погружали в ксилол. После этого образцы были инфильтрованы парафином и заключены в парафиновые блоки. Гистологические срезы толщиной 7 мкм нарезали на микротоме (Leica, Германия) и наносили на стеклянный слайд. После подсушки в термостате при 40°C, слайды окрашивали с помощью гематоксилина и эозина. Анализ окрашенных образцов проводили с помощью светового микроскопа Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия).

Для проведения электронной микроскопии фрагменты полученных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины были зафиксированы в 2,5% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (pH 7,2-7,4) с постфиксацией в 1% растворе четырехокси осмия (OsO_4), проведен по общепринятой методике и заключены в смолу Epon 812. Полутонкие срезы толщиной 1-2 мкм изготовлены на ультрамикротоме Leica (Австрия). Полутонкие срезы окрашены метиленовым синим, азуром-2, основным фуксином. Ультратонкие срезы контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Электронограммы получены с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Libra-120 со встроенной CCD-камерой (Carl Zeiss, Германия).

2.2 Экспериментальное исследование применения образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины

2.2.1 Материалы исследования

Объект исследования: объектом сравнительного экспериментального исследования является новый биологический имплантат отечественной разработки, впервые применяемый для пластики дефектов передней брюшной стенки – внеклеточный матрикс бычьей брюшины, полученный путем двойного цикла децеллюляризации детергент-ферментативным методом с последующей стерилизацией гамма-излучением [90] (рисунок 3).



Рисунок 3 – опытный образец внеклеточного матрикса ксенобрюшины

В качестве материала сравнения использовался свиной ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol» (Covidien, США), сходный по свойствам биологический имплантат, уже применяющийся в клинической практике для пластики дефектов передней брюшной стенки.

2.2.2 Морфологические методы изучения гистоструктуры зоны имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины с тканями передней брюшной стенки экспериментальных животных

2.2.2.1 Дизайн исследования

Проведено сравнительное экспериментальное исследование по изучению морфологической картины взаимодействия внеклеточного матрикса ксенобрюшины с тканями передней брюшной стенки на 96 белых нелинейных короткошерстных половозрелых крысах обоего пола массой 180 – 220 г. на базе вивария РГП на ПХВ «Карагандинский государственный медицинский университет».

Эксперимент проводился согласно разработанным стандартным операционным процедурам (Приложение Б). Животные были распределены по 8 особей в 2 группах, в 6 подгруппах случайным образом. Каждая группа соответствовала применяемому биоимплантату, каждая подгруппа – сроку наблюдения и выведения животного из эксперимента. Периоды наблюдения: 5 суток, 7 суток, 14 суток, 21 сутки, 30 суток, 180 суток. Распределение экспериментальных животных, их характеристика и сроки наблюдения представлены в таблице 3.

В качестве критерия приемлемой рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболевания и гомогенность групп по массе тела ($\pm 10\%$). Идентификация каждой особи осуществлялась путем присвоения каждому животному индивидуального номера меткой красителем на дорзальной

поверхности тела. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, приведенным в руководстве *Guide for care and use of laboratory animals. Eight edition. ILAR publication, 2012, National Academy Press*. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии со стандартными операционными процедурами.

Таблица 3 – Распределение экспериментальных животных по группам

группа	подгруппа	количество, n	пол	возраст, дни	масса тела до операции, г
Внеклеточный матрикс ксенобрюшины (n=48)	5 суток	8	м=4, ж=4	180±15	187±9
	7 суток	8	м=4, ж=4		
	14 суток	8	м=4, ж=4		
	21 сутки	8	м=4, ж=4		
	30 суток	8	м=4, ж=4		
	180 суток	8	м=4, ж=4		
Ацеллюлярный дермальный коллаген "Permacol" (n=48)	5 суток	8	м=4, ж=4		
	7 суток	8	м=4, ж=4		
	14 суток	8	м=4, ж=4		
	21 сутки	8	м=4, ж=4		
	30 суток	8	м=4, ж=4		
	180 суток	8	м=4, ж=4		

Изучение морфологической картины осуществлялось посредством сравнительной оценки структурных изменений зоны взаимодействия исследуемых материалов с тканями передней брюшной стенки и органов брюшной полости с использованием описательной морфологии и морфометрии на сроках наблюдения 5, 7, 14, 21, 30, 180 суток.

2.2.2.2 Имплантация биологических материалов

Имплантация внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» осуществлялась посредством вшивания данных материалов в переднюю брюшную стенку экспериментальных животных.

Для этого, каждой крысе был дан эфирный наркоз в индукционной камере, (объем 3 литра, 3 мл диэтилового эфира («Реахим», Россия), время экспозиции 5 мин) после чего, наркотизированное животное фиксировалось к предметному столику, производилось моделирование грыжевого дефекта передней брюшной стенки: на вентральной поверхности тела животного выбривался участок шерсти в области предполагаемого разреза, затем, после

обработки раствором антисептика и обкладки операционного поля, скальпелем рассекалась кожа по ходу белой линии живота, вырезался участок передней брюшной стенки размером 15мм*15мм (рисунок 4).

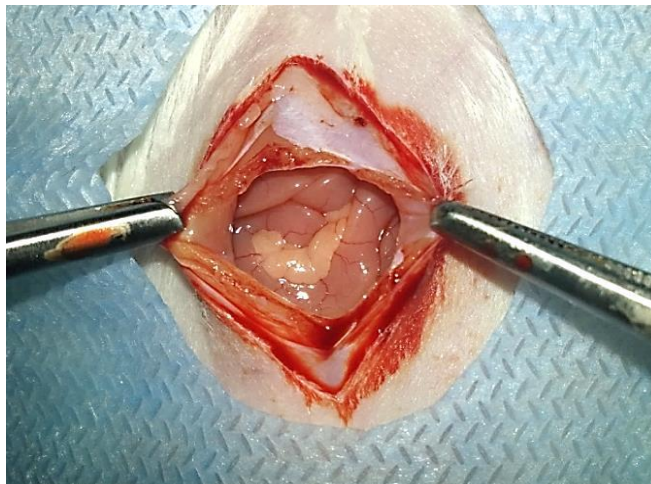


Рисунок 4 – Формирование дефекта передней брюшной стенки

Сформированный дефект закрывался внеклеточным матриксом ксенобрюшины (опытная группа) и ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol» (группа сравнения), размером 15мм*15мм, путем подшивания их к передней брюшной стенке «край в край» с использованием шелковой нити 4/0 на атравматичной игле (рисунок 5, б).

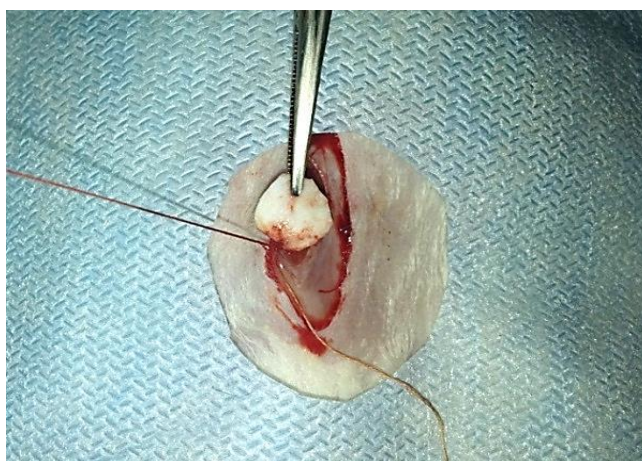


Рисунок 5 – фиксация имплантатов к передней брюшной стенке «край в край»

Закрытие дефекта передней брюшной стенки производилось с учетом непосредственного контакта исследуемых биологических материалов с органами брюшной полости для последующей оценки формирования спаек между имплантатами и органами брюшной полости. В послеоперационном периоде ежедневно наблюдали за общим состоянием животных, особенностями

поведения, интенсивностью двигательной активности, реакциями на звуковые и световые раздражители, состоянием кожного и волосяного покрова, окраской слизистых оболочек, потреблением кормов и воды, динамикой массы тела.



Рисунок 6 – закрытие дефекта передней брюшной стенки

Локальный статус оценивался по течению раневого процесса, состоянию швов, скорости заживления раны. Для профилактики раневой инфекции в течение 5 дней после операции проводилась антибактериальная терапия энрофлоксацином («Энфлорекс», World-Vet, Турция) в дозировке 0,1 мл – 10 мг.

2.2.2.3 Забор материала у экспериментальных животных

Согласно дизайну исследования животные были выведены из эксперимента на сроках 5 суток, 7 суток, 14 суток, 21 сутки, 30 суток, 180 суток.

После прекращения жизнедеятельности животного, путём введения его в наркоз с последующей декапитацией, производился забор гистологического материала. Для этого, снимался шерстяной покров с зоны имплантации и прилегающего к ней мышечного массива. Производилась вырезка имплантатов с контактирующим с ним участком тканей передней брюшной стенки. Линия резекции проходила на расстоянии 5 мм латеральнее от места контакта имплантата с тканями передней брюшной стенки. После забора, материал фиксировался в 4% нейтральном забуферном растворе формалина, с дальнейшей обработкой химическими реактивами (изопропиловый спирт, ксилол, парафиновая среда) в тканевом процессоре карусельного типа по установленному протоколу (Приложение Б). После ориентации материала в гистокассетах материал заливался в парафин с формированием блока для гистологической нарезки материала.

Гистологическому исследованию подвергался репрезентативный фрагмент контакта ткани передней брюшной стенки с биологическим

имплантатом. Микроскопическое исследование проводилась на компьютеризованном комплексе Leica Microsystems, микроскопе Leica DM 1000 при $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$ кратном увеличении с последующим цветным микрофотографированием на базе патоморфологической лаборатории кафедры патологической анатомии Карагандинского государственного медицинского университета.

По окончании проведения лабораторных исследований все экспериментальные животные списаны и утилизированы в соответствии с Пунктом 52 в редакции Постановления Правительства РК с изменениями и дополнениями от 07.08.2012г №1030.

2.2.2.4 Гистологическая количественная оценка клеточного инфильтрата

С целью изучения структурных изменений зоны имплантации, гистологические срезы были окрашены стандартной методикой гематоксилином и эозином (Приложение Б). Морфометрия клеточного инфильтрата в месте контакта исследуемых биологических материалов и тканями передней брюшной стенки производилась согласно методике, основанной на подсчете количества клеток стадийно-специфического клеточного инфильтрата в репрезентативном участке зоны имплантации с целью оценки течения раневого процесса (Приложение Б).

Гистологическая количественная оценка клеточного инфильтрата проводилась с помощью микроскопа Arcturus XT с лазерным микродиссектором в 300 клетках при 400-кратном увеличении в репрезентативном участке между внеклеточным матриксом ксенобрюшины/ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol» и тканями передней брюшной стенки, вне шовного материала. Клеточный инфильтрат формирующейся/созревающей грануляционной ткани характеризовался стадийно сменяющимся во временном отношении составом гранулоцитарных, лимфоцитарных, плазматических клеток, макрофагов и стромальных клеток (фибробласты, фиброциты). С целью оценки активности ветвления микроциркуляторного русла, процесса ангиогенеза в созревающей грануляционной ткани был проведен количественный подсчет сосудов при 400-кратном увеличении в репрезентативном участке гистологического среза.

2.2.2.5 Гистологическая оценка активности и степени созревания соединительной ткани

С целью гистологической оценки активности и степени созревания зрелой соединительной ткани в зоне имплантации исследуемых биологических имплантатов с тканями передней брюшной стенки, была проведена дублированная серия гистологических срезов с каждого парафинового блока с последующей стандартизированной окраской пикрофуксином по Ван-Гизону

(Приложение Б) с целью выявления зрелых коллагеновых и эластических волокон соединительной ткани и оценки степени фиброзирования.

Гистологическая полуколичественная оценка созревания соединительной ткани проводилась с помощью микроскопа Arcturus XT с лазерным микродиссектором при 400-кратном увеличении в репрезентативном участке между внеклеточным матриксом ксенобрюшины/ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol» и тканью передней брюшной стенки, вне шовного материала.

Степень созревания соединительной ткани оценивалась согласно шкале оценки созревания соединительной ткани, приведенной в таблице 4, в основе которой лежит процентное соотношение и частоты встречаемости.

Таблица 4 – Шкала оценки созревания соединительной ткани

Частота встречаемости	Балл	Характеристика градации в зависимости от частоты встречаемости соединительной ткани
≤10%	-	отсутствие зрелой соединительной ткани
>10% – ≤50%	+	мелкоочаговое разрастание зрелой соединительной ткани
>50% – ≤80%	++	крупноочаговое разрастание зрелой соединительной ткани (зрелый рубец)
>80%	+++	диффузное разрастание грубой волокнистой соединительной ткани (фиброз)
Примечание – за 100% принималась площадь среза в одном поле зрения репрезентативного участка		

2.2.3 Методы оценки спаечного процесса после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»

Количественная и качественная оценка образованных спаек брюшной полости после имплантации проводилась согласно шкале Vandendael, (таблица 5), предложивший комплексную оценку спаечного процесса и описавший характеристики спаек в своем экспериментальном исследовании [91].

Таблица 5 – шкала оценки спаечного процесса (по Vandendael)

Баллы	Параметры	Критерии
1	2	3
1	Ширина, мм	<2
2		2-10
3		>10
1	Толщина, мм	<1
2		1-3

Продолжение таблицы 5

1	2	3
3		>3
1	Прочность	+
2		++
3		+++
1	Количество	0-2
2		3-4
3		>4
Примечания: Класс 1 (незначительные) – 1-4; Класс 2 (умеренные) – 5-8; Класс 3 (выраженные) – 9-12.		

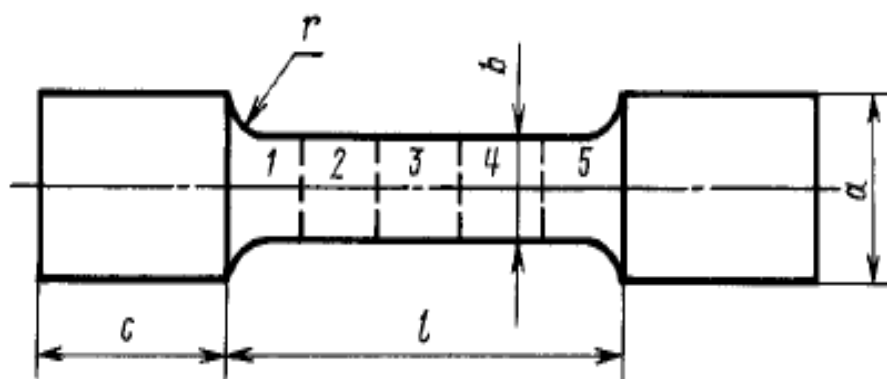
2.2.4 Методы изучения биомеханических свойств внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»

Изучение биомеханических свойств осуществлялось путем оценки прочности на разрыв и удлинение внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol». Прочность на разрыв оценивалось путем растягивания испытываемого образца на машине для испытания на разрыв до тех пор, пока данный образец не разрывается. Удлинение оценивалось путем растягивания испытываемого образца на машине для испытания на разрыв до тех пор, пока прилагаемая сила не достигнет predetermined величины или пока не произойдет разрыв испытываемого образца.

Для определения биомеханических свойств исследуемых имплантатов до имплантации подготавливался образец в виде двусторонней лопатки, и должен соответствовать чертежу, приведенному на рисунке 7.

Для проведения испытания применялась разрывная машина типа МТ 130. Все процедуры по определению прочности на разрыв и удлинения проводились согласно международному стандарту ИСО 3376-76 (ГОСТ 938.11-69).

Изучение биомеханических свойств внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» в послеоперационном периоде осуществлялось путем оценки прочности на разрыв фрагмента передней брюшной стенки с имплантированным биоматериалом.



Рабочая часть образца: l – длина, b - ширина; головка образца: a - ширина, c - длина.

Рисунок 7 – Форма опытного образца

Для реализации данной задачи были дополнительно использованы 32 лабораторные крысы. Экспериментальные животные были распределены по 4 особи в 2 группах, в 4 подгруппах случайным образом. Каждая группа соответствовала применяемому биоимплантату, каждая подгруппа – сроку наблюдения и выведения животного из эксперимента. Периоды наблюдения: 7 суток, 14 суток, 30 суток, 180 суток (таблица 6). Имплантация исследуемых материалов осуществлялась согласно пункту 2.2.2.2.

Таблица 6 – Распределение животных по группам и срокам выведения из эксперимента

32 крысы	Вид имплантата	7 суток	14 суток	30 суток	180 суток
	Внеклеточный матрикс ксенобрюшины, $n=16$	$n=4$	$n=4$	$n=4$	$n=4$
Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol», $n=16$	$n=4$	$n=4$	$n=4$	$n=4$	

По истечении сроков наблюдения, экспериментальные животные выводились из эксперимента путём введения его в наркоз с последующей декапитацией, с последующим забором тестируемых образцов. Тестируемый образец представлял собой фрагмент передней брюшной стенки, размером 2,0х6,0см, в центре которого находился имплантат (рисунок 8).

Прочность на разрыв оценивалось путем растягивания испытываемого образца на машине для испытания на разрыв до тех пор, пока данный образец не разрывается. Для проведения испытания применялась разрывная машина типа МТ 130 (рисунок 9).

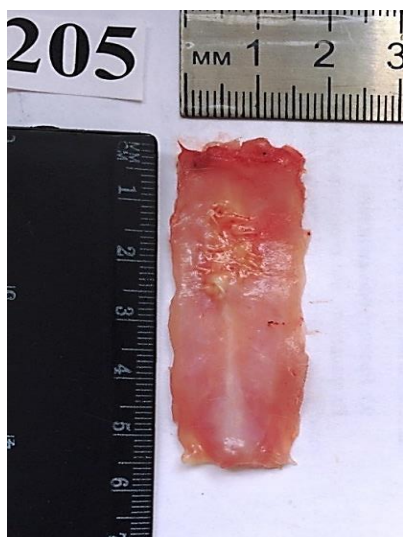


Рисунок 8 – тестируемый образец передней брюшной стенки с имплантатом в центре (внеклеточный матрикс ксенобрюшины, 30 суток)

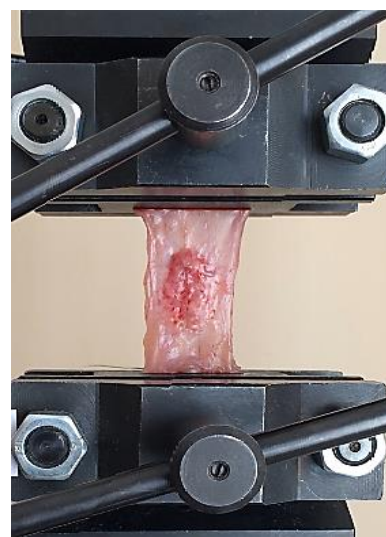


Рисунок 9 – тестируемый образец зафиксирован в разрывной машине типа МТ 130

Все процедуры по определению прочности на разрыв согласно международному стандарту (ГОСТ 3813-72).

2.2.5 Методы статистической обработки данных

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (\bar{X}), среднеквадратичное отклонение (SD). Достоверность различий между исследуемыми группами определена статистическими методами с помощью непараметрическим критериев: критерий Mann-Whitney для сравнения независимых групп («опыт-контроль»). Достоверность внутригрупповых различий определена статистическим методом с помощью непараметрическим критериев: критерий Kruskal-Wallis для сравнения независимых групп.

При проведении корреляционного анализа использовался непараметрический метод ранговой корреляции Спирмена (r_s). Данный коэффициент используется для выявления и оценки тесноты связи между двумя рядами сопоставляемых количественных показателей. Коэффициент корреляции принимает значения от -1 до 1, причем при $r_s=1$ имеет место строго прямая связь, а при $r_s= -1$ – строго обратная связь. Если коэффициент корреляции равен нулю, то связь между величинами практически отсутствует. В связи с тем, что коэффициент является методом непараметрического анализа, проверка на нормальность распределения не требуется [92].

Для расчетов использовалось программное обеспечение «Statistica 8.0» и табличный процессор Excel из пакета Microsoft Office 2012.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Результаты морфологической оценки образцов недецеллюляризированной ксеногенной брюшины

Гистоморфологический анализ заготовленных образцов ксеногенной брюшины показал, что недецеллюляризованный материал состоит из упорядоченных толстых волокон коллагена, имеет толщину в среднем 367 мкм, и представлен в основном из слоя коллагена, который покрыт с одной или двух сторон тонким слоем мезотелия (рисунок 10А, 10В).

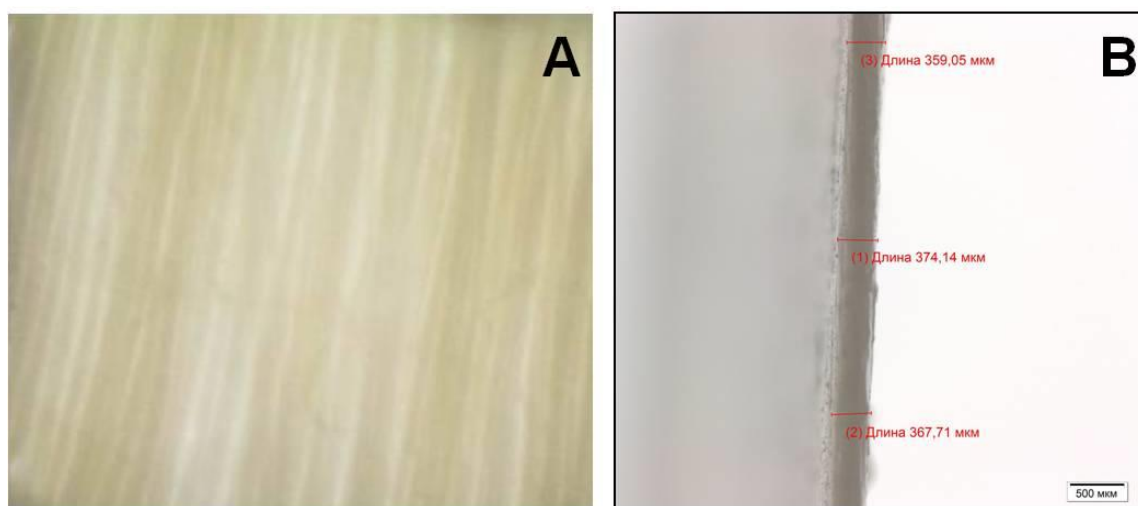


Рисунок 10 – Морфометрический анализ толщины образца ксеногенной брюшины

Среди волокон коллагена хорошо видны ядра клеток (фибробластов) окрашенные в темно-синий цвет. В образце брюшины до децеллюляризации зачастую встречаются мелкие капилляры кровеносных сосудов (рисунок 11).

