УДК: 616-77.619.616-145

КЛАПАНОСОДЕРЖАЩИЙ КСЕНОВЕНОЗНЫЙ КОНДУИТ: TERRA INCOGNITA ИЛИ TABULA RASA?

Ирина Юрьевна ЖУРАВЛЕВА[1], Елена Викторовна КАРПОВА[2], Елена Викторовна КУЗНЕЦОВА[1], Александр Сергеевич ЮНОШЕВ[3], Александр Андреевич КОРОБЕЙНИКОВ[1], Татьяна Павловна ТИМЧЕНКО[1], Наталия Романовна НИЧАЙ[1], Илья Александрович СОЙНОВ[1], Артем Викторович ГОРБАТЫХ[1]

[1] *Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России*
630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

[2] *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН*
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

[3] *Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН*
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 15

Цель работы – комплексное исследование биоматериала яремной вены крупного рогатого скота (КРС) для создания на его основе оригинального кондуита, используемого у пациентов педиатрической группы. **Материал и методы.** Исследование носит экспериментальный характер. Эндоскопически отобранные образцы яремной вены КРС были обработаны 0,625%-м раствором глутарового альдегида (ГА), 5%-м раствором диглицидилового эфира этиленгликоля (ДЭ) или их сочетанием в различной последовательности. Гистохимически анализировали структуру консервированного биоматериала, определяли его упругопрочностные свойства, взаимодействие консервантов с биоматериалом изучали методом ИК-спектроскопии, выполняли оценку кальций-связывающего потенциала материала. **Результаты.** По результатам ИК-спектроскопии в стенке ксеновены, подвергшейся комбинированной обработке ГА + ДЭ, можно идентифицировать связи как ГА, так и ДЭ. На содержание сшивающего агента влияет последовательность обработки. При оценке физико-механических свойств все образцы, вне зависимости от способа консервации, были достоверно ($p < 0,05$) прочнее в 1,7–2,7 раза в циркулярном направлении, нежели в продольном. Наибольшая анизотропия упругопрочностных свойств выявлена в группах, где преобладало влияние ГА. Кальций-связывающий потенциал ксеновенозной стенки высок вне зависимости от вида сшивающего агента или их комбинации. Количественная оценка содержания кальция в образцах показала, что

Журавлева И.Ю. *– д.м.н., проф., зав. лабораторией биопротезирования Центра новых технологий, e-mail: i_zhuravleva@meshalkin.ru*
Карпова Е.В. *– к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории физических методов исследования, e-mail: karpovae@nioch.nsc.ru*
Кузнецова Е.В. *– лаборант-исследователь лаборатории биопротезирования Центра новых технологий, e-mail: ev_kuznetsova@meshalkin.ru*
Юношев А.С. *– к.ф.-м.н., зав. лабораторией высокоскоростных процессов, e-mail: yunoshev@hydro.nsc.ru*
Коробейников А.А. *– лаборант лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии Центра новых технологий, e-mail: a_korobejnikov@meshalkin.ru*
Тимченко Т.П. *– младший научный сотрудник лаборатории биопротезирования Центра новых технологий, e-mail: t_timchenko@meshalkin.ru*
Ничай Н.Р. *– младший научный сотрудник Центра новых хирургических технологий, врач-сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения врожденных пороков сердца, e-mail: n_nichay@meshalkin.ru*
Сойнов И.А. *– младший научный сотрудник Центра новых хирургических технологий, врач-сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения врожденных пороков сердца, e-mail: i_sojnov@meshalkin.ru*
Горбатых А.В. *– к.м.н., младший научный сотрудник Центра новых хирургических технологий, врач-сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения врожденных пороков сердца, e-mail: a.gorbatykh@meshalkin.ru*

максимальная концентрация обнаружена при консервации ГА, а минимальная – при обработке ДЭ ($p = 0{,}00008$). Образцы, последовательно обработанные ДЭ и ГА, занимали по накоплению кальция промежуточное положение. Заключение. Учитывая значительное содержание коллагена в тканях кондуита, использование для базовой консервации эпоксидных соединений предпочтительно по сравнению с альдегидными, так как они позволяют улучшить упругопрочностные характеристики биоматериала и снизить его кальций-связывающий потенциал.

Ключевые слова: клапаносодержащий кондуит, бычья яремная вена, глутаровый альдегид, эпоксидные консерванты, кальций-связывающая активность.

В 1992 г. Yukio Ichikawa впервые предложил использовать клапаносодержащую яремную вену крупного рогатого скота (КРС) для реконструкции выводного отдела правого желудочка, клапана и ствола легочной артерии у детей раннего возраста. При этом в качестве основного консерванта автор аргументированно использовал полиэпоксидное соединение и продемонстрировал перспективность разработанного им кондуита в эксперименте на крупных животных [11, 12]. В конце 90-х годов разработкой коммерческого продукта – ксеновенозного кондуита, получившего название Contegra, занималась компания VenPro (США). При изготовлении Contegra была использована консервация глутаровым альдегидом (ГА). С 1999 г. дистрибьютором данного изделия в Европе стала компания Medtronic, которая в 2001 г. приобрела у VenPro все права на кондуит Contegra [6, 9]. Аналоги данного изделия отсутствуют как на мировом, так и на российском рынке. Ксеновенозный кондуит Contegra (Medtronic, США) довольно широко используется в хирургии сложных врожденных пороков сердца, накоплен опыт отдаленных результатов, известны практически все его достоинства и недостатки [2, 14, 20]. Однако до настоящего времени нет ясного понимания причин большинства отдаленных осложнений, что, по-видимому, связано с недостаточной изученностью самого материала кондуита. В связи с этим целью настоящей работы явилось комплексное исследование биоматериала яремной вены КРС с перспективой создания на его основе оригинального кондуита для пациентов педиатрической группы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данное исследование, носящее экспериментальный характер, одобрено локальным этическим комитетом и проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

Консервация биоматериала. Клапаносодержащие сегменты яремной вены КРС получали в убойных цехах мясокомбинатов от животных, прошедших ветеринарный контроль. Сосуды тщательно очищали от окружающих тканей, промывали в 0,9%-м растворе натрия хлорида и погружали в консервирующий раствор. Максимальный период от момента убоя животного до начала консервации составлял 6 ч. Использовали 6 схем консервации:

1 серия – 21 сутки в 0,625%-м растворе глутарового альдегида (ГА) на фосфатном буфере со сменой консервирующего раствора на 1, 3, 7 и 21 сутки;

2 серия – 3 суток в 0,625%-м растворе ГА на фосфатном буфере со сменой раствора через 1 сутки, на 3-и сутки биоматериал отмывали в 0,9%-м растворе натрия хлорида и перекладывали в 5%-й раствор диглицидилового эфира этиленгликоля (ДЭ) на фосфатном буфере, на 7-е сутки выполняли смену раствора и через 14 суток от начала консервации помещали биоматериал в раствор для хранения;

3 серия – через 1 сутки экспозиции в 0,625%-м растворе ГА заменяли консервант на 5%-й раствор ДЭ, на 3-и сутки его заменяли на свежий и через 14 суток считали консервацию завершенной;

4 серия – 14 суток консервировали биоматериал в 5%-м растворе ДЭ на фосфатном буфере со сменой раствора через 1 сутки;

5 серия – 3 суток консервировали материал в 5%-м растворе ДЭ со сменой через 1 сутки, с 3-х по 21-е сутки ксеновены находились в 0,625%-м растворе ГА (с заменой раствора на свежий на 7-е сутки);

6 серия – через 1 сутки консервации в 5%-м растворе ДЭ заменяли основной консервант на 0,625%-й ГА, в котором и обрабатывали биоматериал до 21-х суток с заменой ГА на свежеприготовленный на 3 и 7 сутки.