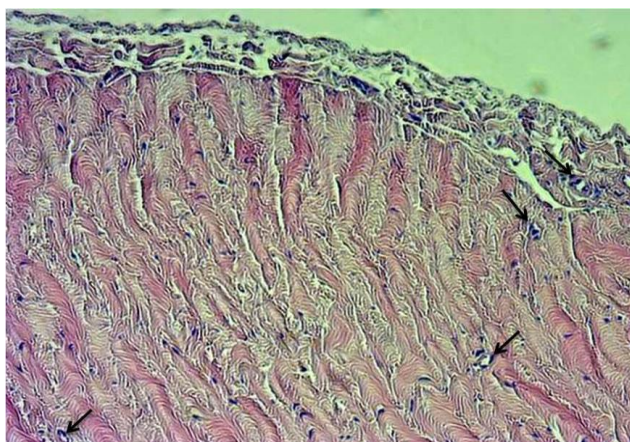
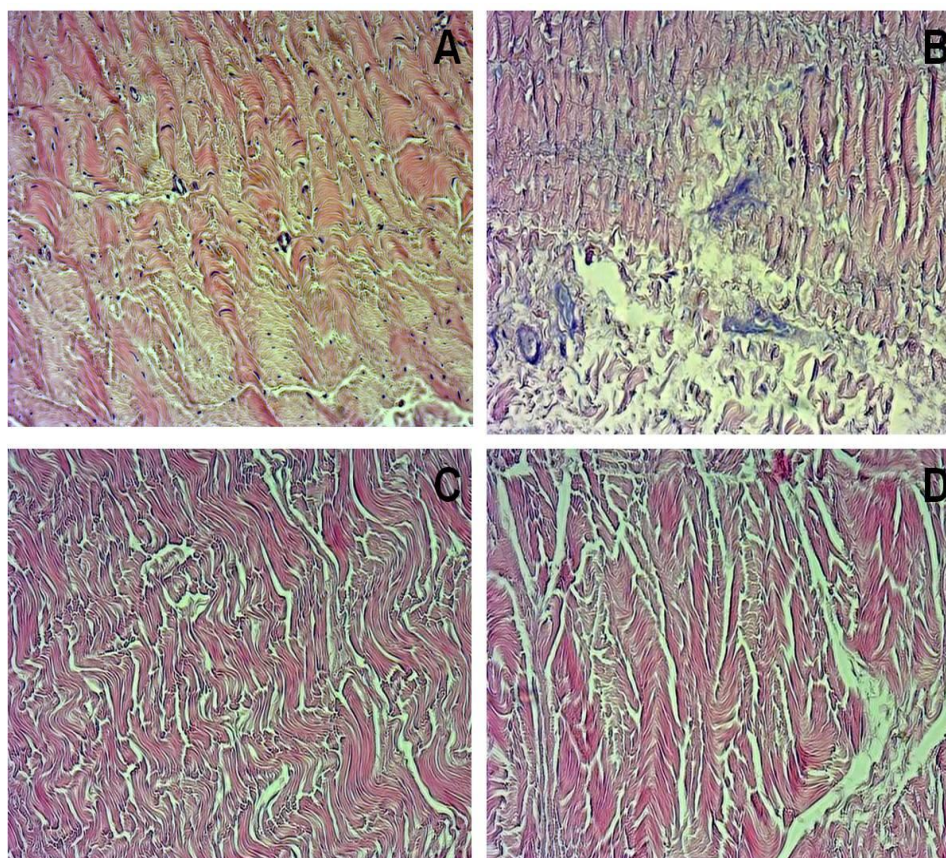


Рисунок 11 – Поперечный гистологический срез интактной ксеногенной брюшины. Черные стрелки указывают на кровеносные капилляры. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 50$

3.2 Результаты морфологической оценки образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Гистоморфологический анализ децеллюляризованных образцов брюшины показал, что клетки и их ядерный материал были полностью удалены из ткани после 2 цикла децеллюляризации. По сравнению с интактной (контроль) брюшиной в образцах внеклеточного матрикса ксенобрюшины видны только коллагеновые волокна без клеток и кровеносных капилляров (рисунок 12).

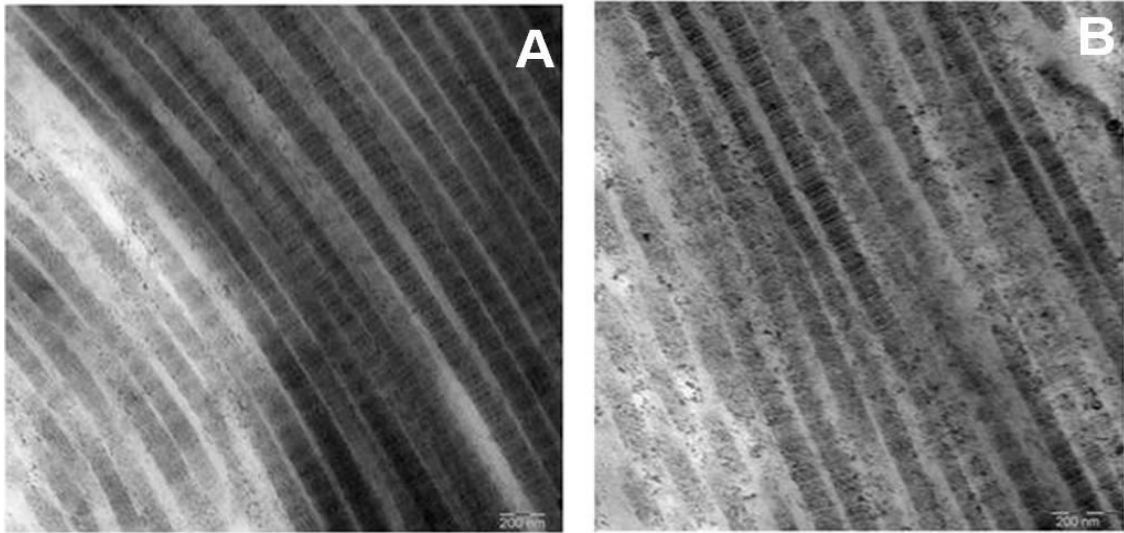


А) Интактная брюшина. Хорошо видны ядра клеток и кровеносные капилляры. В) Образец брюшины после 1 цикла децеллюляризации. С) Образец брюшины после 2 цикла децеллюляризации. D) Образец брюшины после 3 цикла децеллюляризации.

Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Рисунок 12 – Морфологический анализ образцов ксеногенной брюшины после децеллюляризации

Чтобы определить, влияет ли обработка повидон-йодом и децеллюляризация, в частности обработка 0,25% раствором додецилсульфата натрия на ультраструктуру коллагеновых фибрилл было проведено исследование с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (рисунок 13).



А) Интактная брюшина; В) после процесса децеллюляризации

Рисунок 13 – Ультраструктурный анализ фибрилл коллагена образцов ксеногенной брюшины после децеллюляризации

Результаты анализа показали, что никаких заметных нарушений в ультраструктуре коллагена после обработки повидон-йодом и децеллюляризации не обнаружено. Это заключение было сделано в результате сравнения расстояний между темными бэндами в опытных и контрольных образцах, которое обычно варьирует в пределах 55 – 64 нм.

3.3 Результаты стерилизации образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Результаты гистологического анализа показали, что оптимальной дозой для стерилизации образцов брюшины является доза в 16 кГр (рисунок 14).

При этой дозе облучения сохраняются морфоструктурные характеристики коллагеновых и эластиновых волокон. В других образцах облученные более высокими дозами γ -излучения наблюдались существенные деструктивные изменения коллагеновых и эластиновых волокон. Особенно это было видно в образцах подвергнутых облучению дозой 77 кГр.

Для того, чтобы убедиться в стерильности полученных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины, был проведен ПЦР анализ и ЛАЛ-тест на определение микоплазмы и бактериальных эндотоксинов. Согласно результатам ПЦР установлено, что опытные образцы внеклеточного матрикса ксенобрюшины не контаминированы микоплазмой (рисунок 15).

Данные полученные с помощью ЛАЛ-теста, также не выявили наличие бактериальных эндотоксинов. Уровень эндотоксинов составлял в пределах нормы и не превышал значения 0,1 Ед/мл.

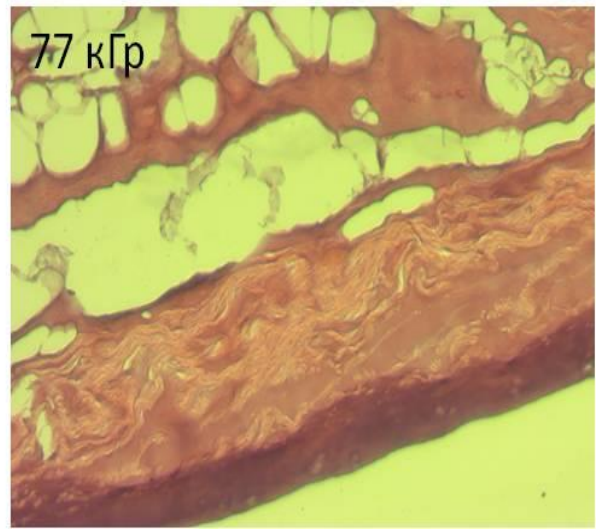
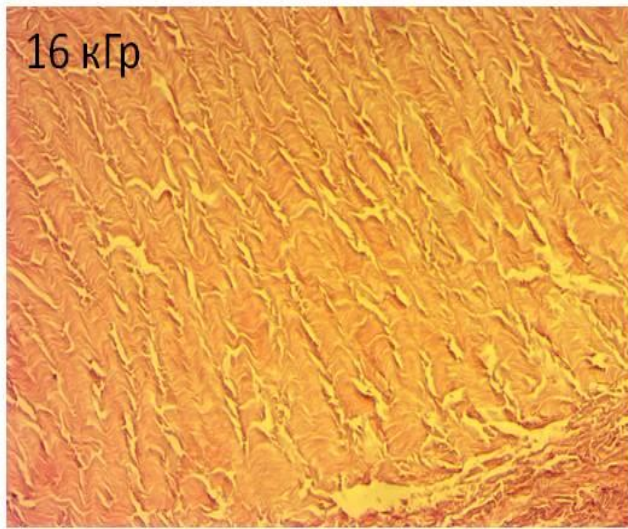
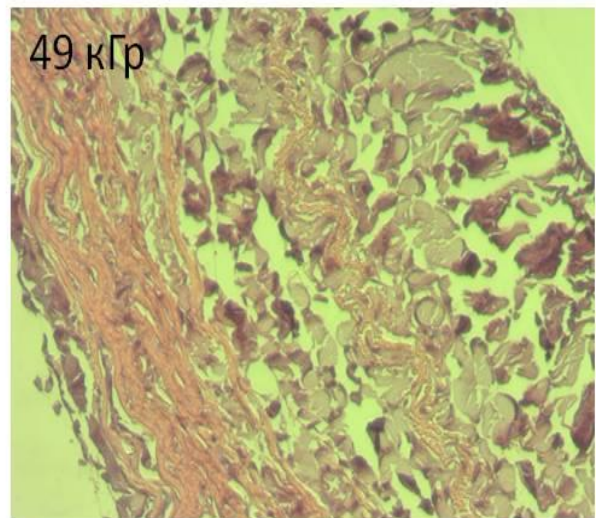
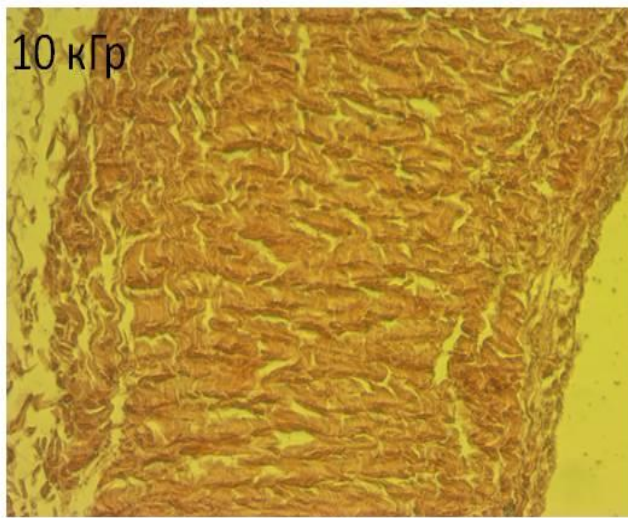
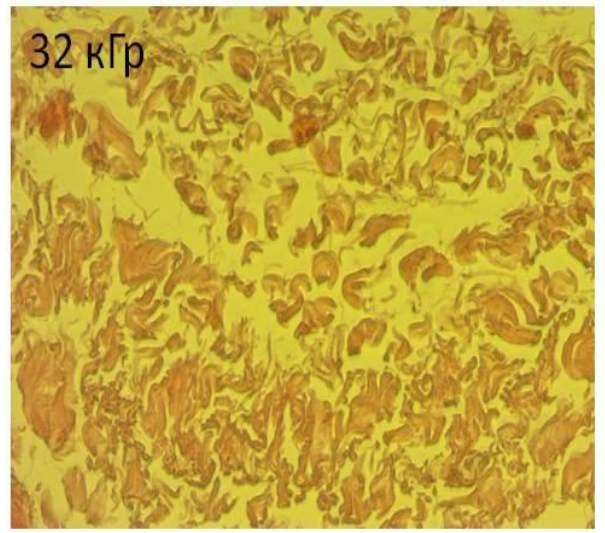
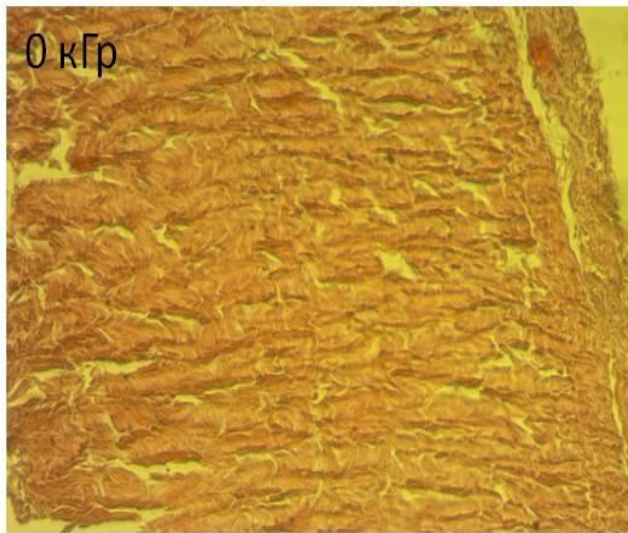
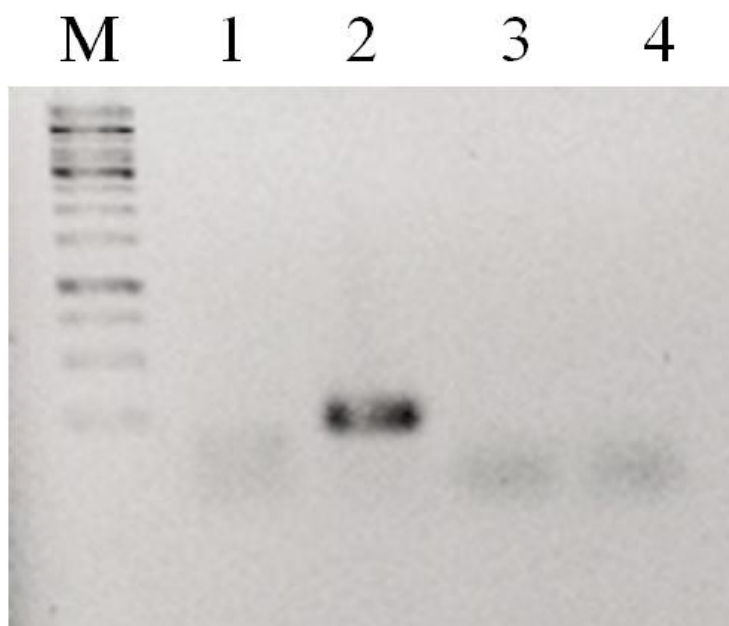


Рисунок 14 – Образцы внеклеточного матрикса ксенобрюшины после облучения различными дозами γ -лучами



М – маркер, 1 – негативный контроль, 2 – позитивный контроль, 3 и 4 – опытные образцы внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Рисунок 15 – ПЦР-анализ образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины на наличие микоплазмы после стерилизации

3.4 Результаты экспериментального исследования применения образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины

3.4.1 Оценка состояния экспериментальных животных после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»

В послеоперационном периоде наблюдения смертность лабораторных крыс отсутствовала. Общее состояние животных после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины в опытной группе, и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» в группе сравнения не изменилось. Аппетит и потребление воды в опытной группе были сопоставимы с данными группы сравнения. Интенсивность и характер двигательной активности, координация движений, тонус скелетных мышц сохранились на прежнем уровне. Поведенческие реакции не отклонялись от нормы. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители были без изменений. При визуальном осмотре состояния волосяного и кожного покрова, окраски видимых слизистых патологических изменений не отмечено.

В ходе эксперимента отмечалась положительная динамика массы тела экспериментальных животных. Данные о динамике массы тела животных исследуемых групп представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Динамика массы тела экспериментальных крыс

Группы	Динамика массы (г), сутки после начала опыта							Прирост массы тела, г
	Фон	Период наблюдения (сутки)						
		5	7	14	21	30	180	
Внеклеточный матрикс ксенобрюшины	187± 19	193± 11,5	196± 7,8	213± 13,1	228± 17,5	236± 12,7	445± 35	+ 258
Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol»	187± 19	192± 12,3	194± 10,4	216± 15,3	231± 22,2	242± 18,5	452± 48	+ 265

Как видно из представленной таблицы в опытной группе отмечается сопоставимая с группой сравнения прибавка в весе у лабораторных крыс в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что оперативное вмешательство и присутствие имплантата не вызывает значимых изменений со стороны общего состояния, поведения, потребления воды и пищи экспериментальными животными, что находит свое отражение в приросте массы тела в течение всего эксперимента.

3.4.2 Оценка локального статуса

В опытной группе (n=48), где для замещения дефекта передней брюшной стенки применялся внеклеточный матрикс ксенобрюшины, заживление первичным натяжением отмечалось в 95,8% (n=46) случаев (рисунок 16), эпизоды несостоятельности линии шва отмечались в 4,2% наблюдений (n=2).

В группе сравнения (n=48), где использовался в качестве пластического материала ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol», в 89,6% (n=41) случаев происходило заживление первичным натяжением, в то время как в 10,4% (n=5) случаев отмечался диастаз краев послеоперационной раны с инфицированием и нагноением, ввиду сгрызания животными шовного материала. Возможно, это связано с более грубой консистенцией биоимплантата «Permacol», причиняющим определенный дискомфорт экспериментальным животным в брюшной полости, и попыткой ими его извлечь (рисунок 17А).

Всем экспериментальным животным в опытной группе и группе сравнения, у которых отмечалась несостоятельность швов послеоперационной раны, проводилась санация очага раневой инфекции с применением раствора хлоргексидина биглюконата 0,05% и системная антибактериальная терапия энрофлоксацином («Энфлорекс») в дозировке 0,1 мл – 10 мг дополнительно в течение 7 дней.

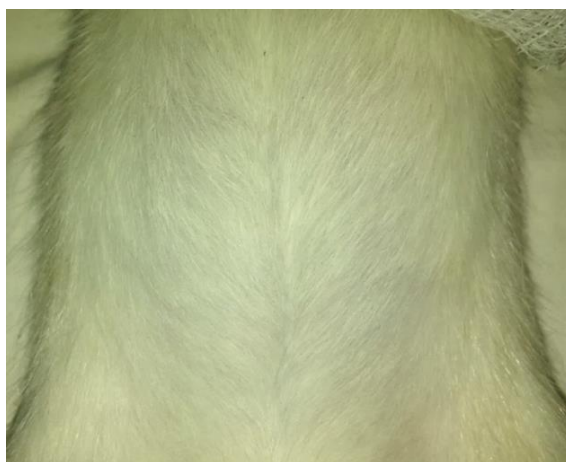


Рисунок 16 – Внеклеточный матрикс ксенобрюшины.
Первичное заживление послеоперационной раны (21 сутки)



А) Диастаз краев раны с воспалением



В) заживление раны после наложения ранних вторичных швов

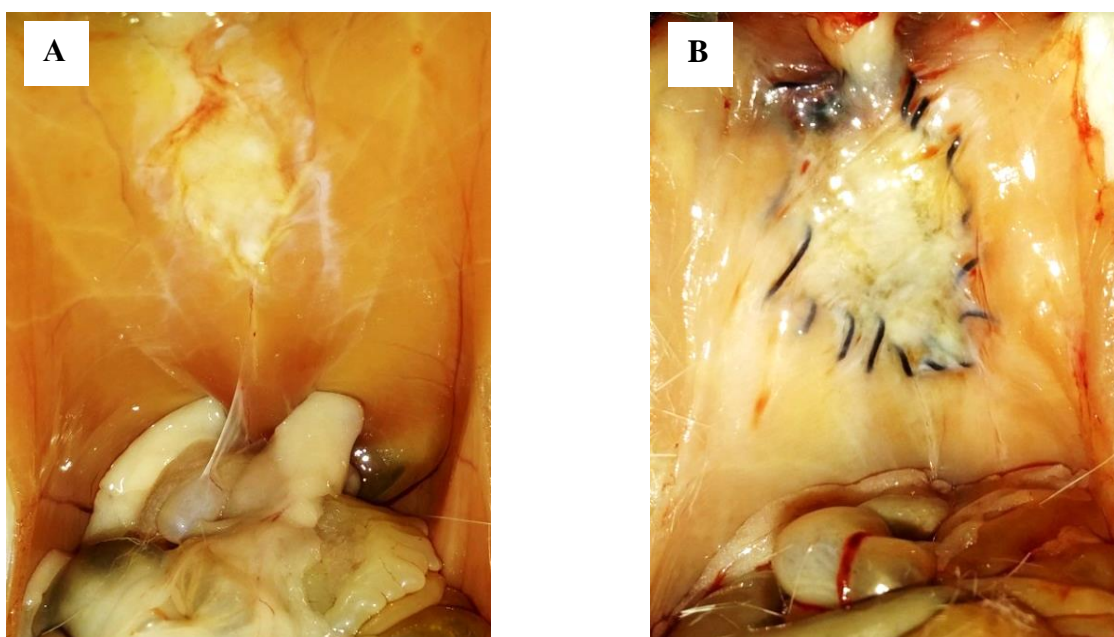
Рисунок 17 – Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol».
Течение раневого процесса, осложненного нагноением в послеоперационном периоде

При стихании явлений воспаления, края раны были сведены путем наложения ранних вторичных швов с последующим заживлением (рисунок 17В).

3.4.3 Макроскопическая оценка периимплантационной зоны

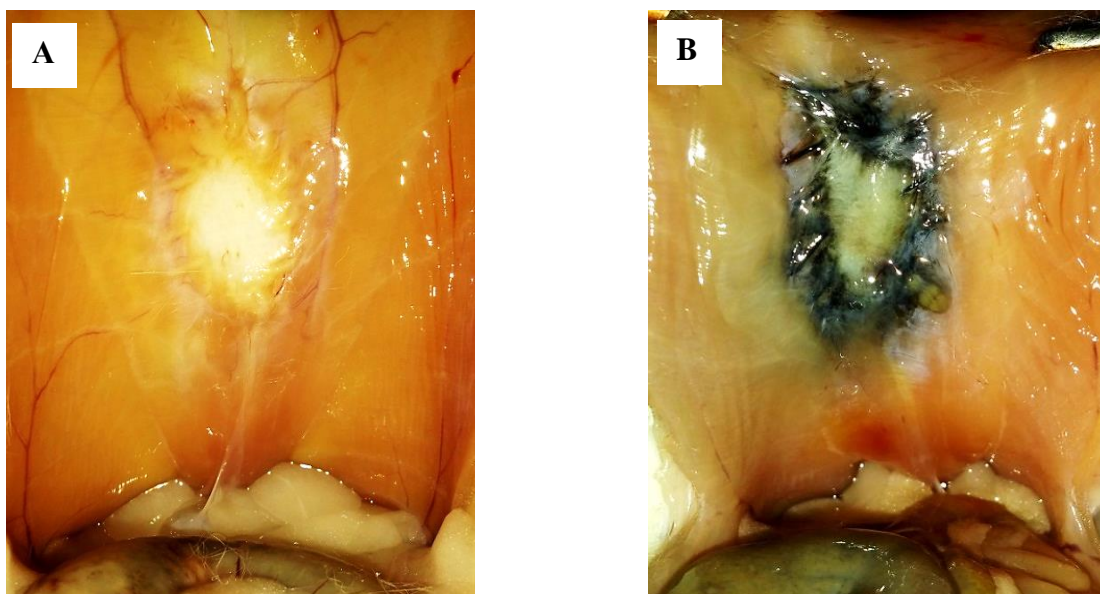
При макроскопическом исследовании зоны имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины у экспериментальных животных на сроках 5, 7, 14, 21, 30, 180 дней, в 95,8% патологических изменений и осложнений со стороны

изучаемого материала не обнаружено (рисунок 18А). В 4,2% (n=2) случаев отмечалось инфицирование имплантата с краевыми очагами некроза на сроках 14 и 21 суток наблюдения по 1 случаю соответственно (рисунок 18В, таблица 8).



А) Неизмененный имплантат, В) Краевой очаг некроза

Рисунок 18 – внеклеточный матрикс ксенобрюшины, 21 сутки после имплантации



А) Неизмененный имплантат, В) Некроз периимплантационной зоны

Рисунок 19 – ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol», 21 сутки после имплантации

Таблица 8 – Сравнительная характеристика макроскопических изменений в периимплантационной зоне

Сроки наблюдения	Внеклеточный матрикс ксенобрюшины				Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol»			
	n=48				n=48			
	Первичное натяжение	Вторичное натяжение	Спайки брюшной полости	Некроз имплантата	Первичное натяжение	Вторичное натяжение	Спайки брюшной полости	Некроз имплантата
5 сут, n	8	-	4	-	8	-	6	-
7 сут, n	8	-	2	-	7	1	2	1
14 сут, n	7	1	5	1	6	2	3	2
21 сут, n	7	1	5	1	7	1	5	1
30 сут, n	8	-	5	-	7	1	7	1
180 сут, n	8	-	2	-	8	-	3	-
Итого, n (абс/%)	46/ 95,8%	2/ 4,2%	23/ 48%	2/ 4,2%	43/ 89,6%	5/ 10,4%	26/ 54,2%	5/ 10,4%

В группе сравнения за весь период наблюдения признаки некротических изменений имплантата фиксировались в 10,4% (n=5) случаев (рисунок 19В). Данные изменения встречались на сроках 7, 14, 21, 30 суток (таблица 8).

При оценке частоты встречаемости спаек между исследуемыми имплантатами и органами брюшной полости статистически значимых различий в обеих группах не выявлено – в группе с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины спаечный процесс отмечался в 48% (n=23) случаев, в то время как в группе сравнения этот показатель был на уровне 54,2% (n=26) соответственно (p>0,05).

Характеристика выраженности спаечного процесса брюшной полости в исследуемых группах приведена ниже (см. раздел 3.4.4.4).

Анализ полученных макроскопических данных показал, что постимплантационный период в группе с применением внеклеточного матрикса брюшины, протекал более благоприятно, с достоверно меньшими, чем в группе сравнения раневыми осложнениями – 4,2% против 10,4% (p<0,05).

3.4.4 Результаты оценки спаечного процесса после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»

Результаты оценки спаечного процесса между внеклеточным матриксом ксенобрюшины и органами брюшной полости согласно шкале Vandendael представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты оценки спаечного процесса после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Внеклеточный матрикс ксенобрюшины						
номер образца	ширина (мм)	толщина (мм)	прочность	количество спаек (шт)	баллы	класс
2	2	1,5	++	1	7	2
3	2	1,7	++	2	7	2
6	7	2	++	1	7	2
8	5	1	++	1	7	2
9	1,2	0,9	+	1	4	1
10	1,3	1	++	1	6	2
17	0,4	0,5	+	1	4	1
18	1,4	0,8	+	1	4	1
21	1,6	1,2	++	1	6	2
22	1,1	1	+	2	6	2
24	11	4	+++	1	10	3
25	3	1,6	++	1	7	2
29	10	1,1	+	1	6	2
30	7	1,4	++	2	7	2
31	1,3	0,8	+	1	4	1
32	6	1	++	3	8	2
34	1	0,8	+	1	4	1
36	3	0,5	+	2	4	1
37	4	0,8	+	1	5	2
38	3,5	0,6	++	1	6	2
40	1,2	0,8	+	1	4	1
43	4	1,2	++	1	7	2
45	3	0,5	+	1	5	2

После применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для закрытия дефекта передней брюшной стенки в послеоперационном периоде на сроках 5, 7, 14, 21, 30, 180 суток формирование спаек зафиксировано у 23 экспериментальных животных (48%).

В большинстве зарегистрированных случаев (n=19/82,6%) спайки формировались по краю имплантата, непосредственно в месте контакта с шовным материалом. Средние размеры образованных спаек составляют: толщина – $0,56 \pm 0,77$ мм, ширина – $1,5 \pm 2,3$ мм (рисунок 20А).

Согласно критериям шкалы Vandendael общий средний балл для 48 экспериментальных животных в опытной группе наблюдения составил 2,8, что согласно градации выраженности спаечного процесса, классифицируется как Класс 1 – незначительные спайки брюшной полости.



А) Внеклеточный матрикс ксенобрюшины, В) Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol»

Рисунок 20 – спаечный процесс брюшной полости после имплантации

Результаты оценки формирования спаек брюшной полости после имплантации ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты оценки спаечного процесса после имплантации ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol»

Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol»						
номер образца	ширина (мм)	толщина (мм)	прочность	количество спаек (шт)	баллы	класс
1	2	3	4	5	6	7
51	11	4	+++	1	10	3
52	8	3	+++	1	8	2
53	10	4	+++	2	9	3
54	5	2,2	+++	1	7	2
55	4	1,2	++	2	8	2
56	12	4	+++	1	10	3
57	3	2	++	1	7	2
58	4	1,5	++	1	7	2
65	5	1,2	++	2	8	2
68	5	2,5	+++	1	8	2
71	3	1,3	++	2	8	2
73	7	3,2	+++	1	9	3

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5	6	7
75	3	1	+	1	6	2
78	2	1,8	+	1	6	2
79	6,5	2,2	++	1	7	2
80	8	2	++	1	7	2
81	4	0,8	++	1	6	2
82	4,5	1	+	1	6	2
83	2,5	0,5	+	1	5	2
85	3,2	1,2	++	1	7	2
86	6,5	1	++	1	7	2
87	4,3	1,1	++	1	7	2
88	3,5	0,7	+	1	5	2
90	3	1	++	1	7	2
91	3,2	1,5	++	1	7	2
92	2,1	0,8	++	2	7	2

Установлено, что в группе сравнения, где пластический материал был представлен ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol», спайки брюшной полости наблюдались на известных сроках наблюдения у 26 животных (54,2%). Характер спаечного процесса визуально был более выражен по отношению с опытной группой: толщина спаек в среднем составляла $0,97 \pm 1,19$ мм, ширина – $2,78 \pm 3,26$ мм (рисунок 20В).

Однако, при проведении сравнительного статистического анализа между исследуемыми группами по критериям «ширина» и «толщина» образованных спаек, статистически значимых различий между группами не выявлено ($p > 0,05$). Фиксация спаек брюшной полости в периимплантационной зоне отмечается как в месте контакта шовного материала, так и непосредственно по поверхности имплантата «Permacol», что в процентном соотношении составило 52,2% и 47,8% соответственно. Общий средний балл для группы сравнения ($n=48$) составил 4,02, что согласно градации выраженности спаечного процесса, классифицируется как Класс 2 – умеренные спайки брюшной полости.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что применение исследуемого биологического материала – внеклеточного матрикса ксенобрюшины, при пластике дефектов передней брюшной стенки в сравнении с ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol» характеризуется формированием незначительных спаек брюшной полости (Класс 1), преимущественно по краю зоны имплантации в месте контакта шовного материала, и не зависит от срока экспозиции материала.

3.4.5 Результаты исследования морфологической картины взаимодействия внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permasol» с тканями передней брюшной стенки экспериментальных животных

Проведена сравнительная гистологическая оценка клеточного инфильтрата в репрезентативных участках контакта внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permasol» с тканями передней брюшной стенки. Процесс формирования зрелой соединительной ткани в исследуемых группах, состав клеточного инфильтрата характеризовался стадийно-специфической сменой экссудативной фазы в пролиферативную фазу в постимплантационном периоде на сроках согласно дизайну исследования – 5, 7, 14, 21, 30, 180 суток.

Клеточный состав репрезентативного участка зоны имплантации, а также стадийно-специфические изменения в течение раневого процесса в опытной группе, представлены в таблице 11, на рисунке 21.

Таблица 11 – Клеточный состав в зоне имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины в исследуемые сроки после операции, $\bar{X} \pm SD$

Вид клеток	5 суток	7 суток	14 суток	21 сутки	30 суток	180 суток
Гранулоциты	42,50 ±3,94	33,25 ±4,01	13,75* ±5,28	4,46* ±1,18	3,17* ±1,32	1,67* ±0,75
Лимфоциты	28,92 ±2,76	32,96 ±3,4	40,50 ±6,59	19,4#* ±6,19	18,29* ±3,07	7,6* ±1,85
Плазматические клетки	7,33 ±1,36	4,63 ±1,37	3,04 ±1,07	0,96* ±0,84	0,67* ±0,62	0,4* ±0,37
Макрофаги	7,04 ±1,36	9,25 ±1,5	10,67 ±1,76	9,63 ±2,8	5,75# ±3,72	4,67 ±1,33
Фиброциты/ фибробласты	14,21 ±2,96	19,92 ±2,91	32,04* ±3,9	65,54* ±7,25	72,13* ±3,72	85,7* ±2,3

Примечания:

* - статистическая значимость различий по отношению к начальному сроку наблюдения ($p < 0,05$)

- статистическая значимость различий по отношению к предыдущему сроку наблюдения ($p < 0,05$)

Клеточный состав репрезентативного участка зоны имплантации, а также стадийно-специфические изменения в течение раневого процесса в группе сравнения ацеллюлярного дермального коллагена «Permasol» представлены на рисунке 22, в таблице 12.

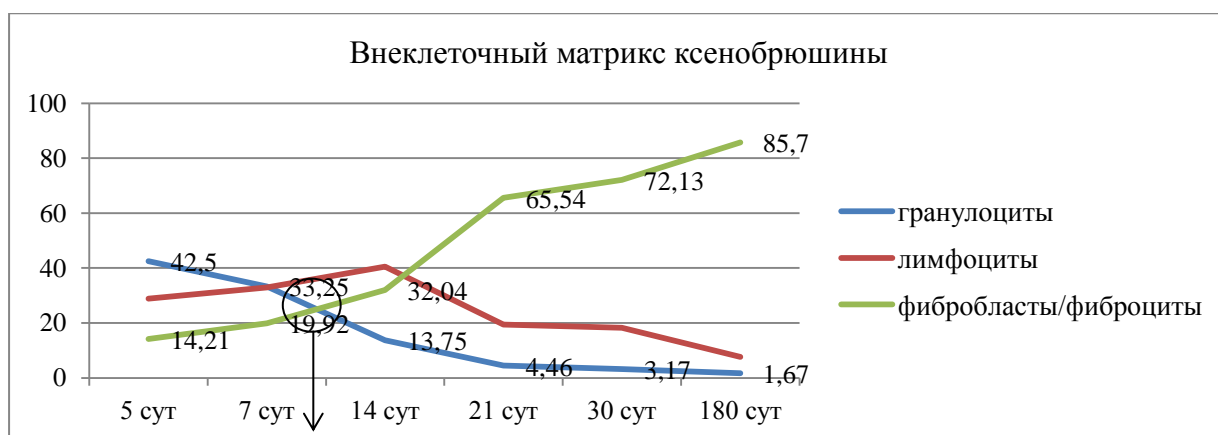


Рисунок 21 – Динамика изменения количественного состава клеточного инфильтрата в опытной группе (стрелкой указано начало перехода экссудативной фазы раневого процесса в пролиферативную фазу)

Таблица 12 – Клеточный состав в зоне имплантации ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» в исследуемые сроки после операции, $\bar{X} \pm SD$

Вид клеток	5 суток	7 суток	14 суток	21 сутки	30 суток	180 суток
Гранулоциты	57,08 ±4,23	57,75 ±4,06	45,58 ±11,37	24,13* ±16,2	17* ±14	3,05* ±1,4
Лимфоциты	20,71 ±4,02	19,38 ±2,51	22,46 ±5,06	22,71 ±6,24	18,33 ±3,04	6,71* ±1,89
Плазматические клетки	8,08 ±2,05	4,96 ±0,79	5,17 ±1,57	3,38* ±1,38	1,38* ±0,58	0,57* ±0,59
Макрофаги	7,21 ±2,37	9,29 ±1,75	12,75 ±5,21	22,38* ±8,5	8,42# ±5,48	5,76 ±1,51
Фиброциты/ фибробласты	6,92 ±1,74	8,63 ±3,78	14,04 ±3,16	27,42* ±11,86	53,88* ±17,89	83,4* ±4,17

Примечания:

* - статистическая значимость различий по отношению к начальному сроку наблюдения ($p < 0,05$);

- статистическая значимость различий по отношению к предыдущему сроку наблюдения ($p < 0,05$).

Анализ полученных данных показал, что процесс созревания соединительной ткани в обеих группах завершается к 30 суткам с образованием состоятельного рубца. Однако течение раневого процесса, смена фаз экссудации и пролиферации в опытной группе и группе сравнения отличается по срокам и процентному соотношению состава клеточного инфильтрата на исследуемых сроках наблюдения.

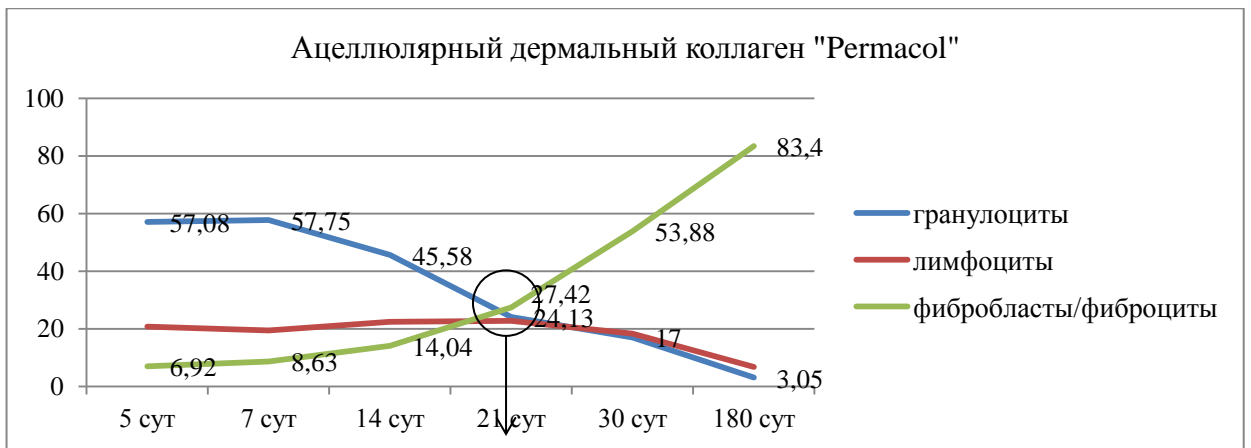


Рисунок 22 – Динамика изменения количественного состава клеточного инфильтрата в группе сравнения (стрелкой указано начало перехода экссудативной фазы раневого процесса в пролиферативную фазу)

Так, в опытной группе с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины, на 5-7 сутки отмечается лимфоцитарная инфильтрация в зоне имплантации, с формированием юной грануляционной ткани, богатой новообразующимися тонкостенными сосудами (рисунок 23).

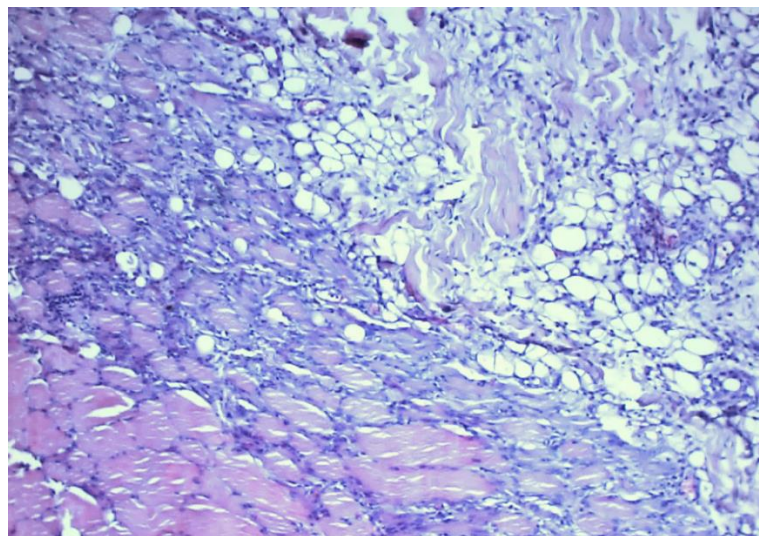


Рисунок 23 – Репрезентативный фрагмент контакта внеклеточного матрикса ксенобрюшины с передней брюшной стенкой на 5 сутки. Формирующаяся грануляционная ткань с новообразующимися тонкостенными сосудами, инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами.

Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$

В клеточном инфильтрате отмечается преобладание гранулоцитарных клеток над другими клеточными элементами, что характеризует экссудативную фазу тканевой реакции в ответ на имплантацию, операционную травму. В группе сравнения, где для реконструкции передней брюшной стенки

применялся ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol» наблюдается схожая морфологическая картина, с преобладанием гранулоцитарных клеток в клеточном инфильтрате (рисунок 24).

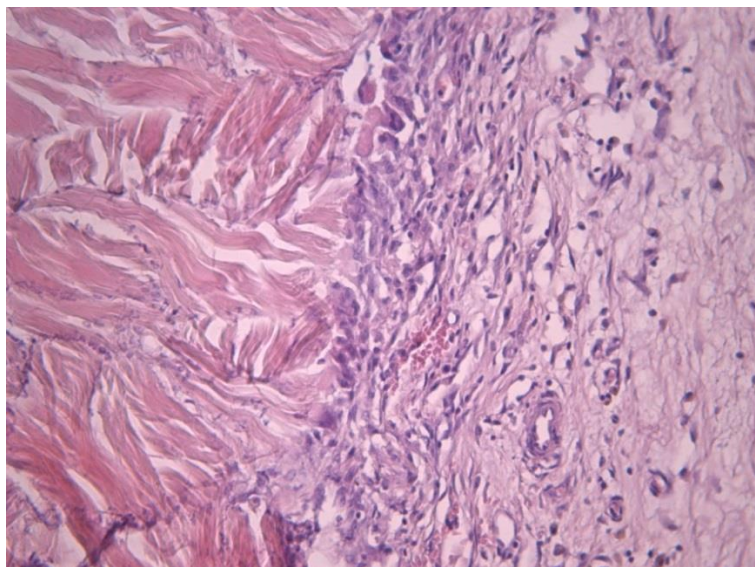


Рисунок 24 – Репрезентативный фрагмент контакта ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» с передней брюшной стенкой на 5 сутки.