Для выполнения инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопия) образцы биоматериала отбирали на каждом этапе консервации, для остальных тестов – по окончании консервации.

Оценка структуры исходного биоматериала. Макроскопическое исследование проведено на 131 нативном сегменте яремной вены КРС. Часть сегментов разрезали продольно, оценивали количество и расположение створок в клапанах. Потенциально 3-створчатые клапаны просма-

тривали с использованием эндоскопа (Hopkins Telescope 45°, Karl Storz, Германия). При визуализации обращали внимание на количество створок, их анатомическое строение и структуру, осесимметричность и качество смыкания.

Для изучения микроструктуры из 5 образцов ксеновен, консервированных по схемам 1 и 4 (см. предыдущий пункт), вырезали кусочки стенки размером 1 × 1 см, а также створки, имеющие визуально однородную плотную структуру. Кусочки стенки были вырезаны также из 3 образцов кондуита Contegra (избытки материала, полученные при интраоперационном моделировании кондуита), образцы забирали в 4%-й формалин.

Морфологические исследования проводили после окрашивания гематоксилином и эозином, по Пикро–Маллори и по Ван Гизону.

Изучение взаимодействия консервантов с биоматериалом методом ИК-спектроскопии. Биоматериал высушивали при температуре 37 °С до постоянной массы, предварительно истирали, 1 мг полученного порошка смешивали с 10 мг бромида калия в вибромельнице в течение трех минут. К смеси добавляли еще 140 мг бромида калия, измельчали 30 с и запрессовывали в пресс-форме диаметром 13 мм. ИК-спектры регистрировали в запрессовках на ИК-спектрометре Tensor 27 (Bruker Inc., Германия). Спектры нормализовали по полосе 1655 $см^{-1}$ (амид I), исходя из неизменного содержания амидных групп в белках до и после модифицирования. Спектры образцов, консервированных по различным схемам, сравнивали со спектром нативного (неконсервированного) материала.

Для выяснения природы взаимодействия белка с ГА или ДЭ изучали вторые производные спектров и разностные спектры.

Изучение упругопрочностных свойств стенки ксеновены. Испытания выполняли путем одноосного растяжения однотипно приготовленных образцов. Из ксеновенозных стенок каждой серии (в соответствии со способом консервации) вырубали по 10 образцов в виде «лопаток» в продольном и циркулярном направлениях с использованием специального ножа по ГОСТ Р МЭК 60811-1-4-2008. Эксперимент выполнен на разрывной машине Zwick/Roell (тип BDO-FB010TN; Zwick GmbH & Co. KG, Германия) при постоянной скорости нагружения образцов 50 мм/мин. Растяжение образцов останавливали при появлении первых признаков разрыва материала. Измеряли удлинение образца и соответствующее ему усилие на траверсе разрывной машины. На основании этих данных рассчитывали деформацию образца (E) по формуле $E = \Delta l / l_{исх}$, где Δl – удлинение образца до разрыва, $l_{исх}$ – начальная длина; а также напряжение (S): $S = F/s$, где F – сила растяжения, s – площадь начального наименьшего сечения образца, перпендикулярного направлению растяжения. На основании этих расчетов строили диаграммы растяжения образцов («напряжение/деформация»).

По диаграмме растяжения определяли модуль упругости образца, предел прочности и относительное удлинение (деформацию) при разрыве. Модуль упругости рассчитывали методом наименьших квадратов на участке кривой растяжения до деформации 0,15.

Оценка кальций-связывающего потенциала ксеновены, консервированной различными способами. Из образцов стенки ксеновены, обработанных различными способами, вырезали кусочки размером 5 × 5 мм, отмывали от консервирующего раствора и имплантировали 20 молодым крысам-самцам Wistar с массой тела 90 ± 4 г в подкожные карманы, сформированные из отдельных разрезов в области спины (по 3 кармана справа и слева от позвоночника). Каждый реципиент получал по 1 имплантату каждой серии (итого по 6 имплантатов). Каждой серии строго соответствовала локализация кармана. Через 60 дней животным выполняли эвтаназию сверхдозой севофлурана. Образцы удаляли из подкожных карманов, очищали от окружающей капсулы, тщательно промывали 0,9%-м раствором натрия хлорида и высушивали до постоянной массы при температуре 50 °С. Массу каждого образца фиксировали, после этого выполняли гидролиз каждого образца в 2 мл 2н HCl. Концентрацию кальция определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии и выражали в мг/г сухой ткани.

По 3 образца каждой серии после очистки от окружающей капсулы забирали в 4 % формалин для дальнейшего гистологического исследования. Использовали окрашивание гематоксилином и эозином и по методу фон Косса.

Гистологические исследования. Образцы подвергали стандартной проводке (изопропанол и парафин) и заливке в парафиновые блоки на аппарате Microm EC 350 (Thermo Scientific, США). Из парафиновых блоков с помощью роторного микротома Microm HM325 (Thermo Scientific) получали серийные срезы толщиной 4 мкм, которые депарафинизировали, гидратировали в нисходящих спиртах и окрашивали с использованием наборов и реактивов Bio-Optica (Италия) стандартно гематоксилином и эозином, по Пикро–Маллори, по Ван Гизону или по методу фон Косса. После окрашивания по любому из вышеприведенных методов срезы быстро дегидратировали в восходящих (50–70–95%-х) спиртах, высушивали, просветляли в двух порциях толуола (по 5 мин в

каждой) и заключали под покровное стекло с использованием маунта HI-MO (Bio-Optica).

Статистическая обработка материала. Для оценки количества кальция в биоматериале, обработанном различными методами, использовали значения медиан (Me) и межквартильного размаха (25-й и 75-й процентили) в каждой серии; достоверность различий между группами определяли с помощью теста Краскела–Уоллиса с последующим множественным попарным сравнением средних рангов для всех групп. Различия между группами считали достоверными при значении критерия $p \leq 0{,}05$.