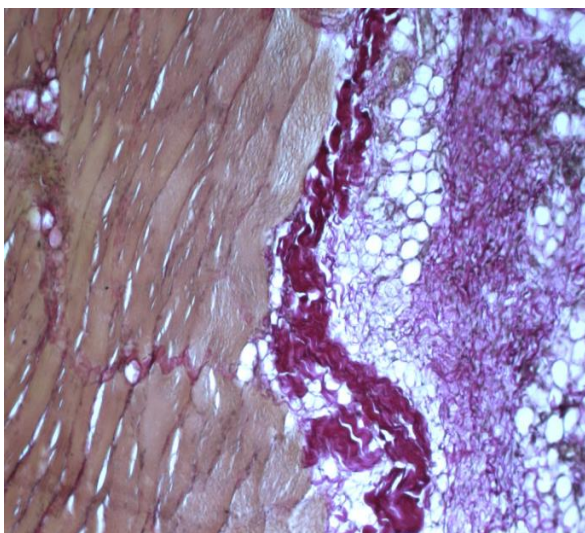
Формирующаяся грануляционная ткань с новообразующимися тонкостенными сосудами, инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами. Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$

Однако, исходя из данных, приведенных в таблице 11, на рисунке 21, в ходе динамически изменяющегося количественного состава клеточного инфильтрата в опытной группе, уже к 7 суткам фиксируется формирование «перекреста» между гранулоцитарными клетками и лимфоцитами, что свидетельствует о переходе экссудативной фазы в пролиферативную фазу течения раневого процесса.

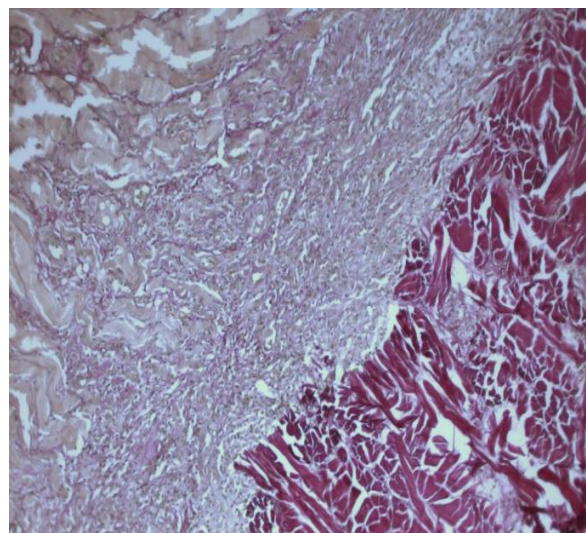
На 5 сутки соединительная ткань, как в опытной группе, так и группе сравнения, характеризовалась рассеянным образованием нитевидных ретикулярных волокон и составила менее 10% в поле зрения (рисунок 25).

В тоже время в опытной группе с использованием внеклеточного матрикса ксенобрюшины отмечается статистически значимое увеличение стромальных клеток фибробласты/фиброциты в отношении к показателям группы сравнения ($p=0,001$), с увеличением зрелых соединительнотканых структур на 7 сутки, которые составили от 10% до 50% в поле зрения.

В опытной группе плазматические клетки ($7,33\pm 1,36\%$) и макрофаги ($7,04\pm 1,69\%$) распределялись в клеточном инфильтрате зоны имплантации очагово, равно как и в группе сравнения – $8,08\pm 2,05\%$ и $7,21\pm 2,37\%$ соответственно, среди тонких нитевидных ретикулярных волокон и в периваскулярном пространстве тонкостенных сосудов. Статистически значимых различий между группами по данным критериям на сроках 5 и 7 суток не выявлено ($p>0,05$).



А) Внеклеточный матрикс ксенобрюшины



В) Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol»

Рисунок 25 – Формирование нитевидных соединительнотканых волокон в участке контакта передней брюшной стенки с имплантатом на 5 сутки. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизон $\times 400$

Процесс ангиогенеза на 5 и 7 сутки в обеих группах характеризовался формированием тонкостенных полнокровных мелкокалиберных сосудов с наличием единичных набухших эндотелиальных клеток, что характеризует активный процесс ветвления микроциркуляторного русла. В опытной группе количество сосудов в репрезентативном участке гистологического среза составило $n=7,0\pm 1,3$ на 5 сутки и $n=8,38\pm 1,51$ на 7 сутки, и достоверно не отличалось от группы сравнения $n=7,88\pm 1,72$ и $n=8,63\pm 1,41$ ($p>0,05$) (таблица 13).

Таблица 13 – Результаты статистического анализа количественного подсчета сосудов в репрезентативном участке гистологического среза, $\bar{X}\pm SD$

Вид имплантата	5 суток	7 суток	14 суток	21 сутки	30 суток	180 суток
Внеклеточный матрикс ксенобрюшины	7,0 $\pm 1,3$	8,38 $\pm 1,51$	11,63 $\pm 3,25$	9,63 $\pm 2,13$	10,9 $\pm 4,12$	15 $\pm 3,16$
Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol»	7,88 $\pm 1,72$	8,63 $\pm 1,41$	14,0 $\pm 2,93$	12,9 $\pm 2,95$	15,25 $\pm 4,3$	14,63 $\pm 4,24$
p ($\alpha=0,05$)	p=0,29	p=0,67	p=0,19	p=0,025	p=0,057	p=0,27

На 14 сутки после имплантации в опытной группе морфологическая картина характеризуется лимфоцитарной инфильтрацией, созреванием грануляционной ткани и в зоне контакта имплантата с мышечным массивом передней брюшной стенки формируется волокнистая соединительная ткань (рисунок 26).

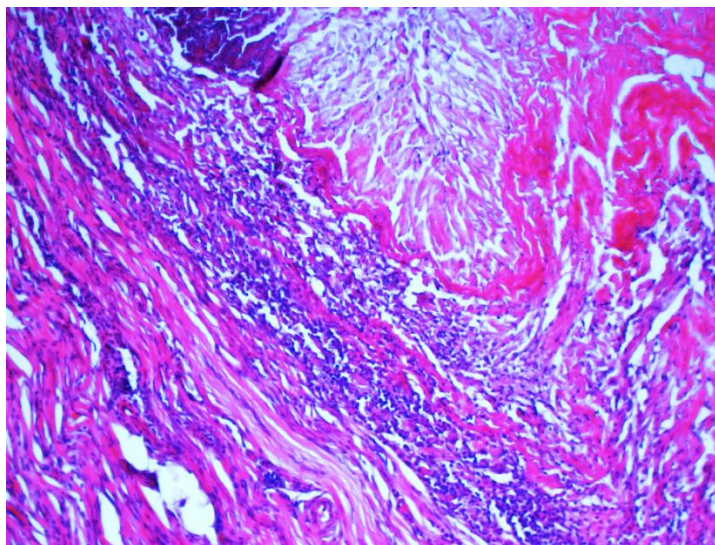


Рисунок 26 – Репрезентативный фрагмент контакта внеклеточного матрикса ксенобрюшины с передней брюшной стенкой на 14 сутки. Созревание грануляционной ткани с преобладанием фибробластов и фиброцитов среди клеточного инфильтрата. Окраска гематоксилином и эозином $\times 400$

Количественный состав клеток периимплантационной зоны на 14 сутки в опытной группе характеризуется превалированием количества лимфоцитарных клеток ($40,5 \pm 6,59\%$), снижением количества гранулоцитарных клеток, и повышением стромальных клеток фибробласты/фиброциты по отношению к показателям 5 и 7 суток, что наглядно представлено на рисунках 27, 28.

Также к 14 суткам отмечается «перекрест» лимфоцитов со стромальными клетками, что свидетельствует об угасании продуктивной фазы тканевой реакции и активации процесса роста стромы, коллагенообразования, что является свидетельством активности фибропластического процесса (рисунок 21).

В группе сравнения на 14 сутки в месте контакта ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» с передней брюшной стенкой отмечается периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация, диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация интерстиция мышечного слоя передней брюшной стенки, межуточный отек (рисунок 29).

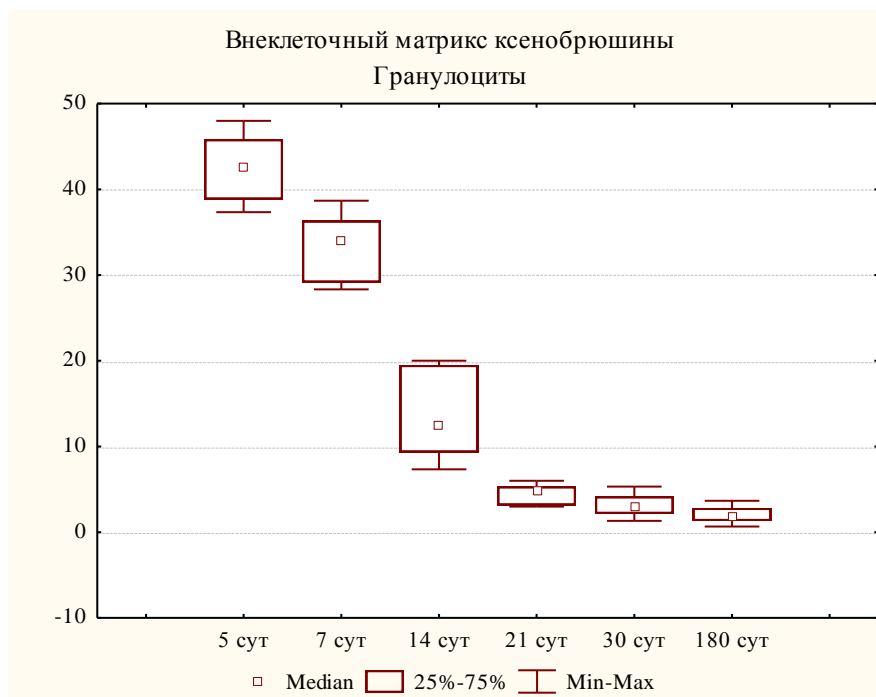


Рисунок 27 – Внеклеточной матрикс ксенобрюшины. Статистический анализ количественного содержания гранулоцитов в клеточном инфильтрате на исследуемых сроках эксперимента

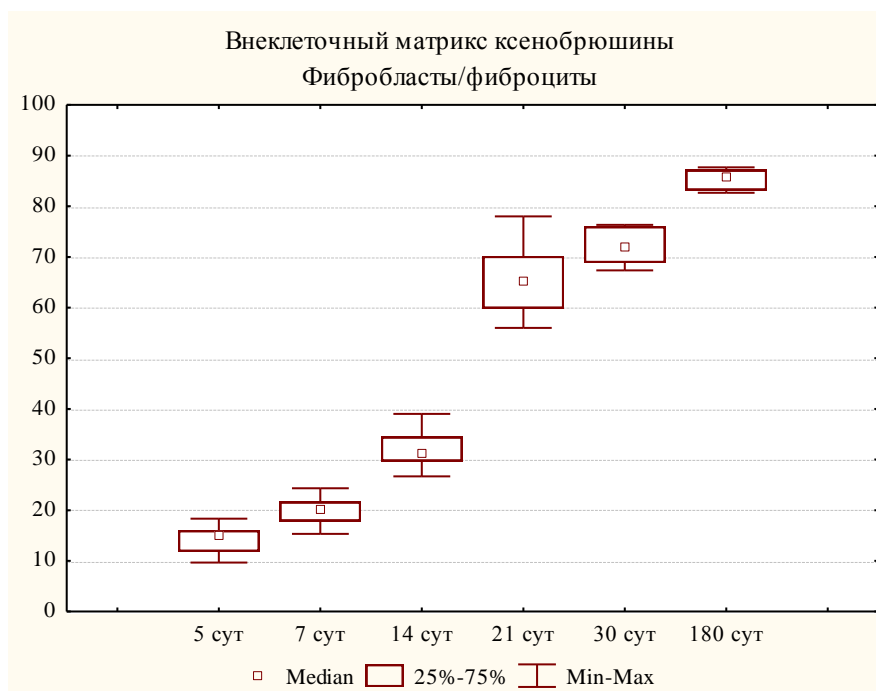


Рисунок 28 – Внеклеточной матрикс ксенобрюшины. Статистический анализ количественного содержания фибробластов/фиброцитов в клеточном инфильтрате на исследуемых сроках эксперимента

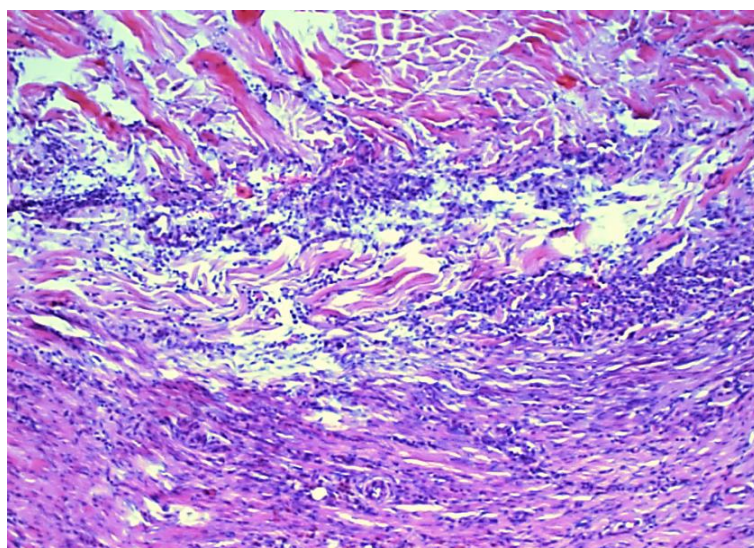


Рисунок 29 – Репрезентативный фрагмент контакта ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» с передней брюшной стенкой на 14 сутки. Преобладанием стромальных клеток и выраженная персистенция гранулоцитов в клеточном инфильтрате. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

В количественном составе клеточного инфильтрата на 14 сутки отмечается тенденция к снижению количества гранулоцитов, однако статистически значимых различий по отношению к 5 и 7 суткам не выявлено ($p > 0,05$) (таблица 12, рисунок 30).

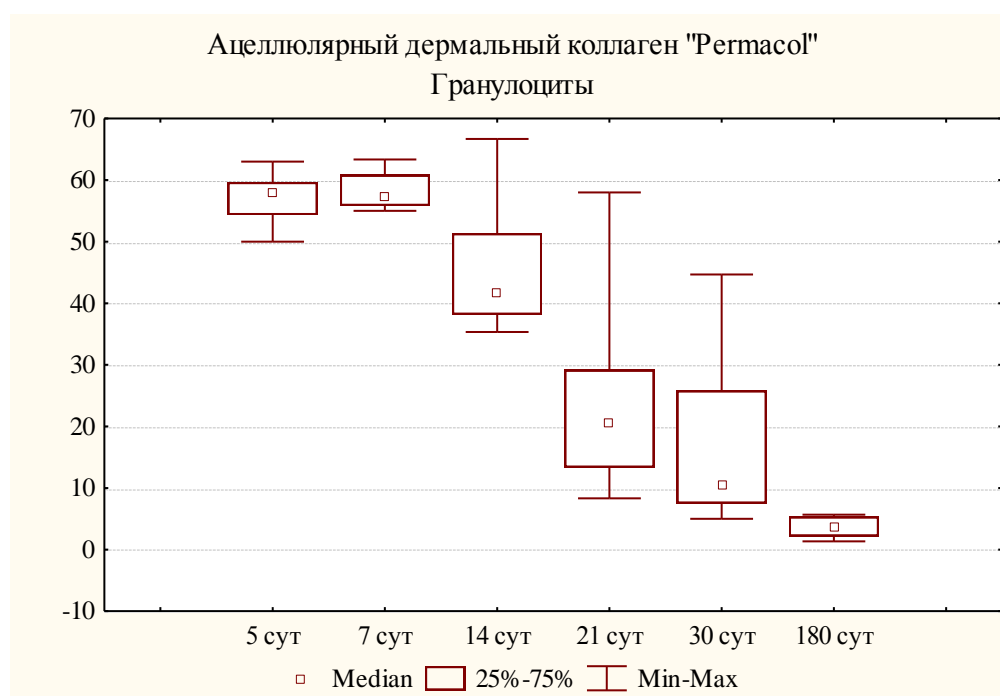


Рисунок 30 – Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol». Статистический анализ количественного содержания гранулоцитов в клеточном инфильтрате на исследуемых сроках эксперимента

Гранулоцитарные клетки преобладают над количеством других клеток – $45,58 \pm 11,37$, что может свидетельствовать о пролонгации экссудативной фазы раневого процесса.

Также прослеживается тенденция к увеличению числа стромальных клеток фибробласты/фиброциты на 14 сутки ($14,04 \pm 3,16$) по отношению к начальным срокам наблюдения ($8,63 \pm 3,78$) (рисунок 22). Однако статистически значимых различий между этими показателями на сроках 5 суток, 7 суток, 14 суток не выявлено ($p > 0,05$) (рисунок 31). Количество лимфоцитов ($22,46 \pm 5,06$) остается на прежнем уровне по отношению к предыдущим периодам наблюдения, статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$) (таблица 12).

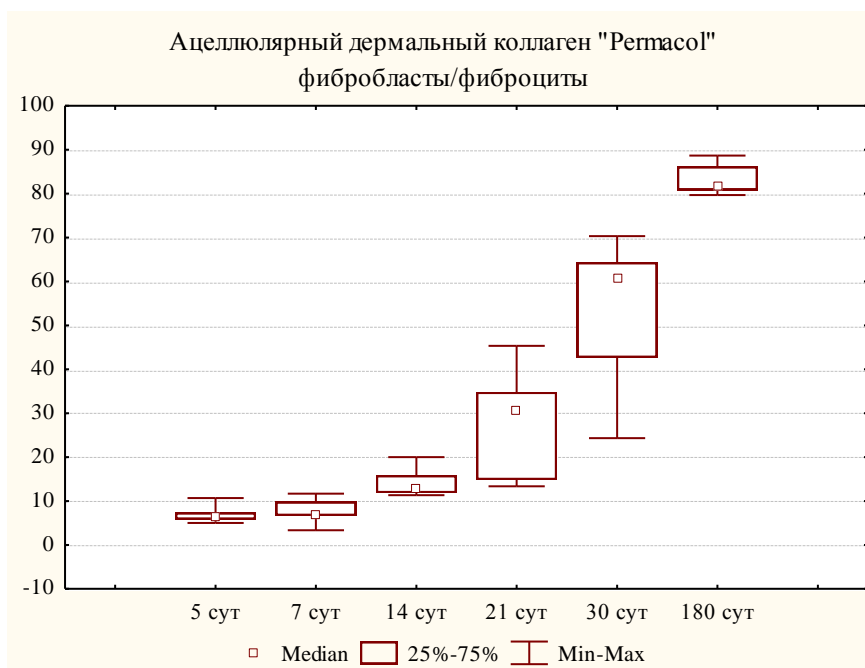
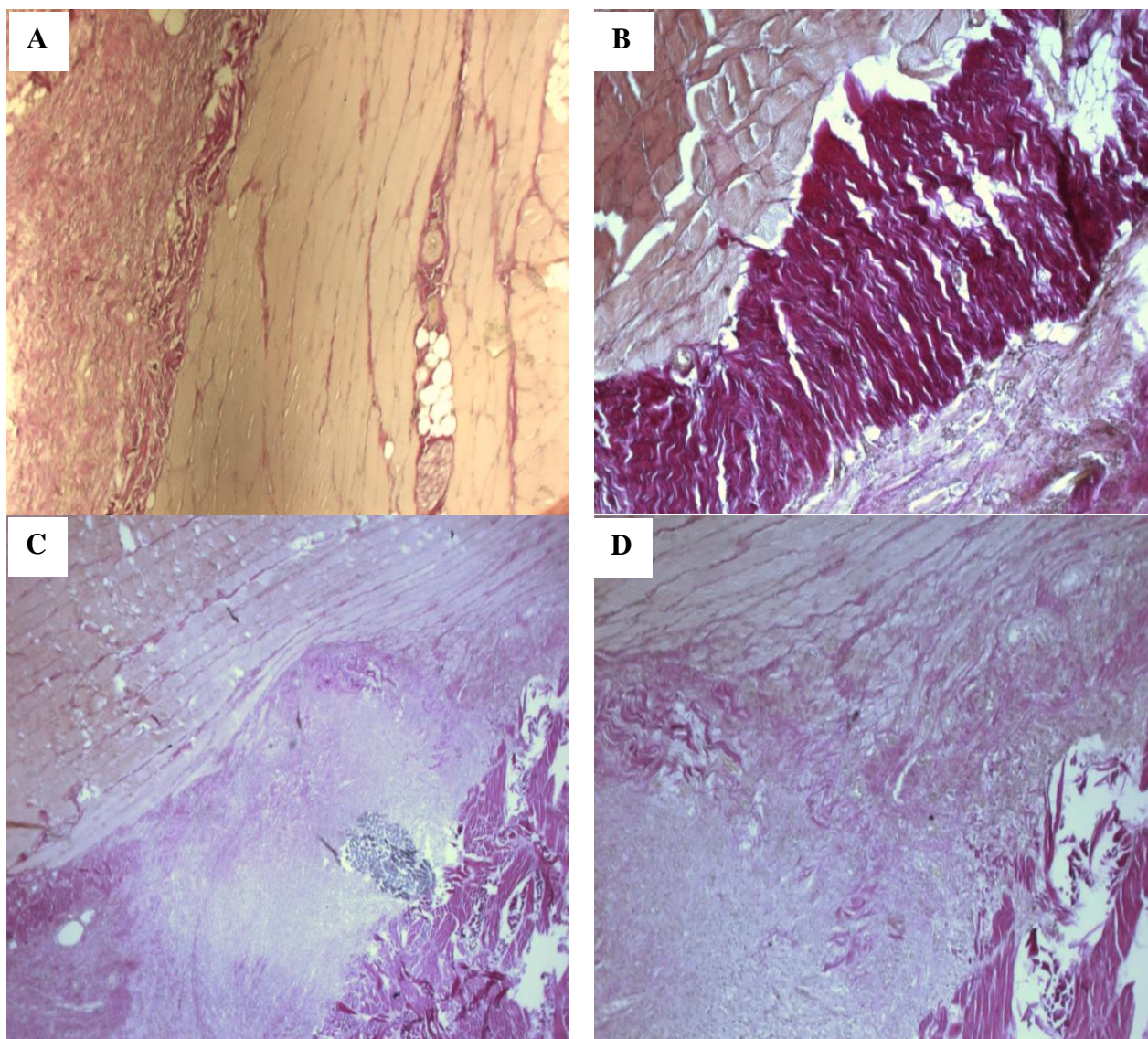


Рисунок 31 – Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permasol».