При оценке упругопрочностных свойств биоматериала для каждой серии образцов вычисляли среднее значение определяемых параметров и стандартное отклонение. При построении усредненной диаграммы деформирования для однотипных образцов диаграмму каждого образца разбивали на сто равных отрезков по деформации. После этого из всех диаграмм брали значения деформации и напряжения в конце отрезков с одинаковым номером и вычисляли их средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На этапе первичной селекции ксеновенозных сегментов потенциально пригодными для создания кондуита оказались лишь 30 % (рис. 1, *а*). Остальные сегменты содержали 2- или 4-створчатый клапан; створки располагались на разном уровне либо различались по площади (рис. 1, *б*). При эндоскопической оценке почти 50 % 3-створчатых клапанов имели различные дефекты: недостаточную для полноценного смыкания площадь одной или нескольких створок (рис. 2, *а*), анатомические отверстия (рис. 2, *б*) либо дефекты свободного края (рис. 2, *в*). Таким образом, для создания кондуитов могло быть использовано не более 15 % исходного сырья, это были сегменты, имеющие достаточную длину под- и надклапанной частей, компетентный 3-створчатый клапан с однородной структурой и анатомически правильным расположением створок (рис. 2, *г*).

Микроструктура ксеновенозной стенки не зависела от способа консервации и территориального происхождения биоматериала: венозная стенка, полученная на местном мясокомбинате, обработанная ГА или ДЭ, так же, как и стенка Contegra, состоит из коллагеновых и эластиновых волокон (рис. 3). При этом эластиновые волокна четко очерчены и хорошо дифференцируются при различных окрасках; плотность их приблизительно одинакова во всех образцах; по отношению к оси сосуда они располагаются как продольно, так и циркулярно. Коллагеновые волокна представлены в большом количестве: они окрашены в синий цвет по Пикро–Маллори (рис. 3, *б*), в фиолетовый гематоксилином и эозином (рис. 3, *а*) и в оранжево-красный по Ван Гизону (рис. 3, *в*).

При исследовании стенки ксеновены методом ИК-спектроскопии оказалось, что спектры нативных (неконсервированных) образцов, полученных от разных животных, практически однородны (рис. 4, *а*). Основные отличия спектров связаны с различиями содержания воды и жировой ткани в отдельных образцах. Различия, касающиеся жировой ткани, проявляются в виде следующего набора полос поглощения: 2923, 2852 $см^{-1}$ (валентные колебания CH_2-групп в цепочках), плечо 1740 $см^{-1}$ (колебания сложноэфирной связи в триглицеридах), 1464 $см^{-1}$ (деформационные (ножничные) колебания CH_2-групп в цепочках), 1242 $см^{-1}$ (валентные асимметричные колебания С–О-связи в сложноэфирной группе), 1176 $см^{-1}$ (валентные симметричные колебания С–О-связи в сложноэфирной группе), 721 $см^{-1}$ (маятниковые колебания CH_2-групп в цепочке длиннее 3 углеродных атомов). Различное содержание влаги в образцах проявляется в области валентных колебаний гидроксильных групп 3100–3600 $см^{-1}$. Однако все эти различия не затрагивают групп, потенциально участвующих в реакциях с альдегидными и эпоксидными сшивающими агентами. Это позволяет с достаточной степенью точности оценить молекулярные трансформации биоматериала в процессе консервации.

При обработке ГА в течение 21 суток в спектрах значительно уменьшается интенсивность полосы поглощения первичных аминогрупп (1049 $см^{-1}$), что хорошо видно на вторых производных полученных спектров (рис. 4, *б*). Увеличивается интенсивность поглощения полос вторичных аминогрупп (1119 $см^{-1}$) и вторичных гидроксильных групп (1241, 1100 $см^{-1}$). Появляются полосы поглощения цепочки C_3H_6 на 731 $см^{-1}$. Эта полоса немного сдвинута относительно поглощения длинных цепочек в молекулах жиров (723 $см^{-1}$). Исчезновение поглощения первичных аминов и появление поглощения вторичных аминов и вторичных гидроксильных групп говорит о том, что взаимодействие идет по первичным аминогруппам белка. ГА вступает в реакцию в виде альдегида, а не ацеталя. Образовавшийся продукт конденсации, по-видимому, остается в виде гем-аминоспирта, не превращаясь далее в имин.

При консервации ДЭ (рис. 4, *в*) нарастает содержание простых эфирных групп (полосы 1082, 1127, 1141 $см^{-1}$); помимо этого во всех спектрах присутствует слабая полоса 859 $см^{-1}$, характери-

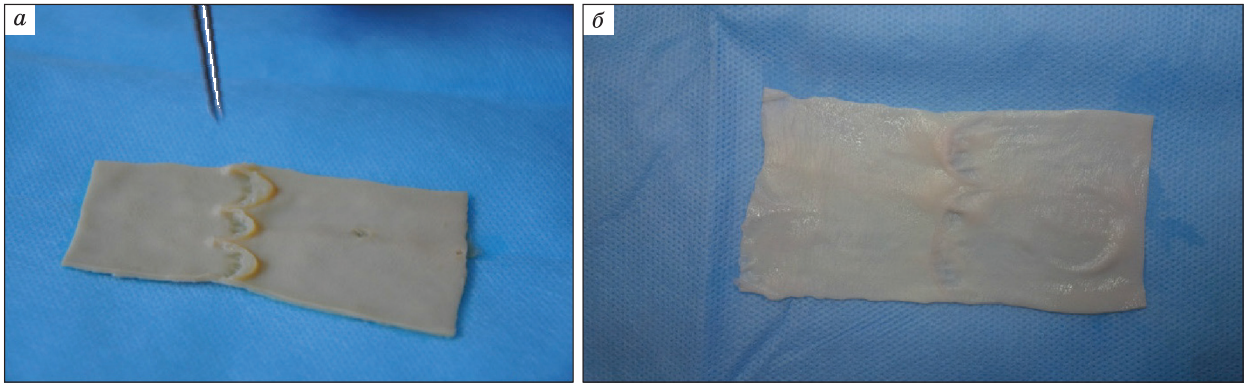

Рис. 1. *Вариабельность структуры венозного клапана яремной вены КРС: а – продольно рассеченный фрагмент яремной вены с хорошо выраженным 3-створчатым клапанным аппаратом; б – продольно рассеченный фрагмент яремной вены с 2-створчатым клапаном*

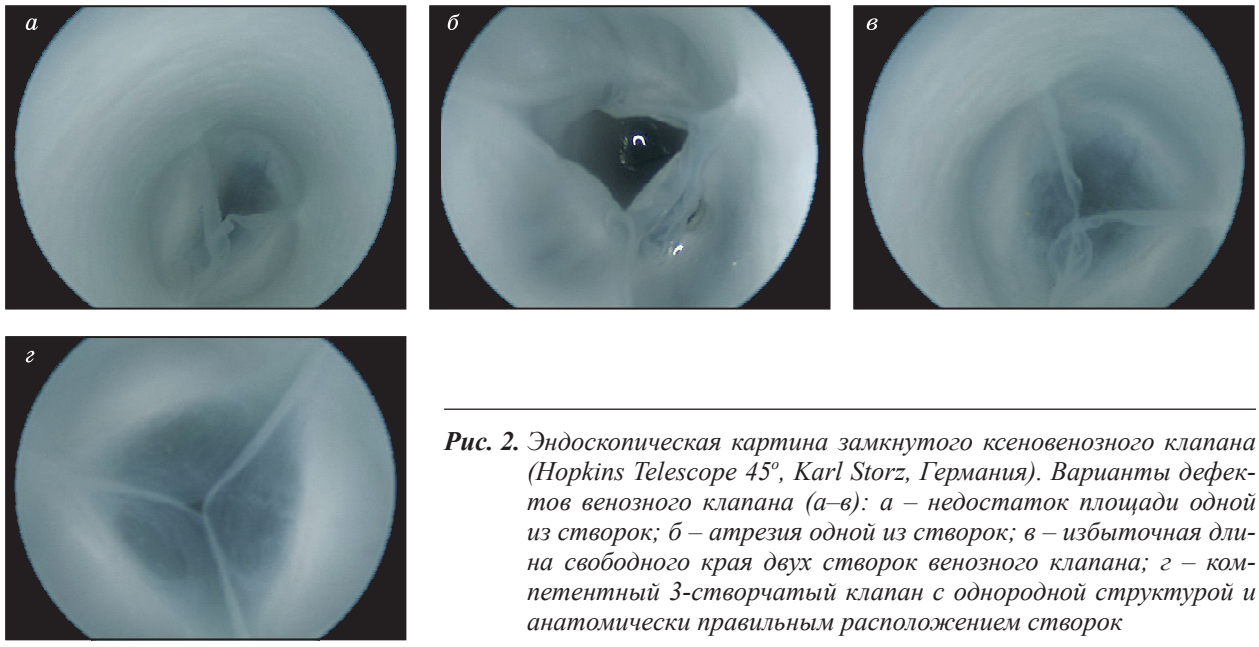

Рис. 2. *Эндоскопическая картина замкнутого ксеновенозного клапана (Hopkins Telescope 45°, Karl Storz, Германия). Варианты дефектов венозного клапана (а–в): а – недостаток площади одной из створок; б – атрезия одной из створок; в – избыточная длина свободного края двух створок венозного клапана; г – компетентный 3-створчатый клапан с однородной структурой и анатомически правильным расположением створок*

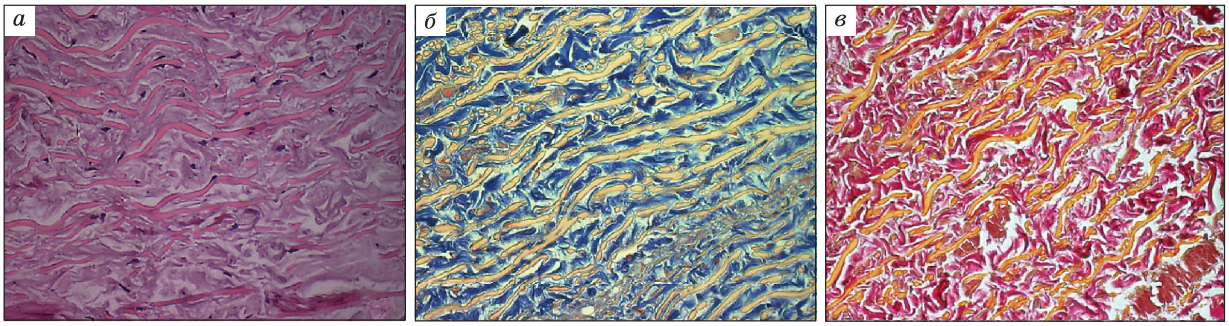

Рис. 3. *Микроскопическое строение ксеновезнозой стенки: а – консервация биоматериала ГА (окраска гематоксилином и эозином); б – консервация ДЭ (окраска по Пикро–Маллори); в – микроструктура стенки кондуита Contegra (окраска по Ван Гизону). Ув. × 400*