Статистический анализ количественного содержания фибробластов/фиброцитов в клеточном инфильтрате на исследуемых сроках эксперимента

Формирование соединительной ткани на данном сроке наблюдения, как в опытной группе, так и в группе сравнения, характеризовалась очаговым образованием зрелых соединительнотканых волокон (рисунок 32).

В тоже время, в группе с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины, сохраняется тенденция к увеличению числа стромальных клеток и статистически значимо превышает количество фибробластов/фиброцитов в группе сравнения ($32,04 \pm 3,9$ против $14,04 \pm 3,16$, $p = 0,0007$).



А, В – внеклеточный матрикс ксенобрюшины; С, D – ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol». Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону.
А, С $\times 40$; В, D $\times 100$

Рисунок 32 – Формирование зрелой волокнистой соединительной ткани с преобладанием коллагеновых волокон в участке контакта передней брюшной стенки и имплантата на 14 сутки

В опытной группе плазматические клетки ($3,04 \pm 1,07\%$) и макрофаги ($10,67 \pm 1,76\%$) распределялись в клеточном инфильтрате зоны имплантации очагово, равно как и в группе сравнения – $5,17 \pm 1,57\%$ и $12,75 \pm 5,21\%$ соответственно, среди соединительнотканых волокон и в периваскулярном пространстве сосудов. Однако отмечается статистически значимое уменьшение количества плазматических клеток в периимплантационной зоне в случае применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины ($p=0,01$). Статистически значимых различий между группами по уровню макрофагов в клеточном инфильтрате на сроке 14 суток не выявлено ($p>0,05$).

Процесс ангиогенеза на 14 сутки в обеих группах характеризовался наличием полнокровных сосудов с формирующейся мышечной стенкой. В опытной группе количество сосудов в репрезентативном участке гистологического среза составило $n=11,63\pm 3,25$ и достоверно не отличалось от группы сравнения $n=14,0\pm 2,93$ ($p>0,05$) (таблица 13).

К 21 суткам наблюдения в опытной группе отмечается преобладание зрелой соединительной ткани, прорастание нежных коллагеновых волокон, как в материал, так и в мышечный массив передней брюшной стенки, т.е. имеет место преобладание соединительнотканых структур над клеточным инфильтратом (рисунок 33).

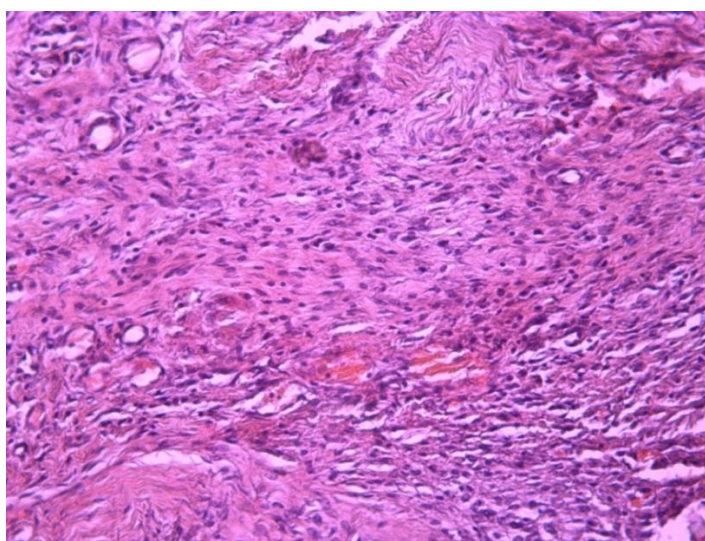


Рисунок 33 – Репрезентативный фрагмент контакта внеклеточного матрикса ксенобрюшины с передней брюшной стенкой на 21 сутки. Превалирование фибробластов/ фиброцитов в клеточном инфильтрате, очаговая увядающая периваскулярная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами. Окраска гематоксилином и эозином $\times 200$

В клеточном инфильтрате происходит статистически значимое уменьшение клеток экссудативной и продуктивной фаз тканевой реакции по сравнению с начальными сроками наблюдения, со значительным преобладанием стромальных клеток (таблица 11, рисунок 28), что свидетельствует об отсутствии реактивного и персистирующего воспалительного процесса в формирующемся рубце (рисунок 34).

В группе сравнения к 21 суткам морфологическая картина зоны имплантации характеризуется единичной инфильтрацией лимфоцитами, крупноочаговым разрастанием соединительной ткани (рисунок 35, 36).

Также, согласно полученным результатам, только к 21 суткам наблюдения можно наблюдать комбинированный «перекрест» гранулоцитарных и лимфоцитарных клеток со стромальными клетками (рисунок 22).

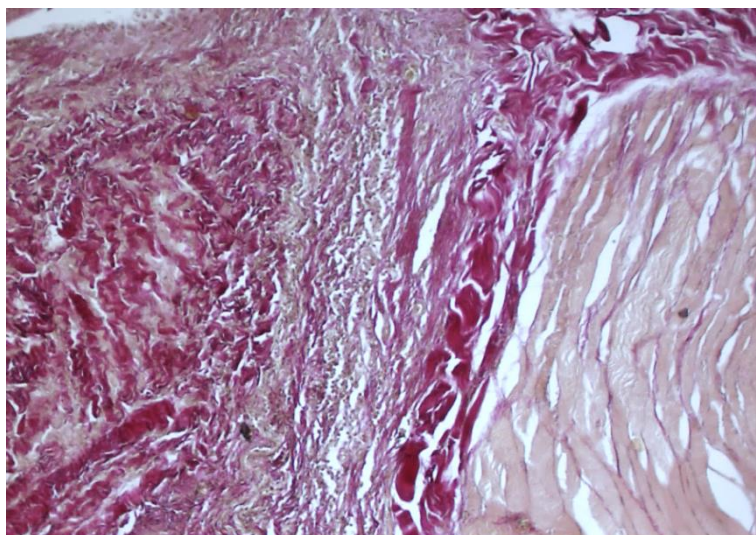


Рисунок 34 – Репрезентативный фрагмент контакта внеклеточного матрикса ксенобрюшины с передней брюшной стенкой на 21 сутки после имплантации. Зрелые волокнистые коллагеновые волокна с формированием зрелой рубцовой ткани. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону $\times 100$

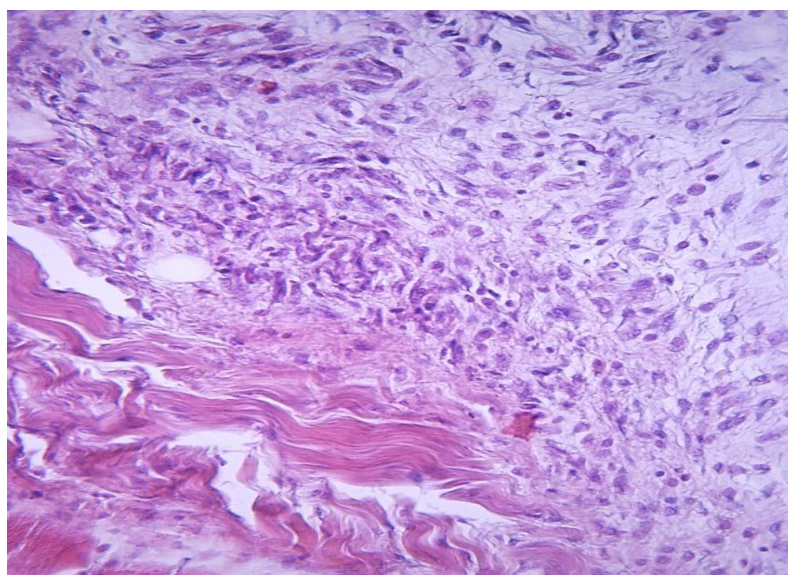


Рисунок 35 – Репрезентативный фрагмент контакта «Permacol» с передней брюшной стенкой на 21 сутки после имплантации. Преобладание фибробластов и фиброцитов в клеточном инфильтрате, персистирующая периваскулярная инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами. Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$

Данное явление можно расценивать как задержка смены экссудативной фазы в пролиферативную фазу, и может свидетельствовать о персистенции реактивного воспалительного процесса на сроках до 21 дня.

В опытной группе, равно как и в группе сравнения сохранялось очаговое распределение плазматических клеток и макрофагов в клеточном инфильтрате среди соединительнотканых волокон и в периваскулярном пространстве

сосудов, однако отмечается статистически достоверное снижение количества данных видов клеток по сравнению с начальными сроками (5 суток) наблюдения (таблица 11, 12).

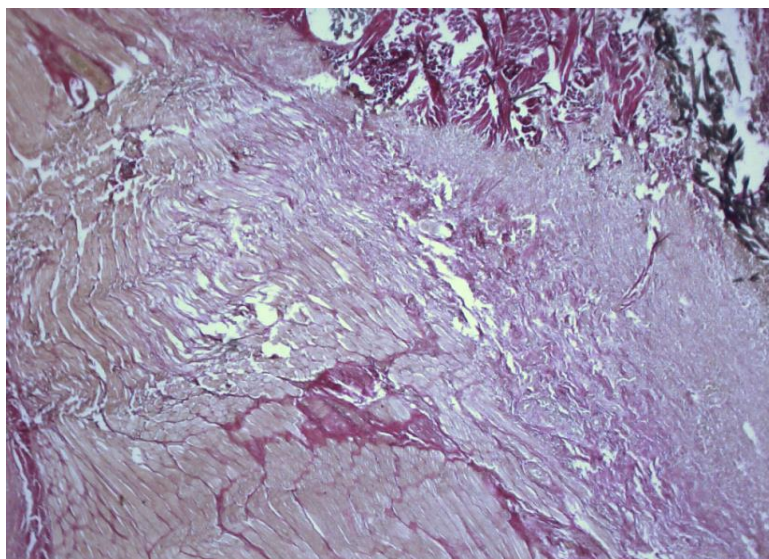


Рисунок 36 – Репрезентативный фрагмент контакта ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» с передней брюшной стенкой на 21 сутки после имплантации. Зрелые волокнистые коллагеновые волокна с формированием зрелой рубцовой ткани. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону $\times 100$

Процесс ангиогенеза на 21 сутки в обеих группах характеризовался наличием полнокровных сосудов со сформированной мышечной стенкой. В опытной группе количество сосудов в репрезентативном участке гистологического среза составило $n=9,93\pm 2,13$, в группе сравнения $n=12,9\pm 2,95$. Статистически значимое уменьшение числа сосудов в опытной группе свидетельствует о более скором переходе пролиферативной фазы течения раневого процесса в фазу формирования полноценного и состоятельного послеоперационного рубца в данной группе ($p=0,025$) (таблица 13).

К 30 дню наблюдения в опытной группе морфологическая картина характеризуется коллагенизацией зоны имплантации, что характеризовалось образованием зрелой соединительной ткани. В зоне репрезентативного фрагмента контакта внеклеточного матрикса с передней брюшной стенкой на 30 сутки после имплантации отмечено, значительное превалирование фибропластического процесса над рассеянными единичными полиморфноядерными лейкоцитами (рисунок 37).

В группе сравнения, где для реконструкции передней брюшной стенки применялся ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol», к 30 суткам наблюдается схожая морфологическая картина, с преобладанием стромальных клеток фибробласты/фиброциты среди клеточного инфильтрата (рисунок 38).

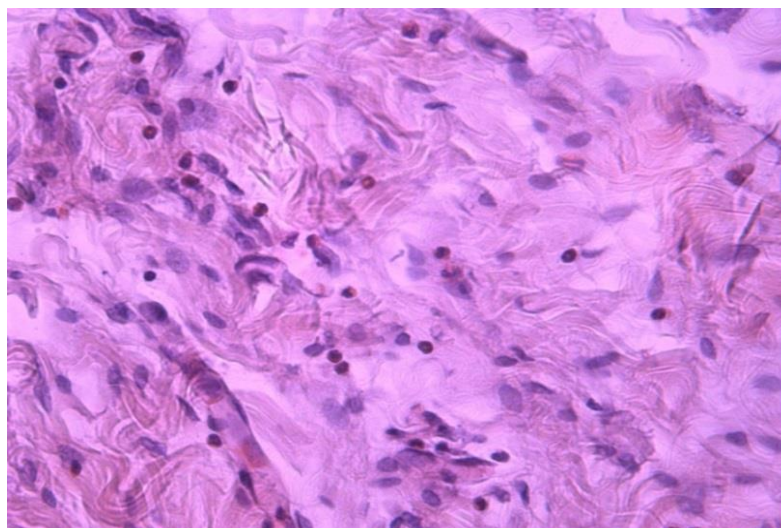


Рисунок 37 – Репрезентативный фрагмент контакта внеклеточного матрикса с передней брюшной стенкой на 30 сутки после имплантации. Формирование зрелой соединительной ткани превалируют над клеточной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином $\times 200$

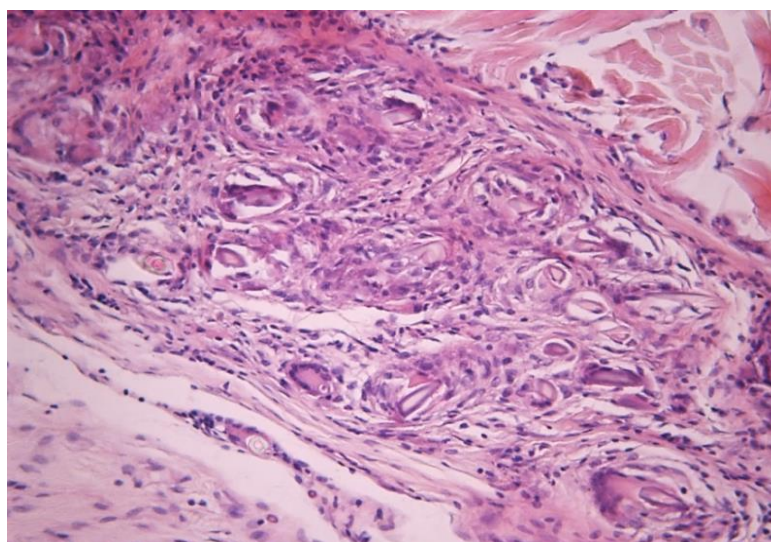


Рисунок 38 – Репрезентативный фрагмент контакта «Permacol» с передней брюшной стенкой, 30 сутки после имплантации. Персистенция пролиферативной фазы с трансформацией в хроническое воспаление. Среди грубоволокнистой ткани инфильтрация лимфоцитами и макрофагами с трансформацией в гигантские многоядерные клетки. Окраска гематоксилином и эозином $\times 200$

Следует отметить, что в зоне контакта биоматериала «Permacol» с тканями передней брюшной стенки на 30 сутки после имплантации наблюдалась персистенция пролиферативной фазы с трансформацией в хроническое воспаление. Среди хаотически расположенных соединительнотканых волокон отмечалась персистенция лимфоцитов и

макрофагов, трансформирование макрофагов в гигантские многоядерные клетки по типу клеток-макрофагов инородных тел или подобно гигантским клеткам Пирогова-Лангханса, ядра их расположены по периферии или же центрально, сами гигантские многоядерные клетки располагаются рассеянно в зоне фиброза.

Обе исследуемые группы к 30 суткам характеризуются мелкоочаговой инфильтрацией гранулоцитарными, лимфоцитарными, плазматическими клетками и макрофагами, в среднем они не превышают 20% от общего количества клеток, как в опытной группе, так и в группе сравнения. Наблюдается статистически значимое снижение количественного содержания данных клеток в клеточном инфильтрате на сроке 30 суток по отношению к начальным срокам наблюдения (таблица 11, 12).

Установлено, что в обеих группах наблюдалось преобладание зрелой соединительной ткани в корреляции с увеличением количества стромальных клеток в клеточном инфильтрате, что свидетельствует о формировании состоятельного соединительнотканного рубца в обеих группах (рисунок 39, 40).

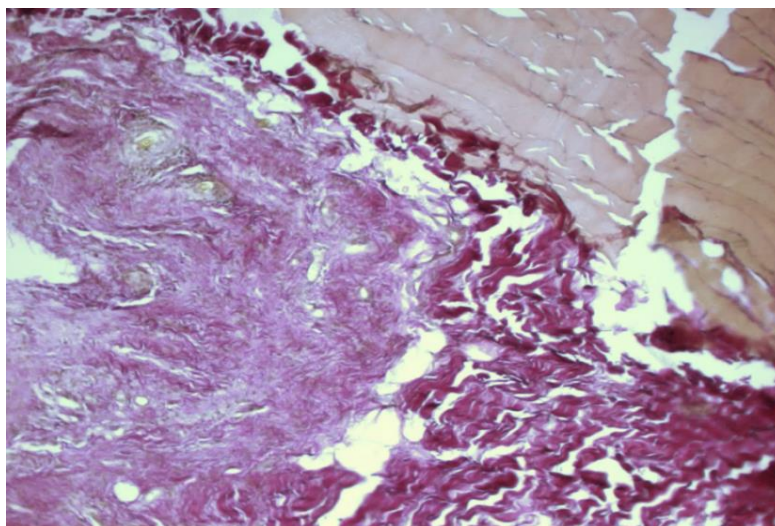


Рисунок 39 – Репрезентативный фрагмент контакта внеклеточного матрикса ксенобрюшины с передней брюшной стенкой, 30 сутки после имплантации. Зрелые коллагеновые волокна с формированием рубцовой ткани. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону $\times 100$

Количественное содержание стромальных клеток статистически достоверно увеличилось к 30 суткам по отношению к начальным срокам наблюдения в обеих группах ($p < 0,05$) (рисунок 28, 31).

Процесс ангиогенеза на 30 сутки в обеих группах характеризовался наличием полнокровных сосудов с сформированной мышечной стенкой. В опытной группе количество сосудов в репрезентативном участке гистологического среза составило $n=10,9 \pm 4,12$, в группе сравнения $n=15,25 \pm 4,3$, статистически значимых межгрупповых и внутригрупповых различий не выявлено ($p > 0,05$) (таблица 13).

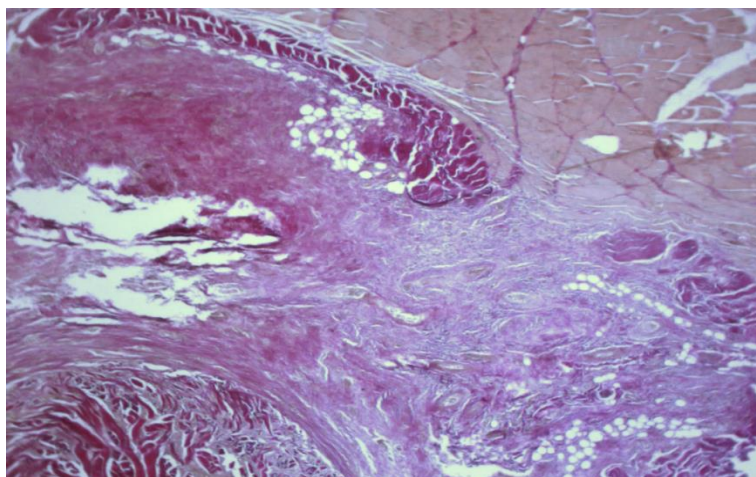
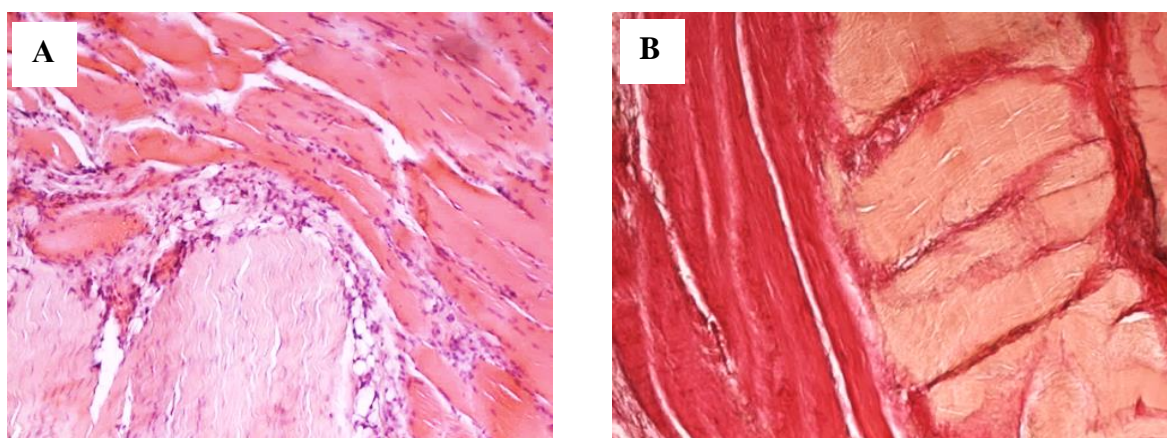


Рисунок 40 – Репрезентативный фрагмент контакта «Permacol» с передней брюшной стенкой на 30 сутки после имплантации. Пучки коллагеновых волокон с формированием зрелой рубцовой ткани. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону $\times 100$

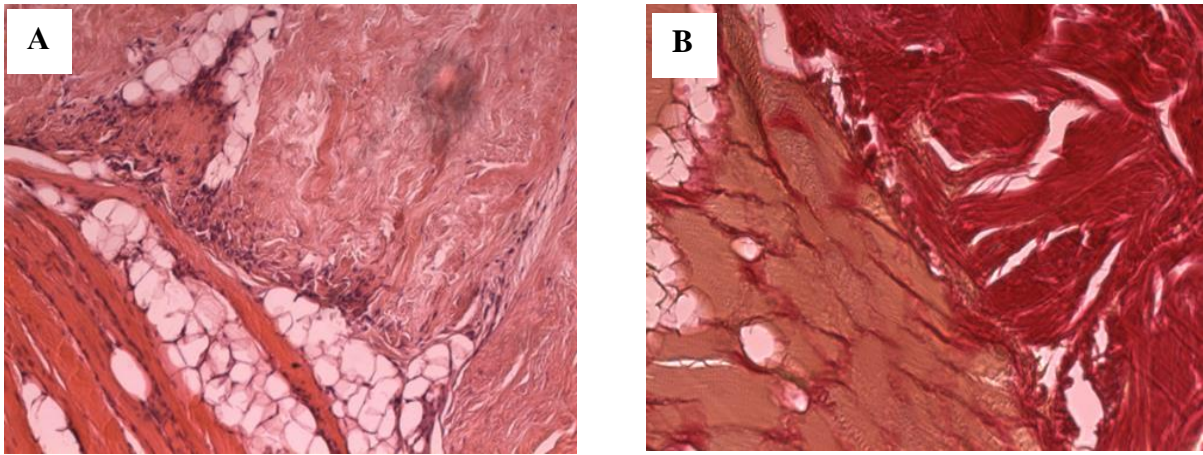
В отдаленные сроки наблюдения после имплантации, к 180 дню в обеих группах отмечается преобладание стромальных клеток, образующих плотный соединительнотканый контакт между биоматериалом и тканями передней брюшной стенки без признаков хронического воспаления и отторжения имплантата (рисунок 41, 42).