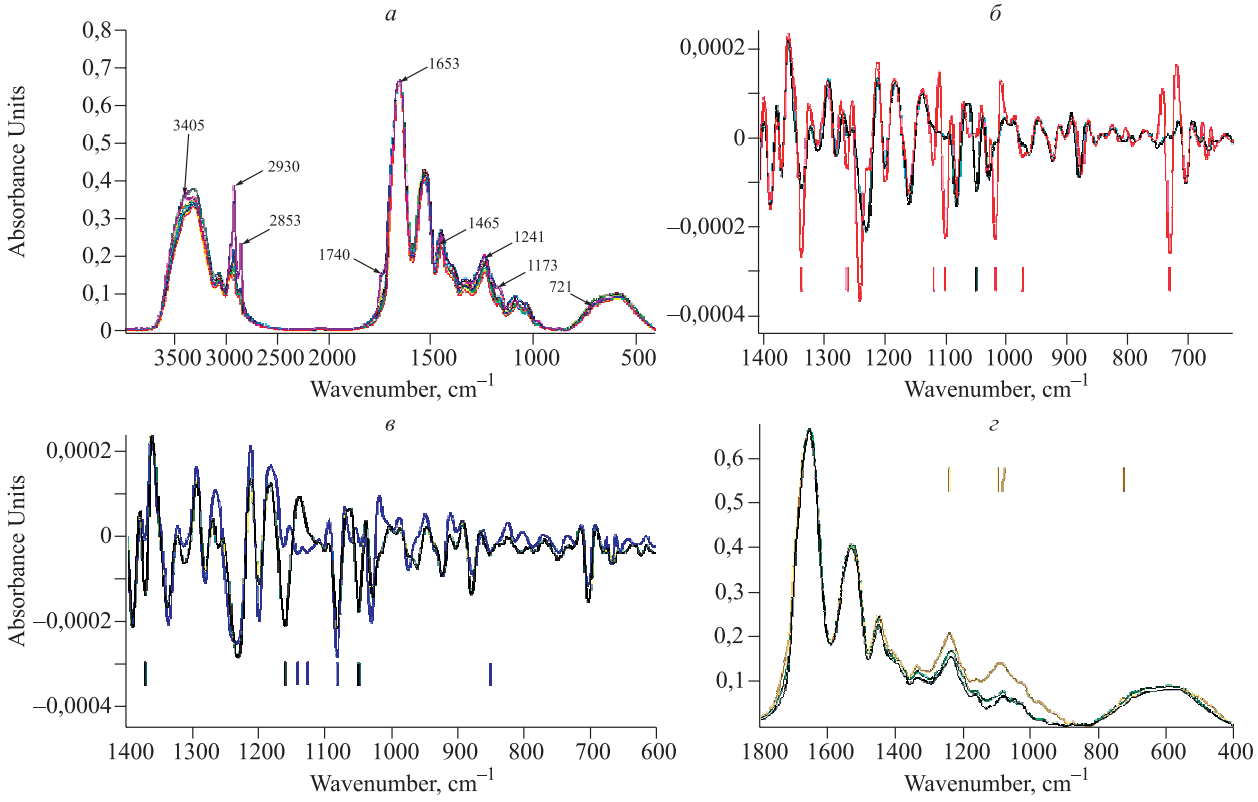

Рис. 4. *Результаты ИК-спектроскопии нативных и консервированных образцов: а – ИК-спектры нативных (неконсервированных) образцов; б – вторые производные ИК-спектров нативного (черная линия) и консервированного глутаральдегидом (красная линия) образцов в диапазоне 1400–600 см$^{-1}$; в – вторые производные ИК-спектров нативного (черная линия) и консервированного ДЭ (синяя линия) образцов в диапазоне 1400–600 см$^{-1}$; г – ИК-спектры нативного (черная линия), консервированного последовательно ГА+ДЭ (оранжевая линия) и ДЭ+ГА (зеленая линия) образцов в диапазоне 1800–400 см$^{-1}$*

зующая колебания нераскрывшегося эпоксидного цикла. Уменьшается интенсивность полосы поглощения первичных аминогрупп 1049 см$^{-1}$ и полос 1371 и 1160 см$^{-1}$, которые можно отнести к комбинации деформационных колебаний связей О–Н и С–О в фенолах (тирозин). Уменьшение интенсивностей поглощения первичных аминов и фенольных групп говорит о том, что ДЭ взаимодействует с первичными аминогруппами белка и фенольной группой тирозина через образование простой эфирной связи. Идентификация вторичных гидроксильных и аминогрупп, образующихся в данном процессе, затруднена из-за перекрывания их полос поглощения с поглощением простых эфирных связей (область 1095–1155 см$^{-1}$).

При комбинированной обработке ГА + ДЭ (серии 2 и 3) и ДЭ + ГА (серии 5 и 6) в спектрах можно идентифицировать связи с биоматериалом как ГА, так и ДЭ (рис. 4, *г*).

В ИК-спектрах образцов серии 2 и 3 видны полосы поглощения простых эфирных связей ДЭ (1083 см$^{-1}$), а также цепочки C_3H_6 и вторичных спиртовых групп, вносимых в структуру при консервации ГА. В образцах серии 5 и 6 интенсивности сигналов обоих реагентов ниже. Следует отметить, что на количественное содержание сшивающего агента влияет последовательность обработки: в сериях 2 и 3 преобладают фрагменты ДЭ, в сериях 5 и 6 – ГА.

При оценке физико-механических свойств необходимо отметить значительную вариабельность экспериментальных данных. Относительное стандартное отклонение любой измеряемой величины составляет не менее 10 %. Несмотря на это, очевидно, что все образцы, вне зависимости от способа консервации, достоверно ($p < 0,05$) прочнее в 1,7–2,7 раза в циркулярном направлении (рис. 5, *б*), нежели в продольном (рис. 5, *а*). Кроме того, модуль упругости продольных образцов выше, чем циркулярных, что свидетельствует об их большей жесткости (см. таблицу). Данный феномен обусловлен, по-видимому, преимущественно циркулярным расположением эластиновых волокон в стенке ксеновены.

Наибольшие различия упругопрочностных свойств между продольными и циркулярными образцами выявлены в группах, где преобладало

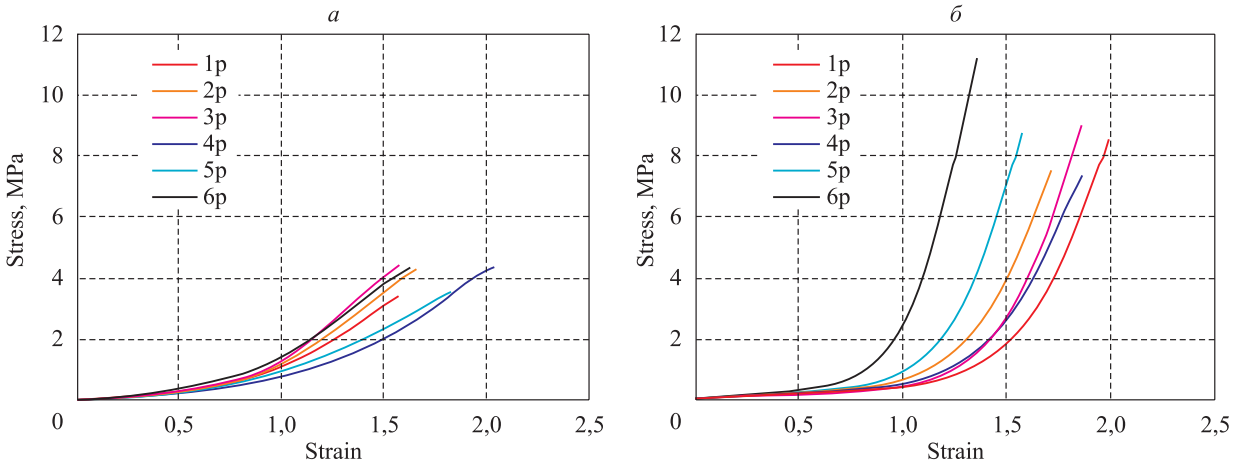

Рис. 5. *Графики «напряжение/деформация» для образцов, вырезанных в продольном (а) и циркулярном (б) направлениях. Цифровые обозначения в легенде соответствуют номерам групп в зависимости от способа консервации*

Таблица

Показатели разрушающего напряжения ($S_{разр}$) и модуля упругости (E) образцов ксеновены, вырезанных в продольном и циркулярном направлениях, в зависимости от способа консервации

Группа	$S_{разр}$ (МПа)		E (МПа)	
	продольное	циркулярное	продольное	циркулярное
1 – ГА	3,5 ± 1,2	9,4 ± 1,0	0,62 ± 0,20	0,31 ± 0,05
2 – ГА(3) + ДЭ	4,5 ± 2,0	8,9 ± 2,5	0,72 ± 0,15	0,39 ± 0,12
3 – ГА(1) + ДЭ	4,3 ± 1,4	6,9 ± 2,5	0,55 ± 0,14	0,40 ± 0,11
4 – ДЭ	4,4 ± 1,2	7,4 ± 0,7	0,51 ± 0,12	0,39 ± 0,07
5 – ДЭ(3) + ГА	3,7 ± 0,9	8,9 ± 1,5	0,55 ± 0,16	0,41 ± 0,12
6 – ДЭ(1) + ГА	4,2 ± 1,1	11,5 ± 4,3	0,69 ± 0,13	0,47 ± 0,11

Примечание. Величины показателей образцов ксеновены, вырезанных в продольном и циркулярном направлениях, при всех способах консервирования статистически значимо ($p < 0,05$) различаются.

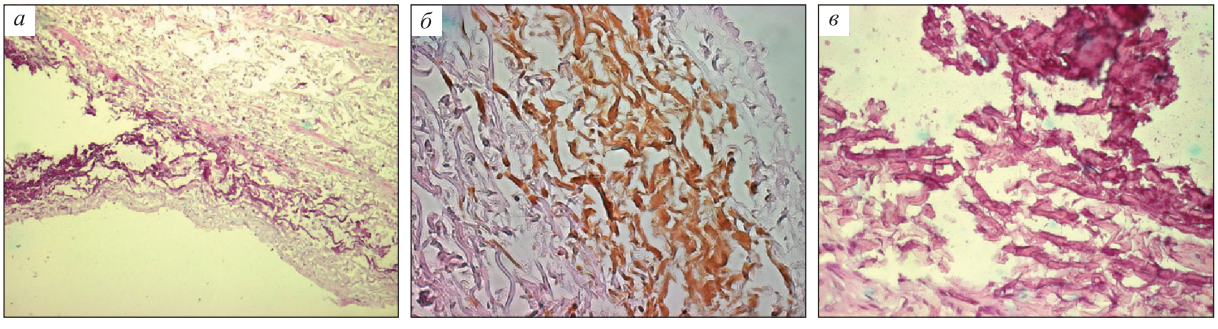

Рис. 6. *Гистологическая оценка кальцификации ксеновены в модели подкожной имплантации крысам: а – субинтимальное расположение кальцинатов (гематоксилин и эозин, исх. ув. × 100); б – депозиты кальция, связанные с эластиновыми волокнами (окраска по фон Коссу, исх. ув. × 400); в – нарастание массы кристаллов и разрушение эластин-коллагеновых структур (гематоксилин и эозин, исх. ув. × 400)*

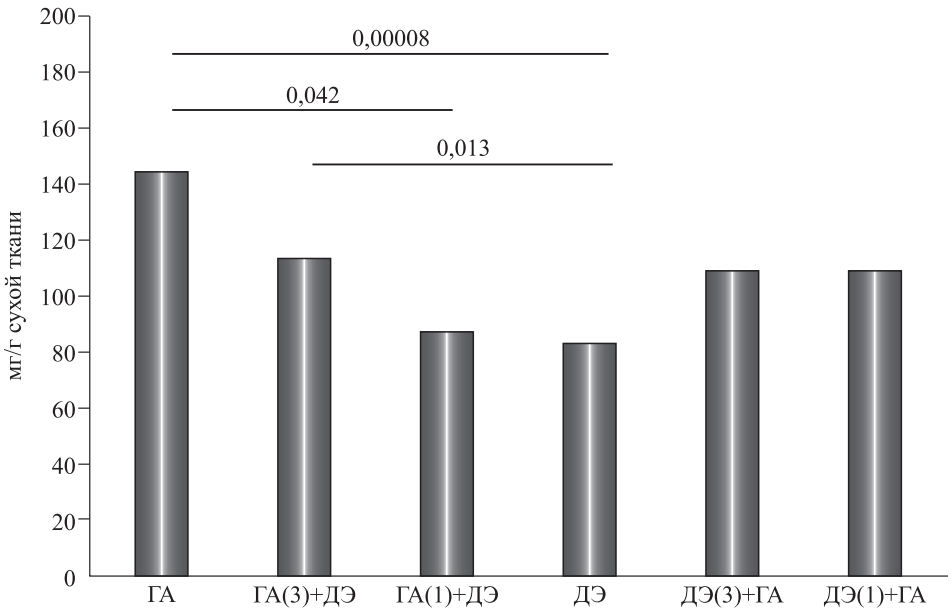

Рис. 7. *Накопление кальция в стенке ксенокондуита в зависимости от метода ее консервации (мг/г сухого вещества). При последовательной обработке двумя консервантами: цифровые индексы – длительность (сутки) обработки первым консервантом. Горизонтальными линиями обозначения статистически значимые различия*

влияние ГА. Так, для 1 серии (чистый ГА) прочность циркулярных образцов была в 2,7 раза больше, а жесткость – в 2 раза меньше, чем аналогичные показатели продольных образцов. Для серии 6 (1 сутки ДЭ + ГА) кратность различий составляла соответственно 2,7 и 1,7. В то же время циркулярные образцы, консервированные преимущественно диэпоксидом – серии 4 (чистый ДЭ) и 3 (1 сутки ГА+ДЭ) – демонстрировали меньшие различия жесткости – в 1,3 и 1,4 раза и прочности – в 1,6 и 1,7 раза соответственно.

Кальций-связывающий потенциал ксеновенозной стенки высок вне зависимости от вида сшивающего агента или их комбинации. Все удаленные через 2 месяца подкожные имплантаты были кальцинированы, причем основные конгломераты кальция располагались субинтимально (рис. 6, *а*). При окраске по фон Коссу на больших увеличениях хорошо видно, что кальциевые депозиты первоначально тесно связаны с эластиновыми волокнами, полностью повторяя их контуры (рис. 6, *б*). Затем, при нарастании массы кристаллов и разрушении эластин-коллагеновых структур, отложения кальция представляют собой не связанные с тканью конгломераты (рис. 6, *в*).

Тем не менее при количественном определении содержания кальция выявлены закономерные различия между группами, консервированными по различным схемам (рис. 7). Так, максимальную концентрацию кальция обнаружили в имплантатах, консервированных ГА; минимальную – в ДЭ-обработанных имплантатах ($p = 0{,}00008$). Меньшим ($p = 0{,}042$) содержанием кальция по сравнению с полной схемой сшивки ГА (1-я группа) отличался биоматериал, консервированный ГА в течение 1 суток с последующей сшивкой ДЭ (3-я группа); кальцификация его почти не отличалась ($p = 0{,}91$) от материала, обработанного только ДЭ (4-я группа). Ксеновена, выдержанная в ГА в течение трех суток с последующим переносом в ДЭ (2-я группа), накапливала кальций значительно интенсивнее, чем ДЭ-обработанная ($p = 0{,}013$), и не отличалась по содержанию Са от ГА-обработанной ($p = 0{,}16$). Образцы, последовательно обработанные ДЭ и ГА, занимали по накоплению кальция промежуточное положение между 1-й и 4-й группами и достоверно от них не отличались.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на широкое клиническое использование кондуита Contegra, характеристики биоматериала, из которого он изготовлен, – структура, свойства и трансформации под влиянием различных консервантов – крайне скудно представлены в литературе. Соответственно, причины и патогенез развития тех или иных дисфункций Contegra не ясны, а пути совершенствования кондуита из яремной вены КРС не понятны.