Морфометрический анализ показал продолжающуюся тенденцию увеличения доли фиброцитов по отношению к другим клеточным элементам как в опытной группе, так и в группе сравнения – 85,7% и 83,4% соответственно, количественное содержание стромальных клеток статистически значимо увеличилось по отношению к начальным срокам наблюдения ($p < 0,05$) (таблица 11, 12).



А – Окраска гематоксилином и эозином; В – Окраска пикрофуксином по Ван-Гизон. Ув.: $\times 100$

Рисунок 41 – Внеклеточный матрикс ксенобрюшины. 180 сутки. Зрелый соединительнотканый контакт в месте имплантации



А – Окраска гематоксилином и эозином; В – Окраска пикрофуксином по Ван-Гизон $\times 100$

Рисунок 42 – Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol», 180 сутки.
Плотный соединительнотканый контакт в месте имплантации

Корреляционный анализ изменений количественного состава клеточного инфильтрата в течение эксперимента показал сильную обратную корреляционную связь между гранулоцитами и стромальными клетками как в опытной группе с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины ($r = -0,95$), так и в группе сравнения ($r = -0,92$) (рисунок 43, 44).

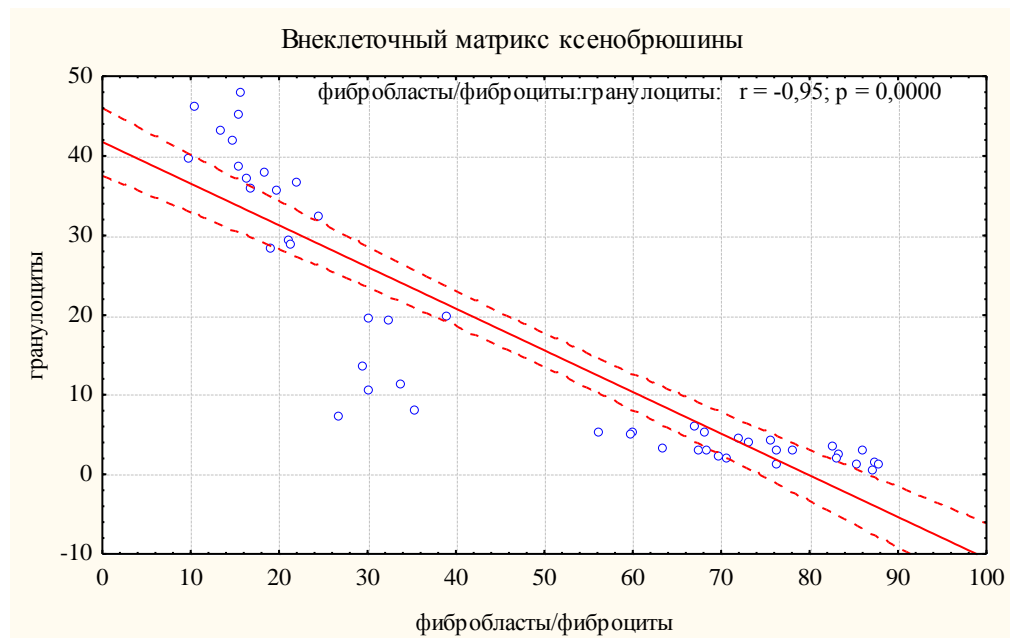


Рисунок 43 – Внеклеточный матрикс ксенобрюшины. Корреляционный анализ зависимости соотношения гранулоцитов и стромальных клеток в клеточном инфильтрате на исследуемых сроках эксперимента

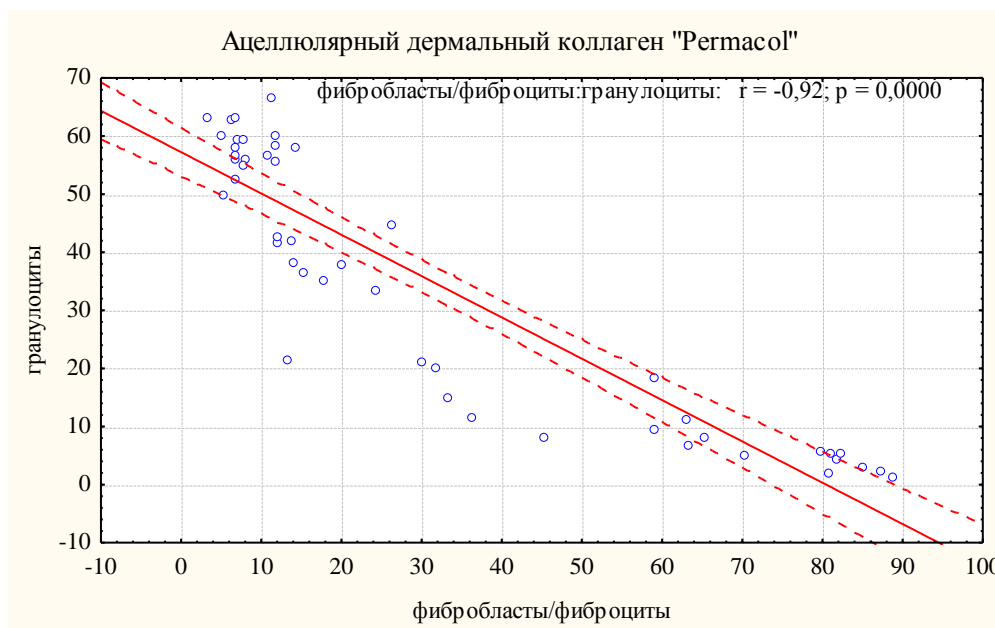


Рисунок 44 – Ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol».
Корреляционный анализ зависимости соотношения гранулоцитов и стромальных клеток в клеточном инфильтрате на исследуемых сроках эксперимента

Полученные результаты морфометрического анализа подтверждают данные морфологического исследования в предыдущих разделах настоящей диссертации о существующих изменениях состава клеточного инфильтрата зоны имплантации в сторону увеличения стромальных клеток фибробласты/фиброциты с обратно пропорциональным уменьшением уровня гранулоцитов, а значит и подтверждает гипотезу об адекватном течении раневого процесса в послеоперационном периоде без признаков постимплантационного воспаления. По результатам вычислений данные корреляции значимы на уровне 0,05 ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенный сравнительный анализ морфологической картины зоны имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» с тканями передней брюшной стенки, показал, что при использовании опытного материала отмечается более благоприятное течение раневого процесса, характеризующееся переходом экссудативной фазы в пролиферативную фазу уже к 7 суткам, с последующим угасанием продуктивной фазы тканевой реакции и активным ростом стромальных элементов к 14 суткам, в то время как в группе сравнения персистенция реактивного воспалительного процесса сохранялась до 21 дня.

3.4.6 Результаты изучения биомеханических свойств исследуемых материалов

Результаты испытаний по определению прочности на разрыв и удлинения внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» до имплантации представлены в таблице 14.

Таблица 14 – сравнительная характеристика биомеханических свойств внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» до имплантации

Показатели безопасности	НД на методы испытаний	Внеклеточный матрикс ксенобрюшины	«Permacol»
Прочность на разрыв, $H/мм^2$:	ГОСТ 938.11-69	5,56	2,77
Удлинение при разрыве, %:	ГОСТ 938.11-69	110	60
Толщина, мм:	ГОСТ 938.15-70	1,18	1,23

Исходя из полученных данных, внеклеточный матрикс ксенобрюшины, обладая большей эластичностью – удлинение при разрыве 110% против 60%, в 2 раза превосходит ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol», в совокупности обладает большей прочностью и способностью выдерживать нагрузки вдвое больше по сравнению с ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol» – 5,56 Н/мм² против 2,77 Н/мм² соответственно.

Результаты испытаний по определению прочности на разрыв внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» после имплантации на сроках 7, 14, 30, 180 суток представлены в таблице 15.

Таблица 15 – сравнительная характеристика биомеханических свойств внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» после имплантации

Исследуемый материал	Абсолютный максимум (точки разрыва), $\bar{X} \pm SD$			
	7 суток	14 суток	30 суток	180 суток
Внеклеточный матрикс ксенобрюшины, Н	15,9±2,8	14,3±2,2	13,3±3,3	14,6±3,3
«Permacol», Н	15,6±4,3	14,0±3,9	16,5±2,5	17,4±2,4
p-value	p=1,00	p=0,66	p=0,14	p=0,14

При сопоставлении данных из таблиц 14 и 15, видно, что прилагаемая нагрузка и показатели абсолютного максимума (точки разрыва)кратно увеличилась в обеих группах. Так, в группе с использованием внеклеточного матрикса ксенобрюшины, показатель прочности возрос в 2,6 раза по отношению к исходным данным и способен выдерживать нагрузки в среднем по всем периодам наблюдений до 14,5Н, без потери прочностных характеристик на протяжении всего эксперимента ($p>0,05$, рисунок 45).

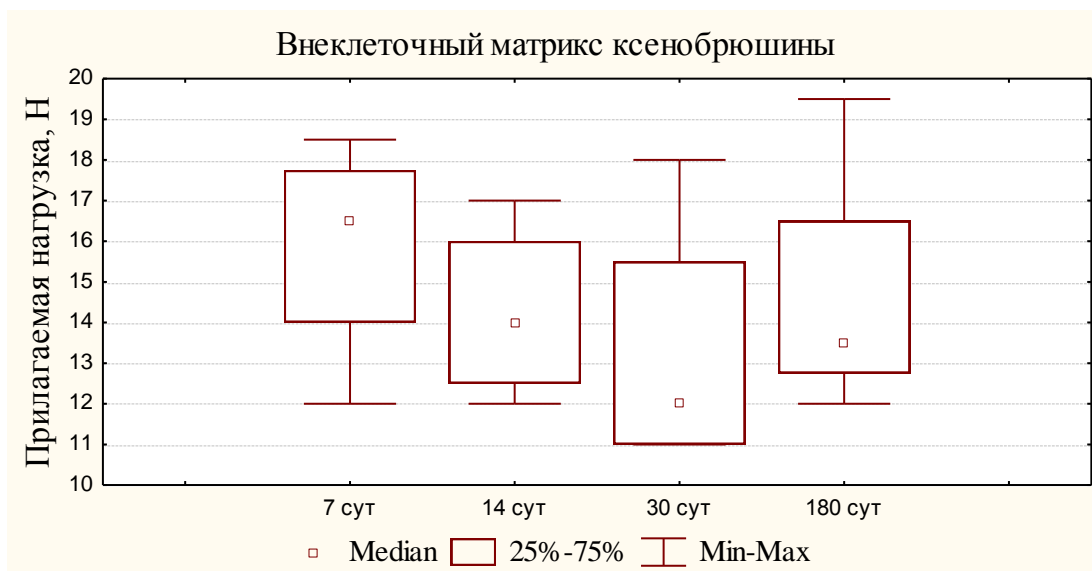


Рисунок 45 – Статистический анализ внутригрупповых показателей прочности внеклеточного матрикса ксенобрюшины после имплантации

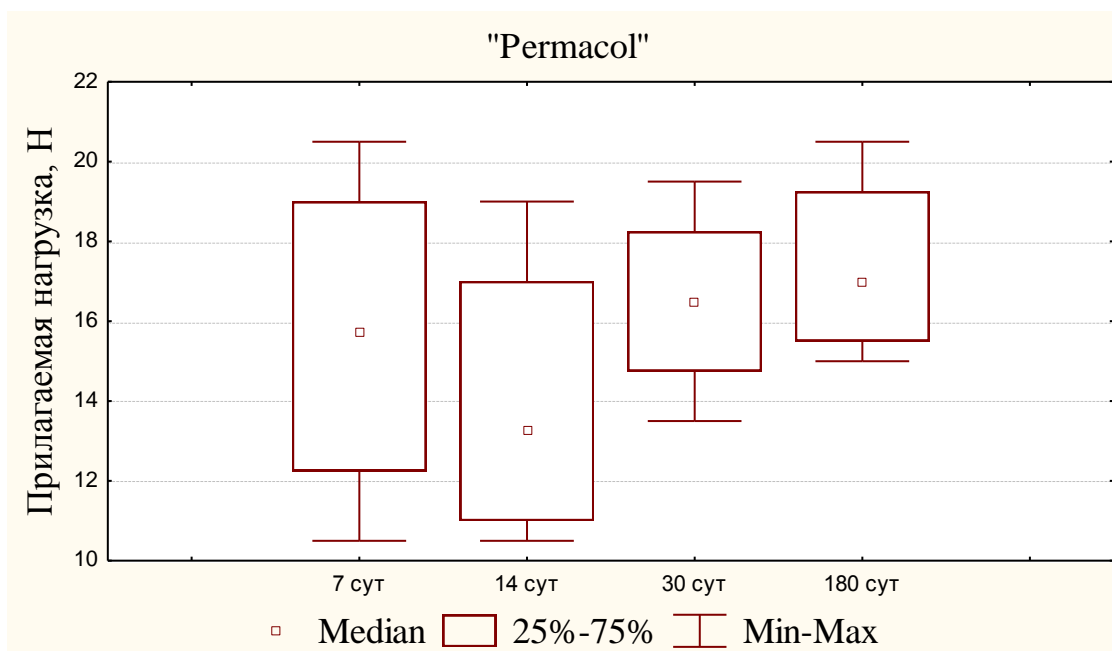


Рисунок 46 – Статистический анализ внутригрупповых показателей прочности ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» после имплантации

В группе сравнения, где был применен ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol», показатель выдерживаемых нагрузок вырос, в среднем по всем периодам наблюдений составил 15,9Н, что в 5 раз превышает исходные данные (до имплантации). В данной группе, равно как и в опытной группе, статистически значимых внутригрупповых различий на исследуемых сроках эксперимента не зарегистрировано (рисунок 46).

Динамика изменений прочностных характеристик внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» в течение эксперимента продемонстрирована на рисунке 47.

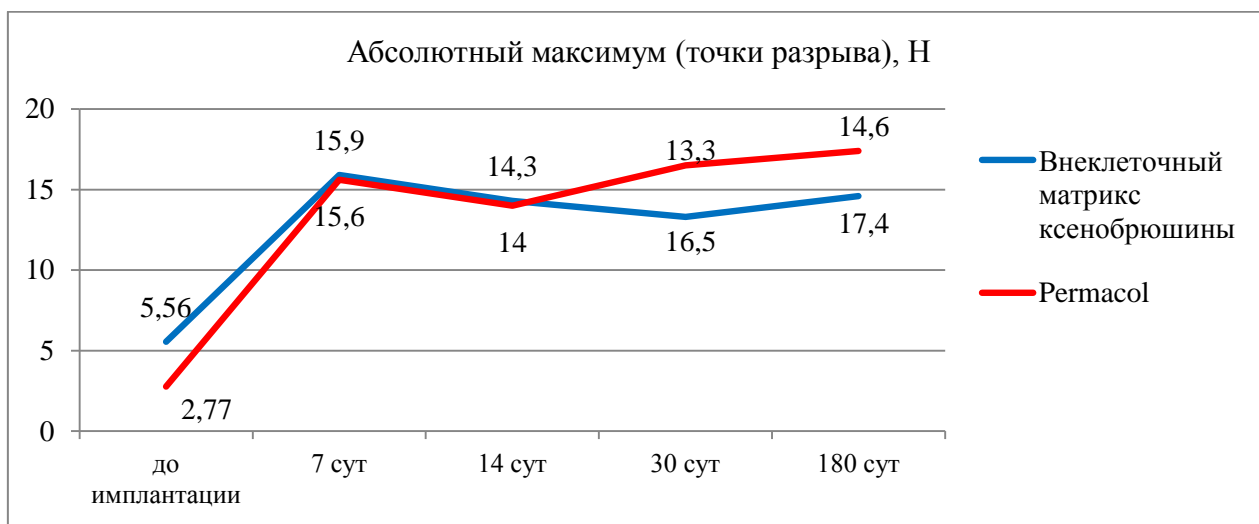


Рисунок 47 – Динамика изменений прочностных характеристик исследуемых имплантатов в течение эксперимента

Таким образом, анализ полученных данных показал, что внеклеточный матрикс ксенобрюшины на стендовых испытаниях демонстрирует высокие показатели механической прочности, преимущественно за счет эластичности, превышая по данному параметру ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol» в 2 раза – 5,56 Н/мм² против 2,77 Н/мм².

По результатам тестирования образцов в постимплантационном периоде наблюдается кратное повышение прочности на разрыв, как в группе с внеклеточным матриксом ксенобрюшины, так и в группе, где был использован ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol», с увеличением прочностных характеристик в 2,6 и 5 раз соответственно, достигая при этом средних значений по абсолютному максимуму – 14,5Н и 15,9Н, без статистически значимых различий, как на каждом сроке наблюдения, так и по эксперименту в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью данной диссертационной работы являлось изучение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в качестве нового биологического материала для пластики дефектов передней брюшной стенки, путем исследования морфологической картины зоны имплантации с тканями передней брюшной стенки, а также оценки адгезивных и биомеханических свойств изучаемого биологического имплантата.

В ходе проведенного исследования был отработан метод детергент-ферментативной обработки ксеногенной брюшины для получения опытных образцов внеклеточного матрикса. Определено, что для процесса децеллюляризации брюшины требуется не менее 2 циклов обработки детергент-ферментативным методом. По данным морфологического исследования установлено, что децеллюляризация с применением в качестве детергента 0,25% раствора додецилсульфата натрия не влияет на структуру коллагеновых фибрилл и эластиновых волокон в полученных образцах. Обнаружено, что оптимальной дозой для радиационной стерилизации образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины без деструктивных изменений коллагеновых и эластиновых волокон является доза 16 кГр.

Результаты эксперимента показали, что при применении внеклеточного матрикса ксенобрюшины для закрытия дефекта передней брюшной стенки в 95,8% случаев постимплантационный период протекал без осложнений – несостоятельность швов послеоперационной раны, макроскопические признаки отторжения имплантата не обнаружены. В группе сравнения, с использованием ацеллюлярного дермального коллагена «Permasol» наблюдается более высокий процент (10,4%) раневых послеоперационных осложнений в виде нагноения послеоперационной раны, диастаза ее краев с обнажением имплантата. Данное явление мы связываем с некротическими изменениями материала, и как следствие, мы наблюдали сгрызание животными шовного материала с попыткой извлечь данный имплантат из брюшной полости. Послеоперационный некроз периимплантационной зоны с явлениями отторжения имплантата в процентном соотношении сопоставим с количеством местных гнойных осложнений, как в опытной группе, так и в группе сравнения, что свидетельствует о взаимосвязи между развитием отторжения имплантата и нагноением послеоперационной раны.

Изучение процесса образования спаек после применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины в сравнении с ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permasol» при пластике дефекта передней брюшной стенки показало, что в обеих группах в равном количестве наблюдений отмечается формирование спаек брюшной полости, однако, характер спаек, выраженность спаечного процесса различна. Так, в опытной группе наблюдался слабовыраженный спаечный процесс, по краю зоны имплантации, непосредственно по линии шва. В то же время, в группе сравнения в равных

долях отмечались умеренно выраженные спайки, как по линии контакта шовного материала, так и непосредственно с самим имплантатом.

При оценке и сравнении морфологической картины зоны имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» критерием благоприятного исхода имплантации в настоящем исследовании является формирование полноценного и состоятельного послеоперационного рубца в месте контакта имплантата с тканями передней брюшной стенки без признаков активного воспаления.

Анализ полученных данных показал, что при использовании внеклеточного матрикса ксенобрюшины, происходит стадийно-специфическая смена тканевых реакций, характеризующая нормальное течение раневого процесса. К 7 суткам после имплантации отмечается переход экссудативной фазы в пролиферативную фазу раневого процесса, с дальнейшим угасанием продуктивной фазы тканевой реакции и активному росту стромы к 14 суткам, с последующим гистологическим и морфометрическим подтверждением созревания и формирования соединительнотканых волокон. Количественный состав клеточного инфильтрата к 14 суткам после имплантации, статистически значимо изменяется в сторону увеличения числа структурных стромальных клеток с обратно пропорциональным снижением клеток экссудативной и пролиферативной фаз воспалительно-регенераторного процесса в сравнении с начальными (5, 7 суток) сроками наблюдения. К 30 дню послеоперационного периода наблюдается формирование зрелого соединительного рубца.

Постимплантационный период применения ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» характеризуется более поздним переходом (к 21 суткам) и сменой тканевых реакций с достоверно большим количеством клеток воспалительного инфильтрата на всех сроках послеоперационного наблюдения. Данное явление нами расценено как задержка смены экссудативной фазы в пролиферативную фазу, и может свидетельствовать о персистенции реактивного воспалительного процесса на сроках до 21 дня. Формирование состоятельного соединительнотканного рубца в группе сравнения также как и в опытной группе завершается к 30 суткам после имплантации.

При оценке биомеханических свойств исследуемых материалов на стендовых испытаниях образцов внеклеточный матрикс ксенобрюшины демонстрирует высокие показатели механической прочности, преимущественно за счет эластичности – удлинение при разрыве 110%, превосходя по данному параметру ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol» в 2 раза. По результатам тестирования образцов в постимплантационном периоде наблюдается кратное повышение прочности на разрыв, как в группе с внеклеточным матриксом ксенобрюшины, так и в группе сравнения, с увеличением прочностных характеристик в 2,6 и 5 раз соответственно. При этом, материал сравнения «Permacol» не имеет преимуществ перед опытными образцами внеклеточного матрикса ксенобрюшины – средние значения по абсолютному максимуму на разрыв – 15,9Н и 14,5Н соответственно, без

статистически значимых различий, как на каждом сроке наблюдения, так и по эксперименту в целом ($p > 0.05$).