Известно, например, что в структуре дисфункций кондуитов лидирующее место зани-

мает стеноз дистального анастомоза (40–60 %). Кальцификация ксеновенозной стенки встречается значительно реже – в 17–25 % удаленных кондуитов, и, как правило, не является самостоятельной причиной повторной операции. В то же время кальцификация ксеновенозных створок отмечена лишь в единичных исследованиях и, по-видимому, является вторичной по отношению к таким осложнениям, как инфекция и тромбоз [5, 9, 16, 20].

Первое и основное, что нужно учитывать, – это макро- и микроструктура биопротеза. Согласно нашим данным, лишь 15 % ксеновенозных сегментов, взятых в качестве сырья, содержат полноценные 3-створчатые клапаны с хорошей структурой и коаптацией створок. Ранее некоторые авторы тестировали 2- и 4-створчатые клапаны [15], однако показали их гидравлическую несостоятельность, в особенности после воздействия сшивающего агента ГА [18]. Поэтому мы считаем, что при отборе клапаносодержащих ксеновенозных сегментов обязателен двойной эндоскопический контроль с гидравлической пробой: до начала консервации выбраковке подлежат клапаны с исходно некомпетентным створчатым аппаратом; эндоскопическая оценка после консервации направлена на элиминацию сегментов с деформациями клапанов, вызванными влиянием химической сшивки.

Различия микроструктуры стенки и створки ксеновены могут послужить ключом к пониманию различий их кальций-связывающей активности. Наименее подверженная кальцинозу створка ксеновены [3, 8] полностью состоит из коллагена. Кальцификация коллаген-содержащих биоматериалов – довольно хорошо изученный и «управляемый» процесс. В частности, доказано, что эпоксидные консерванты значительно снижают кальцификацию коллагеновых структур [7]. В отличие от створки, ксеновенозная стенка содержит большое количество эластиновых волокон, которые практически не взаимодействуют с альдегидными и эпоксидными консервантами, что было доказано на примере очищенного фибриллярного эластина и стенки аорты свиньи, основным структурным компонентом которой также является эластин [4, 13, 17]. Однако если процессы кальцификации ксеноаортальной стенки хорошо изучены, то ксеновенозному биоматериалу посвящена всего одна работа [19], доказавшая, что эпоксиобработанная ткань накапливает кальций в значительно меньшей степени, чем консервированная ГА.

Эти результаты согласуются с данными, представленными в нашей работе. Стенка ксеновены, консервированная ДЭ, в течение двух месяцев имплантации накапливала почти вполовину меньше кальция, чем ГА-консервированная (см. рис. 7). В то же время известно, что интенсивность кальцификации ксеноаортальной стенки не зависит от химического класса консерванта [4, 17]. Этот феномен можно объяснить тем, что в стенке вены, по сравнению с аортой, содержится значительно больше коллагена и меньше внеклеточного матрикса, в состав которого входят кальций-связывающие белки, например, тенасцин-С и ММР-9 [13]. Таким образом, накопление кальция в ксеновене может снижаться за счет того, что, по крайней мере, коллаген «защищен» от кальцификации эпоксидной сшивкой, и нуклеация кальция ограничена только эластином. Дополнительным подтверждением этой гипотезы служат морфологические находки (см. рис. 6), доказывающие тесную связь кальциевых депозитов с волокнами эластина.

Обращает на себя внимание тот факт, что при последовательной обработке ксеновенозной стенки альдегидным и эпоксидным сшивающими агентами ее кальций-связывающий потенциал различен. Так, после экспозиции в ГА в течение 1 суток с последующей полной «доконсервацией» ДЭ биоматериал приобретает свойства ДЭ-обработанного. В то же время образцы, первоначально консервированные ДЭ (1 и 3 суток) с дальнейшей обработкой ГА, кальцинируются в большей степени, чем обработанные только ДЭ, и лишь незначительно отличаются от ГА-обработанных. Это хорошо согласуется с данными ИК-спектроскопии о том, что молекулярные трансформации в биоматериале вызывают оба сшивающих агента, но при этом заключительная обработка оказывает более значительный эффект. Однако если длительность начального этапа консервации ГА составляет 3 суток, то дальнейшее воздействие ДЭ практически не влияет на кальций-связывающий потенциал биоткани.

Упругопрочностные характеристики биоматериала также зависят от структурных трансформаций под воздействием консервантов. Так, образцы, вырезанные в продольном направлении из ксеновены, подвергнутой длительному воздействию ГА – образцы серий 1 (чистый ГА), 2 (3 суток ГА+ДЭ) и 6 (1 сутки ДЭ+ГА) – характеризуются повышенным по сравнению с остальными сериями модулем упругости и, соответственно, выраженной анизотропией упругопрочностных свойств в продольном и циркулярном направлениях. В отдаленном послеоперационном периоде это может приводить к ускорению усталостных дисфункций кондуита. В то же время модуль упругости для образцов, вырезанных в циркулярном направлении, практически не зависит от

способа консервации, что согласуется с данными, полученными ранее [19].

Известно, что поперечные сшивки, формируемые в коллаген-содержащих тканях ГА, придают им гидрофобность, избыточную жесткость и высокий кальций-связывающий потенциал. Эпоксидные консерванты, напротив, обеспечивают гидрофильность, упругопрочностные характеристики, близкие к нативному материалу, и выраженное ингибирование кальцификации при имплантации в организм реципиента. Ранее это было доказано на примере таких биоматериалов, как створки свиного аортального клапана, стенка внутренней грудной артерии и перикард КРС [1]. Как показали результаты проведенного исследования, это справедливо и для ксеновенозной стенки, содержащей в своем составе значительное количество коллагена.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что при последовательном воздействии на ткань ксеновены ГА и ДЭ ее упругопрочностные характеристики и кальций-связывающий потенциал зависят от скорости образования и количества преобладающих поперечных сшивок. Известно, что образование поперечных связей при консервации биоткани ГА заканчивается на 95 % через 3 суток [1], тогда как ДЭ за это время формирует лишь 50 % связей с аминогруппами [10]. Очевидно, поэтому образцы, консервированные чистым ГА (1-я серия) и ГА в течение 3 суток с последующим воздействием ДЭ (2-я серия), практически не различаются по упругопрочностным характеристикам и кальций-связывающей активности. Аналогичные свойства присущи и образцам серии 6 (1 сутки ДЭ + ГА). Результаты ИК-спектроскопии подтверждают, что после 1 суток консервации ДЭ в биоматериале ксеновены сохраняется значительное количество свободных аминогрупп для формирования альдегидных сшивок при последующем воздействии ГА. Однако те образцы, в которых эпоксидные сшивки преобладают (серии 3 и 4), очень близки между собой и отличаются от других серий меньшей анизотропией упругопрочностных свойств и сниженным уровнем накопления кальция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение нужно отметить, что широкое применение в хирургии врожденных пороков сердца единственного на мировом рынке ксеновенозного кондуита Contegra обусловлено его оптимальными анатомическими и гемодинамическими характеристиками. Неудовлетворительные отдаленные результаты чаще всего связаны с осложнениями, вызванными недостаточно изученными свойствами биоматериала кондуита. Имеющийся значительный потенциал для совершенствования кондуитов из яремной вены КРС не может быть реализован без фундаментальных исследований, посвященных трансформациям протезного материала в результате воздействия консервантов, а в последующем, после имплантации – факторов организма реципиента. По результатам настоящей работы можно сделать два достоверных вывода.