Таким образом, исходя из результатов диссертационной работы, можно сформулировать следующие **выводы**:

1. Для получения опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов брюшной стенки требуется не менее двух циклов децеллюляризации детергент-ферментативным методом. Морфологический анализ показал, что выбранный детергент для децеллюляризации – 0,25% раствор додецилсульфата натрия в отличие от ранее применяемого 4% раствора дезоксихолата натрия не оказывает деструктивного влияния на ультраструктуру коллагеновых и эластиновых фибрилл опытных образцов внеклеточного матрикса ксенобрюшины.

2. При использовании внеклеточного матрикса ксенобрюшины наблюдается более благоприятное течение послеоперационного периода с достоверно меньшими раневыми осложнениями в виде нагноения послеоперационной раны и некрозом имплантата в сравнении с ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol» – 4,2% против 10,4% соответственно ($p < 0,05$).

3. Внеклеточный матрикс ксенобрюшины в сравнении с ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol» не вызывает выраженный спаечный процесс, характеризуется формированием слабовыраженных спаек брюшной полости – класс 1, преимущественно по краю зоны имплантации в месте контакта шовного материала, и не зависит от срока экспозиции материала.

4. Внеклеточный матрикс ксенобрюшины превосходит материал сравнения «Permacol» по срокам регенерации, что подтверждается более ранним переходом экссудативной фазы в пролиферативную фазу раневого процесса в опытной группе – на 7 сутки после операции, с дальнейшим угасанием продуктивной фазы тканевой реакции и активному росту стромы к 14 суткам, в то время как в группе сравнения персистенция реактивного воспалительного процесса сохранялась до 21 дня ($p < 0,05$).

5. Процесс созревания соединительной ткани, и как следствие, формирование состоятельного контакта между имплантатом и тканями передней брюшной стенки экспериментального животного протекал более благоприятно в опытной группе с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины. Данная гипотеза подтверждается статистически значимым изменением количественного состава структурных стромальных клеток в клеточном инфильтрате в опытной группе – с $14,21 \pm 3,94$ до $32,0 \pm 3,9$ к 14 суткам послеоперационного периода ($p < 0,05$), с обратным пропорциональным снижением клеток экссудативной и пролиферативной фаз раневого процесса по отношению к начальным срокам наблюдения – гранулоциты с $42,50 \pm 3,94$ до $13,75 \pm 5,28$ ($p < 0,05$), в то время как в группе сравнения, с применением материала «Permacol», статистически значимое увеличение фибробластов/фиброцитов и уменьшение гранулоцитов в клеточном

инфильтрате зафиксировано начиная с 21 суток – с $6,92 \pm 1,74$ до $27,42 \pm 11,86$ и с $57,08 \pm 4,23$ до $24,13 \pm 16,2$ соответственно.

6. На стендовых испытаниях образцов внеклеточный матрикс ксенобрюшины демонстрирует высокие показатели механической прочности, преимущественно за счет эластичности – удлинение при разрыве 110%, превосходя ацеллюлярный дермальный коллаген «Permacol» по данному показателю в 2 раза. После имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины прочностные характеристики повышаются кратно, позволяя выдерживать нагрузки в 2,6 раза по отношению к исходным данным. По результатам исследования материал сравнения «Permacol» не имеет преимуществ перед опытными образцами внеклеточного матрикса ксенобрюшины – средние значения по абсолютному максимуму на разрыв – 15,9Н и 14,5Н соответственно, без статистически значимых различий, как на каждом сроке наблюдения, так и по эксперименту в целом ($p > 0,05$).

На основании результатов диссертационной работы можно сформулировать следующие практические рекомендации:

1. Предложенная методика получения внеклеточного матрикса с использованием двух циклов децеллюляризации 0,25% раствором додецилсульфата натрия может быть применена для получения биологических имплантатов ксеногенного и донорского происхождения;

2. Накопленная научная база обосновывает потенциальную возможность применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки в хирургической практике. Полученные результаты позволяют проведение следующего этапа исследований – клинических испытаний по оценке безопасности и эффективности внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургической коррекции грыж живота.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Burger J.W., Luijendijk R.W., Hop W.C., Halm J.A., Verdaasdonk E.G., Jeekel J. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia // *Ann. Surg.* – 2004. – № 240. – P. 578–583.
- 2 Flum D.R., Horvath K., Koepsell T. Have outcomes of incisional hernia repair improved with time? A population-based analysis. // *Ann. Surg.* – 2003. – №237. – P. 129–135.
- 3 Houck J.P., Rypins E.B., Sarfeh I.J., Juler G.L., Shimoda K.J. Repair of incisional hernia // *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1989. – №169. – P. 397–399.
- 4 Dunne J.R., Malone D.L., Tracy J.K., Napolitano L.M. Abdominal wall hernias: risk factors for infection and resource utilization // *J. Surg. Res.* – 2003. – №111. – P. 78–84.
- 5 Luijendijk R.W., Hop W.C., Van den Tol M.P. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – №343. – P. 392–398.
- 6 Lo´pez-Cano M, Armengol-Carrasco M. Biological scaffolds in reparative surgery for abdominal wall hernias // *Am. J. Surg.* – 2012. – № 203. – 555 p.
- 7 Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view // *Dev Biol.* – 2010. – №341. – P. 126–140.
- 8 Brown B., Lindberg K., Reing J., Stolz D.B., Badylak S.F. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix // *Tissue Eng.* – 2006. – №12. – P. 519–526.
- 9 Badylak S.F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction // *Semin Cell Develop Biol.* – 2002. – №13. – P.377–383.
- 10 Badylak S.F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction // *Transplant Immunol.* – 2004. – №12. P. 367–377.
- 11 Badylak S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material // *Biomaterials.* – 2007. – №28. – P. 3587–3593.
- 12 Badylak S.F., Brown B.N., Gilbert T.W., Daly K.A., Huber A., Turner N.J. Biologic scaffolds for constructive tissue remodeling // *Biomaterials.* – 2011. – №32. – P. 316–319
- 13 Vlodavsky I., Goldshmidt O., Zcharia E., et al. Mammalian heparinase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development // *Semin Cancer Biol.* – 2002. – №12. – P. 121–129.
- 14 Ramchandran R., Dhanabal M., Volk R., et al. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1999. – №255. – P. 735–739.
- 15 Calve S., Odelberg S.J., Simon H.G. A transitional extracellular matrix instructs cell behavior during muscle regeneration // *Dev Biol.* – 2010. – №344. – P. 259–271.
- 16 Murry C.E., Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant opulations: lessons from embryonic development // *Cell.* – 2008. – №132. – P. 661–680.

- 17 Cortiella J., Niles J., Cantu A., et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation // *Tissue Eng Part A*. – 2010. – №16. – P. 2565–2580
- 18 Brown B.N., Badylak S.F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction // *Transl. Res.* – 2014. – №163. – P. 268–285.
- 19 Bello'n J.M. Biological prostheses: indications and usefulness in the repair of abdominal wall defect // *Cir. Esp.* – 2008. – №83. – P. 283–289.
- 20 Севастьянов В.И. Биосовместимость. – М.: «ИЦ ВНИИ геосистем», 1999. – 366 с.
- 21 Егиев В.Н., Рудакова М.Н., Сватковский М.В. Герниопластика без натяжения тканей в лечении послеоперационных вентральных грыж // *Хирургия*. – 2000. – № 6. – С. 18-22.
- 22 Фёдоров И.В., Чугунов А.Н. Протезы в хирургии грыж: столетняя эволюция // *Герниология*. - 2004. - №2. - С. 45-53.
- 23 Белоконев В.И., Ковалева З.В., Пушкин С.Ю., и др. Принципы техники пластики и результаты лечения послеоперационных вентральных грыж срединной локализации // *Герниология*. – 2004. – №2. – С. 6-12.
- 24 Егиев В.Н., Лядов К.В., Воскресенский П.К. Атлас оперативной хирургии грыж // *Медпрактика*. – 2003. – 227 с.
- 25 Гатауллин Н.Г., Корнилаев П.Г., Плечев В.В. Хирургическое лечение послеоперационных грыж живота // *Клиническая хирургия*. – 1990. – №2. – С. 1-4.
- 26 Ковалева З.В. Выбор эксплантата для герниопластики: автореф. дис... канд. мед. наук. – Самара, 1999. – 26 с.
- 27 Федоров В.Д., Адамян А.А., Гогия Б.Ш. Лечение больших и гигантских послеоперационных вентральных грыж // *Хирургия*. – 2000. – №1. – С. 11-14.
- 28 Чугунов А.Н., Славин Д.А., Славин Л.Е., Федоров И.В. Хирургическое лечение паховых грыж с использованием синтетических эндопротезов // *Казань*. – 2003. – 45 с.
- 29 Леонов В.В., Мехтиханов З.С. Хирургическое лечение послеоперационных вентральных грыж // *Харьков*. – 2003. – 190 с.
- 30 Bendavid R., Abrahamson J., Arregui M., Flament J., Phillips E. Abdominal wall hernias principles and management. – New-York: Springer, 2001. – 792 p.
- 31 Amid P. Classifications of biomaterial and their related complications in abdominal wall hernia surgery // *Hernia*. – 1996. – №1. – P. 15-21.
- 32 Conze J., Kingsnorth A.N., Flament J.B. et al. Randomized clinical trial comparing lightweight composite mesh with polyester or polypropylene mesh for incisional hernia repair // *British Journal of Surgery*. – 2005. – №92. – P. 1488-1493.
- 33 Klinge U., Si Z.Y., Zheng H., Schumpelick V., Bhardwaj R.S., Klosterhalfen B. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia // *Eur Surg Res*. – 2000. – №32. – P. 43-48.
- 34 Butler C.E. The role of bioprosthesis in abdominal wall reconstruction // *Clin Plast Surg*. – 2006. – №33. – P. 199-211.

- 35 Rosen M.J. Biologic mesh for abdominal wall reconstruction: a critical appraisal // *Am Surg.* – 2010. – №76. – P. 1-6.
- 36 Oliver R.F., Grant R.A., Cox R.W., Hulme M.J., Mudie A. Histological studies of subcutaneous and intraperitoneal implants of trypsin-prepared dermal collagen allografts in the rat // *Clin Orthop Relat Res.* – 1976. – №115. – P. 291-302.
- 37 Pickett L.C. Mesh use in complex hernias and open abdomen: types, benefits, and limitations // *Surg News.* – 2009. – №9. – P. 3-5.
- 38 Bellows C.F., Alder A., Helton W.S. Abdominal wall reconstruction using biological tissue grafts: present status and future opportunities // *Expert Rev Med Devices.* – 2006. – №3. – P. 657-675.
- 39 Журавлева И.Ю. Патогенетическое обоснование и разработка новых способов консервации ксенобиопротезов клапанов сердца: дис... д.м.н.: 14.01.24. – М., 1995. – 208 с.
- 40 Martin B.R., Sangalang M., Wu S. et al. Outcomes of allogenic acellular matrix therapy in treatment of diabetic foot wounds: An initial experience // *Int. Wound J.* – 2005. – №2. – P. 161-165.
- 41 Шумаков В.И., Севастьянов В.И. Биополимерные матриксы для искусственных органов и тканей // *Здравоохранение и медицинская техника.* - 2003. - № 4. - С. 30-32.
- 42 Севастьянов В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2009. – Т.9, № 3. – С. 14-24.
- 43 Севастьянов В.И., Егорова В.А., Немец Е.А., Перова Н.В., Онищенко Н.А. Биодegradуемый биополимерный материал «ЭластоПОБ» для клеточной трансплантации // *Перспективные материалы.* - 2004. - №3. - С. 35-41.
- 44 Севастьянов В.И., Егорова В.А., Немец Е.А., Перова Н.В., Онищенко Н.А. Медико-биологические свойства биодegradуемого материала «ЭластоПОБ» // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* - 2004. - №2. - С. 47-52.
- 45 Севастьянов В.И., Кирпичников М.П., Сургученко В.А. Матриксы для тканевой инженерии и гибридных органов // *Биосовместимые материалы (учебное пособие).* – 2011. – 228 с.
- 46 Barber C., Watt A., Pham Barber C. Bioengineered skin substitutes for the management of wounds: A systematic review. // *Australian Safety and Efficacy Register of New Interventional Procedures - Surgical (ASERNIP-S).* - 2006. – 100 p.
- 47 Bello Y., Falabella A., Eaglstein W. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing // *J. Clin. Dermatol.* - 2001. - №2. – P. 305-313.
- 48 Balayssac D., Poinas A., Pereira B., Pezet D. Use of permacol in parietal and general surgery: A bibliographic review // *Surg Innov.* – 2013. - №20. – P. 176-182.
- 49 Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиданолы (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины. – Новосибирск, 2003. – 330 с.

50 Зиновьев Е.В., Рахматуллин Р.Р., Османов К.Ф., Жилин К.К., Нестеров Ю.В., Якимов Д.К. Механотопография и биологические свойства гистозэквивалент-биопластического материала на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2013. – №4(44). – С. 200-204.

51 Snyder D.L., Sullivan N., Schoelles K.M. Skin substitutes for treating chronic wounds. Technology Assessment Report. – ECRI Institute Evidence-based Practice Center (EPC). – 2012. – 290 p.

52 Hu Y., Winn S., Krajbich I. Porous polymer scaffolds surface modified with arginine glycine aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro // J. Biomed. Mater. Res. – 2003. – № 64A. – P. 583-590.

53 Сухих Г.Т., Малайцев Г.В., Богданова И.М., Дубровина И.В. Мезенхимальные стволовые клетки // Бюл. эксперим. биол. - 2002. - Т.133, №2. - С.124-131.

54 Armellino M., De Stefano G., Scardi F. Use of Permacol in complicated incisional hernia // Chir Ital. - 2006. - №58(5). – P. 627-630.

55 Saray A. Porcine dermal collagen (Permacol) for facial contour augmentation: Preliminary report // Aesthetic. Plast. Surg. - 2003. – № 27(5). – P. 368-375.

56 Liyanage S.H., Purohit G.S., Frye J.N., Giordano Liyanage P. Anterior abdominal wall reconstruction with a Permacol implant // J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. – 2006. – № 59(5). – P. 553-555.

57 Parker D.M., Armstrong P.J., Frizzi J.D., North Porcine dermal collagen (Permacol) for abdominal wall reconstruction // Curr. Surg. - 2006. – № 63(4). – P. 255-258.

58 Mitchell I.C., Garcia N.M., Barber R. Permacol: A potential biologic patch alternative in congenital diaphragmatic hernia repair // J. Pediatr. Surg. – 2008. - №43(12). – P. 2161-2164.

59 Abhinav K., Shaaban M., Raymond T. Primary reconstruction of pelvic floor defects following sacrectomy using Permacol graft // Eur. J. Surg. Oncol. - 2009. - №35(4). – P. 439-443.

60 Ditzel M., Deerenberg E., Grotenhuis N. Biologic meshes are not superior to synthetic meshes in ventral hernia repair: An experimental study with long-term follow-up evaluation // Surg. Endosc. – 2013. – №3. – P. 1-3.

61 Slater N.J., Van der Kolk M., Hendriks T. Biologic grafts for ventral hernia repair: A systematic review // Am. J. Surg. – 2013. – №205(2). – P. 220-230.

62 Hsu P.W., Salgado C.J., Kent K et al. Evaluation of porcine dermal collagen (Permacol) used in abdominal wall reconstruction // J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. – 2009. – № 62(11). – P. 1484-1489.

63 Connolly P.T., Teubner A., Lees N.P. et al. Outcome of reconstructive surgery for intestinal fistula in the open abdomen // Ann Surg. – 2008. – № 247(3). – P. 440-444.

64 Fine A.P. Laparoscopic repair of inguinal hernia using Surgisis mesh and fibrin sealant // JSLS. – 2006. – №10 – 461 p.

- 65 Ansaloni L., Catena F., Gagliardi S. et al. Hernia repair with porcine small-intestinal submucosa // *Hernia*. – 2007. – № 11. – 321 p.
- 66 Petter-Puchner A.H., Fortelny R.H., Mittermayr R. et al. Adverse effects of porcine small intestine submucosa implants in experimental ventral hernia repair // *Surg Endosc.* – 2006. – №20. – 942 p.
- 67 Poulouse B.K., Scholz S., Moore D.E. et al. Physiologic properties of small intestine submucosa // *J Surg Res.* – 2005. – №123. – 262 p.
- 68 Catena F., Ansaloni L., D'Alessandro L. et al. Adverse effects of porcine small intestine submucosa (SIS) implants in experimental ventral hernia repair. *Surg Endosc.* – 2007. – № 21. – 690 p.
- 69 Franklin M.E. Jr, Gonzalez J.J. Jr, Michaelson R.P. et al. Preliminary experience with new bioactive prosthetic material for repair of hernias in infected fields // *Hernia*. – 2002. – № 6(4). – P. 171-174.
- 70 Franklin M.E. Jr, Trevino J.M., Portillo G. et al. The use of porcine small intestinal submucosa as a prosthetic material for laparoscopic hernia repair in infected and potentially contaminated fields: long-term follow-up // *Surg. Endosc.* – 2008. – № 22(9). – P. 1941-1946.
- 71 Ueno T., Pickett L.C., De la Fuente S.G. Clinical application of porcine small intestinal submucosa in the management of infected or potentially contaminated abdominal defects // *J Gastrointest. Surg.* – 2004. – № 8(1). – P. 109-112.
- 72 Helton W.S., Fisichella P.M., Berger R. et al. Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia // *Arch. Surg.* – 2005. – № 140(6). – P. 549-560.
- 73 Limpert J.N., Desai A.R., Kumpf A.L. Repair of abdominal wall defects with bovine pericardium // *Am. J. Surg.* – 2009. – № 198(5). – P. 60-65.
- 74 Rocco G., Serra L., Fazioli F., Mori S. The use of veritas collagen matrix to reconstruct the posterior chest wall after costovertebrectomy // *Ann. Thorac. Surg.* – 2011. – №92(1). – P. 17-18.
- 75 Gore D.C. Utility of acellular allograft dermis in the care of elderly burn patients // *J. Surg. Res.* – 2005. – №125. – P. 37-41.
- 76 Gupta A., Zahriya K., Mullens P. Ventral herniorrhaphy: Experience with two different biosynthetic mesh materials, Surgisis and AlloDerm. // *Hernia*. – 2006. – №10(5). – P. 419-425.
- 77 Diaz J., Guy J., Berkes M. Acellular dermal allograft for ventral hernia repair in the compromised surgical field // *Am Surg.* – 2006. – №72. – P. 1181-1188.
- 78 Kim H., Bruen K., Vargo D. Acellular dermal matrix in the management of high-risk abdominal wall defects // *Am. J. Surg.* – 2006. – №192(6). – P. 705-709.
- 79 Espinosa-de-los-Monteros A., De la Torre J., Marrero I. Utilization of human cadaveric acellular dermis for abdominal hernia reconstruction // *Ann. Plast. Surg.* – 2007. – №58. – P. 264-267.
- 80 Breuing K., Colwell A. Inferolateral AlloDerm hammock for implant coverage in breast reconstruction // *Ann. Plast. Surg.* – 2007. – №59. – P. 250-255.
- 81 Preminger B.A., McCarthy C.M., Hu Q.Y. The influence of AlloDerm on expander dynamics and complications in the setting of immediate tissue

expander/implant reconstruction: A matched-cohort study // *Ann. Plast. Surg.* – 2008. – №60(5). – P. 510-513.

82 Efsandiari S., Dendukuri N., McGregor M. Clinical efficacy and cost of Allogenic Acellular Dermal Matrix (AADM) in implant-based breast reconstruction of post mastectomy cancer patients // Report. Montreal, QC: Technology Assessment Unit of the McGill University Health Centre (MUHC). - 2009. - 40 p.

83 Hiles M., Ritchie R., Altizer A. Are biologic grafts effective for hernia repair? A systematic review of the literature // *Surg. Innov.* – 2009. – №16(1). – P. 26-37.

84 Kissane N.A., Itani K.M. A decade of ventral incisional hernia repairs with biologic acellular dermal matrix: What have we learned? // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2012. – № 130(5 Suppl 2). – P. 194-202.

85 Sailes F.C., Walls J., Guelig D. et al. Synthetic and biological mesh in component separation: a 10-year single institution review // *Ann. Plast. Surg.* – 2010. – № 64(5). – P. 696-698.

86 Ellis, C. Acellular dermal matrices in hand reconstruction / C. Ellis, D. Kulber // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2012. – № 130 (Suppl 2). – P. 256-269.

87 Шустеров А.И. Оперативное лечение больших косых и рецидивных паховых грыж с применением консервированной брюшины (экспериментально-клиническое исследование): дисс... канд.мед.наук. – Караганда: Карагандинский государственный медицинский институт, 1966. – 232 с.

88 Патент №30382 РК. Биологическое покрытие для лечения ожогов и ран / Абугалиев К.Р., Огай В.Б., Данлыбаева Г.А. – 2014. – 5 с.

89 Разработка и применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки: отчет о НИР (промежуточ.) / Караг. гос. мед. унив-т; рук. Абатов Н.Т.; исполн.: Бадыров Р.М. [и др.]. – К., 2015. – 67 с. – № ГР 0115РК00305. – Инв. № 0215РК02890.

90 Абатов Н.Т., Бадыров Р.М., Огай В.Б., Абатова А.Н., Асамиданов Е.М. Приоритетная справка по поданной заявке на патент Республики Казахстан на изобретение «Внеклеточный матрикс ксенобрюшины для пластики грыж передней брюшной стенки» № 2017/0864.1. – 2017.

91 Vandendael A., Struwig D., Nel J.T. Efficacy of fibrin sealant in prevention of adhesion formation on surgical wounds in rabbit model // *Gyn. End.* – 1996. – № 1. – 169 p.

92 Гусаров В. М. Статистика. – М. 2003. - 463 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права

Авторлық құқық объектісіне құқықтарды
менделестігі тіркеу туралы

ҚУӘДІК

10 тамыз 2016 ж.

№ 1671

Қазақстан Республикасы Әділет министрлігінде
авторлардың етініші бойынша авторлары Нұрқаси
Түлгенбергенович Абагов, Руслан Муратович
Балдыров, Еркебұлан Марғұллович Асамиданов,
Бекзат Нариманович Қауқенов болып табылатын
авторлық құқықпен қорғалатын объектіге айрықша
мүлкілік құқықтар «Метод реконструкции передней
брюшной стенки с применением внеклеточного
матрикса ксенобрюшинь» (ғылыми туынды)
атауымен тіркелгені куәландырылды.

Авторлардың етініші бойынша авторлық
құқықпен қорғалатын объектіге айрықша
мүлкілік құқықтар және 2016 жылғы 5 қаңтарда
жасалған объекті Н.Т. Абагова, Р.М. Балдырова,
Е.М. Асамиданова, Б.Н. Қауқеновке тиесілі және
авторлар жоғарыда көрсетілген объектіні жасаған кезде
басқа адамдардың зияткерлік меншік құқығы
бұзылмағандығына кепілдік береді.

Тізілмеде 2016 жылғы 10 тамызда жасалған
№ 1671 жазба бар.

Министрдің орынбасары

 Э. Әзімова

ҚУӘДІК

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации прав
на объект авторского права

10 августа 2016 г.

№ 1671

Настоящим удостоверяется, что в Министерстве
Юстиции Республики Казахстан зарегистрированы
исключительные имущественные права на объект
авторского права под названием «Метод
реконструкции передней брюшной стенки с
применением внеклеточного матрикса
ксенобрюшинь» (произведение науки), авторами
которого по заявлению авторов являются Абагов
Нурқаси Түлгенбергенович, Балдыров Руслан
Муратович, Асамиданов Еркебұлан Марғұллович,
Қауқенов Бекзат Нариманович.

По заявлению авторов исключительные
имущественные права на объект авторского права,
созданный 5 января 2016 года, принадлежат
Абагову Н.Т., Балдырову Р.М., Асамиданову Е.М.,
Қауқенову Б.Н. и авторы гарантируют, что при
создании вышеуказанного объекта не были нарушены
права интеллектуальной собственности других лиц.

Запись в реестре за № 1671 от 10 августа
2016 года имеется.

Заместитель министра

 Э. Әзімова

СВИДЕТЕЛЬСТВО

ИС 005499

Приоритетная справка по поданной заявке на патент РК

Приложение 1
к Правилам составления, оформления и рассмотрения
заявки на изобретение, внесения сведений в государственный реестр
изобретений Республики Казахстан, а также выдачи охранного документа
Форма ИЗ-1П

Дата поступления 09 OCT 2017	(85) Дата перевода международной заявки на национальную фазу	(21) Регистрационный № 2017/08641	(22) Дата подачи
<input type="checkbox"/> (86) регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получающим ведомством <input type="checkbox"/> (87) номер и дата международной публикации международной заявки <input type="checkbox"/> (96) номер серийной заявки и дата подачи заявки, установленные получающим ведомством <input type="checkbox"/> (97) номер и дата публикации серийной заявки			
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Республики Казахстан на изобретение		ВРПИ «Национальный институт интеллектуальной собственности» Министерства Юстиции Республики Казахстан 010000, г. Астана, Демоброука, Дом Министрств, ул. Ормыбур, дом 8, подъезд №1	
Предоставляя указанные ниже документы, прошу (просим) выдать патент Республики Казахстан на изобретение на имя заявителя(ей) (71) Заявитель(и): Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Карагандинский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Республики Казахстан <small>(указывается полное имя или наименование и местонахождение или местонахождение. Данные о местонахождении авторов-заявителей приводятся в графе, рядом с графой с кодом (72))</small>			Код страны по стандарту ВОИС ST 3 (если не установлен) kz
Заполняется только при испрашивании приоритета по дате, более ранней, чем дата подачи заявки в НИИС. Прошу (просим) установить приоритет изобретения по дате: <input type="checkbox"/> подачи первой(ых) заяв(ок) в государстве-участнике Парижской конвенции (п.2 ст.20 Закона) <input checked="" type="checkbox"/> подачи более ранней заявки в НИИС в соответствии с п. 4 ст. 20 Закона <input type="checkbox"/> подачи первоначальной заявки в НИИС в соответствии с п.5 ст. 20 Закона <input type="checkbox"/> приоритета первоначальной заявки (п.5 ст. 20 Закона) <input type="checkbox"/> (номер заявки _____, дата подачи _____) <input type="checkbox"/> поступления дополнительных материалов к более ранней заявке (п. 3 ст. 20 Закона)			
(31) № первой, более ранней, заявки	(32) Дата испрашиваемого приоритета	(33) Код страны подачи по ST 3 (при испрашивании дополнительного приоритета)	
X			
(54) Название изобретения Внеклеточный матрикс ксенобрюшины для пластики грыж передней брюшной стенки			
Адрес для переписки (подный почтовый адрес и имя адресата) 100008 г. Караганда ул. Гоголя д. 40 Карагандинский государственный медицинский университет Патентная служба Телефон: 8(7212) 503930(1287) Мобильный тел. +7 701 7286239 Факс: 51 89 31			
(74) Патентный поверенный (полное имя, регистрационный номер) (полное имя или наименование)			или представитель заявителя(ей) <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> КММУ КИРПС № 3450 2017 г. "20" 10 </div>

Заявитель РГТН НИИС

Нужно отметить знаком X

Заявление с реквизитами, представленными РГТН НИИС, является уведомлением о поступлении заявки

⊕

Перечень прилагаемых документов	Кол-во л. в 1 экз.	Кол-во экз.
<input type="checkbox"/> приложение к заявлению		
<input checked="" type="checkbox"/> описание изобретения	9	3
<input checked="" type="checkbox"/> формула изобретения	1	3
<input checked="" type="checkbox"/> чертеж(и) и иные материалы	4	3
<input checked="" type="checkbox"/> реферат	1	3
<input checked="" type="checkbox"/> документ об оплате подачи заявки	1	1
<input type="checkbox"/> документ, подтверждающий наличие оснований для уменьшения размера оплаты		
<input type="checkbox"/> копия(и) первой(ых) заявки(ок) (при испрашивании конвенционного приоритета)		
<input type="checkbox"/> документы заявки на иностранном языке		
<input type="checkbox"/> доверенность, удостоверяющая полномочия патентного поверенного или представителя		
<input type="checkbox"/> другой документ (указать)		

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІНІҢ
 "ҰЛТТЫҚ ЗАПАТКЕРЛІК МЕНШІК ИНСТИТУТЫ"
 ИНФОРМАЦИОННО-ЮРИДИЧЕСКАЯ СЛУЖБА
 (место для штампа ИИС)

09 ОКТ 2017

Кіріс № 25167

51 Қолы: *[Signature]*

№ фигуры чертежей, предлагаемой для публикации с формулой(рефератом)

(72) Автор(ы) (указывается полное имя)	Полный почтовый адрес местожительства, включая наименование страны и ее код по стандарту ВОИС ST.3, если он установлен	Подпись(и) автора(ов)-заявителя(ей) и/или автора(ов)
Абатов Нуркаси Тулепбергенович	100029 г. Караганды, мкрн. Голубые пруды д 14, кв 26	<i>[Signature]</i>
Бадыров Руслан Муратович	100000 г. Караганда, пр. Н.Абдилова 47/2, кв 39.	<i>[Signature]</i>
Огай Вячеслав Борисович	Z05K8A3, г. Астана, Кургальджинское шоссе 13/5	<i>[Signature]</i>
Абатова Айгерим Нуркасиевна	100029 г. Караганды, мкрн. Голубые пруды д5/2, кв. 73	<i>[Signature]</i>
Асамиданов Еркебулан Маргуланович	100029 г. Караганды, мкрн. Голубые пруды д5/2, кв. 73	<i>[Signature]</i>

Я (мы) _____ (Ф.И.О.)
 прошу (просим) не упоминать меня (нас) как автора(ов) при публикации сведений о выдаче патента на изобретение

Подпись(и) автора(ов)

Подпись Ректор КГМУ профессор		Р.С. Досмагамбетова
--------------------------------------	---	----------------------------

Монография

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КАРАГАНДИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС КСЕНОБРЮШИНЫ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ГРЫЖ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ

Н.Т. Абатов, М.М. Тусупбенова, Р.М. Бадыров

Караганда, 2018

УДК 616.34-007.43
ББК 54.13
В 60

В 60 Внеклеточный матрикс ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки. / Н.Т. Абаатов, М.М. Тусупбекова, Р.М. Бадыров. – Караганда: «Гласир», 2018. – 56 стр.

Рецензенты: заведующий кафедрой хирургических болезней №1 КГМУ,
д.м.н. профессор К.Т. Шакеев
заместитель директора по хирургии ОКБ г. Караганды,
д.м.н. Б.В. Цхай
заведующий абдоминальным отделением ООД г. Караганды,
к.м.н. К.Е. Кожамбердин

В монографии изложены методы изучения и результаты исследования структурных изменений нового биологического имплантата – внеклеточного матрикса ксенобрюшины при пластике грыж передней брюшной стенки в эксперименте. Описана методика количественной оценки стадийно-специфического клеточного инфильтрата зоны имплантации, приведены данные тестирования биомеханических параметров исследуемого материала на удлинение и разрыв. Материалы монографии могут стать научно-обоснованной платформой для проведения клинических исследований применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки.

УДК 616.34-007.43
ББК 54.13

ISBN 978-601-7921-23-1

Утверждено на заседании Ученого совета Карагандинского государственного медицинского университета, протокол №7 от 24.01.2018 г.

© Н.Т. Абаатов, М.М. Тусупбекова, Р.М. Бадыров, 2018

- 25 T. Ueno, L.C. Pickett, S.G. de la Fuente. Clinical application of porcine small intestinal submucosa in the management of infected or potentially contaminated abdominal defects // *J. Gastrointest. Surg.* – 2004. N. 8(1). P. 109-112.
- 26 W.S. Helton, P.M. Fisichella, R. Berger et al. Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia // *Arch. Surg.* – 2005. – N. 140(6). – P. 549-560.
- 27 J.N. Limpert, A.R. Desai, A.L. Kumpf. Repair of abdominal wall defects with bovine pericardium // *Am. J. Surg.* – 2009. – N. 198(5). – P. 60-65.
- 28 A. Gupta, K. Zahriya, P.L. Mullens et al. Ventral herniorrhaphy: experience with two different biosynthetic mesh materials Surgisis and AlloDerm // *Hernia.* – 2006. – N. 10(5). P. 419-425.
- 29 F.C. Sailes, J. Walls, D. Guelig et al. Synthetic and biological mesh in component separation: a 10-year single institution review // *Ann. Plast. Surg.* – 2010. – N. 64(5). – P. 696-698.
- 30 Отчет о НИР (промежуточ.) / Караг. гос. мед. унив-т; рук. Абатов Н.Т.; исполн.: Бадыров Р.М. [и др.]. – К., 2015. – 67 с. – № ГР 0115РК00305. – Инв. № 0215РК02890.
- 31 Vandendael A., Struwig D., Nel J.T. Efficacy of fibrin sealant in prevention of adhesion formation on ovar surgical wounds in rabbit model // *Gyn. End.* – 1996. – N. 1. – P. 169.

Подписано в печать 25.01.18 г.

Тираж 300 экз.

Отпечатано в типографии «Гласир»
г. Караганда, ул. Ермакова, 112/5. Тел. 8 (7212) 43 38 57,
e-mail: glasirkg@mail.ru
www.glasir.kz

Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы

Ф КГМУ 4/7-04/5
ПП КГМУ 4/5

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебно-методической
работе _____ Риклефс В.П.
«28» _____ 2018 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ РГП на ПХВ «Карагандинский государственный медицинский университет» (наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: «Применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки»

Работа включена из диссертации на соискание степени доктора философии PhD по специальности 6D110100 – «Медицина» на тему «Экспериментальное обоснование применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки»

Форма внедрения: видеолекция

(внедрения метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом учреждении, лекции, семинары, подготовки на рабочем месте и прочее – указать)

Ответственный за внедрение и исполнитель: Абатов Н.Т., Бадыров Р.М.

Эффективность внедрения: приведенные в лекционном материале данные расширяют имеющиеся представления об использовании биологических материалов для пластики дефектов передней брюшной стенки, а именно представлен новый биологический имплантат отечественной разработки – внеклеточный матрикс ксенобрюшины.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение

Сроки внедрения в течение 2018 года

Председатель комиссии:


/ Декан факультета Р и ДО

Члены (ответственные за внедрение):

Заведующий кафедрой хирургических дисциплин

Исполнитель:

Докторант PhD кафедры хирургических дисциплин

 Л.Х. Асенова

 Н.Т. Абатов

 Р.М. Бадыров

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Стандартная операционная процедура анестезии крыс

1 Материалы

- 1.1 Диэтиловый эфир;
- 1.2 «Рометар», 20 мг/мл раствор для инъекций (ксилазина гидрохлорид);
- 1.3 Индукционная прозрачная камера (стеклянный колпак с притертой крышкой).

2 Процедуры

2.1 В индукционную камеру объемом 3л ввести 3мл эфира, затем поместить крысу. Сверху емкость закрыть стеклянной притертой крышкой.

2.2 Экспозиция нахождения крысы - 5 минут, после чего животное извлекается, укладывается на операционный стол и фиксируется.

2.3 Для лучшей миорелаксации и пролонгации наркоза ввести раствор «Рометар» 0,05 мл (из расчета 0,1 мл на 1 кг веса грызуна) внутримышечно в нижнюю конечность крысы.

2.4 Критериями нахождения крысы в наркозе считаются отсутствие реакции на прикосновение, болевой раздражитель, отрицательный рефлекс, брадипноэ и участие вспомогательной мускулатуры в акте дыхания.

2.4.1 Восстановление:

Продолжительность наркоза около 30 мин. Выход из наркоза сопровождается двигательной активностью крысы.

Стандартная операционная процедура моделирования дефекта передней брюшной стенки у экспериментальных животных (крысы)

1 Материалы

- 1.1 Анестетики;
- 1.2 Анальгетики;
- 1.3 Стерильные хирургические инструменты (скальпель, зажимы, пинцет);
- 1.4 Ножницы;
- 1.5 Марля;
- 1.6 70% спирт;
- 1.7 Раствор хлоргексидина 2%;
- 1.8 Стерильные ватные шарики;
- 1.9 Шовный материал.

2 Процедуры

2.1 Выполнение предоперационных процедур проводится на безопасном расстоянии от стерильной хирургической зоны в целях предотвращения ее загрязнения.

2.2 Предоперационные мероприятия:

2.2.1 Провести анестезию и анальгезию животного (крысы) в соответствии с СОП анестезии крыс.

2.2.2 Удалить шерсть на вентральной поверхности животного (крысы), таким образом, чтобы волосистый край кожи отступал от хирургической раны не менее чем 1 см. (5,0см*5,0см)

2.2.3 Подготовленный участок кожи обработать раствором хлоргексидина 2%.

2.2.4 Уложить животное на операционный столик.

2.2.5 Обработать операционное поле ватным шариком, смоченным 70% спиртом.

2.2.6 Подготовка хирурга:

2.2.6.1 Помыть руки.

2.2.6.2 Надеть маску и чистый хирургический костюм.

2.2.6.3 Провести асептическую обработку рук.

2.2.6.4 Надеть стерильные перчатки.

2.2.6.5 Хирург должен избегать контакта с нестерильными поверхностями.

2.2.7 Накрыть животное стерильным операционным бельем в случае больших разрезов и/или длительной операции, для предотвращения контакта раны с кожей, шерстью вокруг операционного поля. При малых разрезах операционное белье может быть использовано только при ушивании раны.

2.3 Моделирование раны:

2.3.1 Убедитесь, что все необходимые материалы под рукой.

2.3.2 Обозначьте стерильную зону на рабочей поверхности для стерильного материала (инструментов, шовного материала, марлевых шариков и т.д.)

2.3.3 Сформировать дефект брюшной стенки путем рассечения кожи по ходу белой линии живота, вырезать при помощи одноразового скальпеля участок передней брюшной стенки 10мм*10мм.

Стандартная операционная процедура закрытия биоимплантатом дефекта передней брюшной стенки экспериментального животного

1 Материалы

1.1 Биоимплантат (внеклеточный матрикс ксенобрюшины или «Permasol»);

1.2 Иглодержатель;

1.3 Пинцет анатомический;

1.4 Шовный материал на атравматичной игле толщиной не более 4/0;

1.5 Марлевые салфетки;

1.6 Стерильный физиологический раствор;

1.7 Бинт;

1.8 Пластырь;

2 Процедуры

2.1 После процедуры создания модели дефекта на вентральной поверхности тела крысы, имплантируется материал.

2.2 Фиксируется биоимплантат к передней брюшной стенке «край в край» узловыми швами либо непрерывным обвивным швом.

2.3 По завершению имплантации материала убедиться в прочности фиксации, после чего раневая поверхность орошается стерильным физиологическим раствором, осушается стерильными марлевыми салфетками.

2.4 Контроль на гемостаз

2.5 Производится ушивание раны известными способами, асептическая повязка.

Протокол окраски соединительной ткани по Ван-Гизону БиоВитрум™-пикрофуксином

1 Удалить парафин из срезов в ксилоле и провести срезы через спирты нисходящей крепости до 80⁰ этанола (орто-ксилол – 2 порции по 5 минут, 96⁰ этанол – 3 мин, 90⁰ этанол – 3 мин, 80⁰ этанол - 3 мин).

2 Окрасить срезы в рабочем растворе железного гематоксилина Вейгерта 5 мин

3 Промыть в двух порциях проточной воды 2 минуты.

4 Окрасить в БиоВитрум™-пикрофуксине (красителе Ван-Гизона) 3 мин

5 Быстро сполоснуть в дистиллированной воде 15 сек.

6 Обезводить в двух порциях 96⁰ этанола по 1 мин, одной порции абсолютного этанола 15 сек, и просветлить в двух порциях ортоксилора по 2 мин.

7 Заключить окрашенные гистологические срезы в синтетическую среду BioMount под покрывное стекло.

В результате окраски ядра клеток приобретают черный цвет, коллаген – красный, другие тканевые элементы (включая мышечные волокна и эритроциты) – желтые, фибрин – желтый или оранжевый.

Протокол окраски гематоксилином и эозином

1 Удалить парафин из срезов в ксилоле и довести через IsoPrep до дистиллированной воды (ортоксилора – 2 порции по 5 минут, IsoPrep – 2 порции по 3 мин, дистиллированная вода – 5 мин).

2 Окрасить срезы в течение 5 минут в гематоксилине Джилла.

3 Промыть в дистиллированной воде 2 минуты.

4 Поместить в подсиняющий раствор (1 капля 10% раствора аммиака на 100 мл дистиллированной воды) на 1 минуту.

5 Промыть в дистиллированной воде 5 минут.

6 Поместить в 1% раствор водного эозина на 60 секунд.

7 Быстро промыть в дистиллированной воде.

8 Удалить воду из срезов в двух порциях IsoPrep по 2 мин, просветлить в двух порциях ортоксилола по 2 мин.

9 ЗаклЮчить окрашенные гистологические срезы в синтетическую среду BioMount под покрывное стекло.

В результате окраски гематоксилином ядра клеток приобретают синий или сине-фиолетовый оттенок, а цитоплазма клеток и коллагеновые волокна соединительной ткани окрашиваются эозином в различные оттенки розового цвета.

Протокол инфильтрации ткани химическими реактивами в автоматическом тканевом процессоре «Leica TP1020» карусельного типа

Общее время фиксации и проводки материала в химических реактивах (4% забуферный нейтральный формалин, IsoPrep, ксилол, парафиновая среда HistoMix) составило 41 час.

1 Фиксация в 4% растворе забуферного нейтрального формалина в течение 24 часов.

2 IsoPrep 1 час

3 IsoPrep 1,5 часа

4 IsoPrep 1,5 часа

5 IsoPrep 1,5 часа

6 IsoPrep 2 часа

7 IsoPrep 2 часа

8 Ксилол 1 час

9 Ксилол 1 час

10 Ксилол 1 час

11 Парафин 2 часа

12 Парафин 2,5 часа

Далее материал помещается в диспенсер заливочной станции «Leica IG1150» для заливки ткани парафиновой средой HistoMix в гистологические кассеты с формированием парафинового блока и последующим охлаждением на охлаждающей плате заливочной станции.

Затем охлажденные блоки с исследуемыми материалами фиксируются в санном микротоме фирмы «Leica SM2000R», для получения гистологических срезов толщиной 3 микрона.

Количественный морфометрический метод подсчета клеточного инфильтрата зоны имплантации

Методика основана на подсчете количества клеток стадийно-специфического клеточного инфильтрата в репрезентативном участке зоны имплантации с целью оценки течения раневого процесса.

Репрезентативный участок представляет собой фрагмент зоны имплантации между исследуемым материалом и тканью реципиента вне шовного материала.

Основными клетками стадийно-специфического инфильтрата являются: гранулоцитарные лейкоциты, лимфоцитарные клетки, плазматические клетки, макрофаги, фибробласты/фиброциты. Количественный состав данных клеток и его изменение отображают различные фазы тканевой реакции в ответ на имплантацию исследуемых материалов.

Для комплексной оценки течения раневого процесса была разработана рабочая таблица, фрагмент которой представлен ниже:

Таблица Б.1 – количественный состав клеточного инфильтрата в репрезентативном участке

Сроки наблюдения	№ образца	Гранулоциты	Лимфоциты	Плазматические клетки	Макрофаги	Структурные клетки стромы (фибробласты, фиброциты)
5 дней	1	119	102	30	20	29
	2	126	90	18	22	44
	3	139	85	23	22	31
	4	144	75	20	14	47
	5	112	85	23	31	49
	6	136	78	17	23	46
	7	114	89	21	21	55
	8	130	90	24	16	40

Гистологический количественный подсчет клеточного инфильтрата проводилась на 300 клеток при 400 кратном увеличении в репрезентативном участке между исследуемым имплантатом и тканью реципиента, вне шовного материала.