1. Для тщательного отбора ксеновенозных сегментов с компетентным клапаном необходим надежный неинвазивный метод, каковым является, в частности, двойной эндоскопический контроль с гидравлической пробой.

2. Учитывая значительное содержание коллагена в тканях кондуита, использование для базовой консервации эпоксидных соединений предпочтительно по сравнению с альдегидными, так как эпоксиды позволяют улучшить упругопрочностные характеристики биоматериала и снизить его кальций-связывающий потенциал.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-8107.2016.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Барбараш Л.С., Барбараш Н.А., Журавлева И.Ю*. Биопротезы клапанов сердца: проблемы и перспективы. Кемерово, 1995. 400 с.

2. *Лукьянов А.А., Караськов А.М., Горбатых Ю.Н. и др*. Ближайшие и отдаленные результаты операции Росса у пациентов педиатрической группы // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2014. (2). 5–9.

3. *Attmann T., Quaden R., Freistedt A. et al.* Percutaneous heart valve replacement: histology and calcification characteristics of biological valved stents in juvenile sheep // Cardiovasc. Pathol. 2007. 16. 165–170.

4. *Bailey M.T., Pillarisetti S., Xiao H. et al*. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves // J. Biomed. Mater. Res. A. 2003. 66. 93–102.

5. *Breymann T., Blanz U., Wojtalik M.A. et al.* European Contegra Multicentre Study: 7-Year Results after 165 Valved Bovine Jugular Vein Graft Implantations // Thorac. Cardiovasc. Surg. 2009. 57. (5). 257–269.

6. *Carrel T*. Bovine valved jugular vein (Contegra™) to reconstruct the right ventricular outflow tract // Expert Rev. Medical Devices. 2004. 1. (1). 11–19.

7. *Connolly J.M., Bakay M.A., Alferiev I.S. et al.* Triglycidylamine cross-linking combined with ethanol inhibits bioprosthetic heart valve calcification // Ann. Thorac. Surg. 2011. 92. (3). 858–865.

8. *Herijgers P., Ozaki S., Verbeken E. et al*. Valved jugular vein segments for right ventricular outflow tract reconstruction in young sheep // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2002. 124. 798–805.

9. *Holmes A.A., Co S., Human D.G. et al*. The Contegra conduit: Late outcomes in right ventricular outflow tract reconstruction // Ann. Pediatr. Cardiol. 2012. 5. (1). 27–33.

10. Patent № 5 880 242 US. Nonpolymeric epoxy compounds for cross linking biological tissue and bioprosthetic grafts prepared thereby / Hu C.B., Myers K.E., Nguyen-Thien-Nhon D. et al.; published 1999.

11. *Ichikawa Y*. A new RV-PA conduit with a natural valve made of bovine jugular vein // ASAIO J. 1992. 38. M266-M270.

12. *Ichikawa Y., Noishiki Y., Soma T. et al*. A new antithrombogenic RV-PA valved conduit // ASAIO J. 1994. 40. (3). M714-M718.

13. *Perrotta I., Russo E., Camastra C. et al*. New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review // Histopathology. 2011. 59. 504–513.

14. *Protopapas A.D., Athanasiou T*. Contegra conduit for reconstruction of the right ventricular outflow tract: a review of published early and mid-time results // J. Cardiothorac. Surg. 2008. 3. ID 62.

15. *Qui Y., Quijano R. C., Wang S. K. et al*. Fluid dynamics of venous valve closure // Ann. Biomed. Eng. 1995. 23. 750–759.

16. *Urso S., Rega F., Meuris B. et al*. The Contegra conduit in the right ventricular outflow tract is an independent risk factor for graft replacement // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2011. 40. 603–609.

17. *Vyavahare N., Ogle M., Schoen F.J. et al*. Elastin calcification and its prevention with aluminum chloride pretreatment // Am. J. Pathol. 1999. 155. (3). 973–982.

18. *Wu Z.S., Zhang J.C., Cheng D*. Morphologic and hydrodynamic characteristics of bovine jugular venous conduit with valves // Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2003. 28. (3). 298–300. [In Chinese].

19. *Xu Z.J., Wu Z.S., Hu T.H. et al*. Bovine jugular venous conduit treated with the polyepoxy compound // Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2006. 31. (3). 355–358. [In Chinese].

20. *Yuan S.-M*. The contegra valved bovine conduit: A biomaterial for the surgical treatment of congenital heart defects // Arq. Bras. Cardiol. 2012. 99. (6). 1159–1165.

VALVE-CONTAINING XENOVENOUS CONDUIT: TERRA INCOGNITA OR TABULA RASA?

Irina Yur'evna ZHURAVLEVA[1], Elena Victorovna KARPOVA[2], Elena Victorovna KUZNETSOVA[1], Alexandr Sergeevich YUNOSHEV[3], Alexandr Andreevich KOROBEYNIKOV[1], Tat'yana Pavlovna TIMCHENKO[1], Nataliya Romanovna NICHAY[1], Ilya Alexandrovich SOYNOV[1], Artem Viktorovich GORBATYKH[1]

[1] *Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology n.a. academician Meshalkin E.N. of Minzdrav of Russia*
630055, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15

[2] *Institute of Organic Chemistry of SB RAS*
630090, Novosibirsk, Academik Lavrentev av., 9

[3] *Institute of Hydrodynamics of SB RAS*
630090, Novosibirsk, Academik Lavrentev av., 15

The goal of this study was to evaluate bovine jugular vein as a potential material for original vascular conduit used in pediatric patients. Materials and methods. Endoscopic obtained bovine vein specimens were treated with either 6.25 % glutaraldehyde (GA), or 5 % ethylene glycol diglycidyl ether (DE), or both in different order. Histochemical, mechanical and calcium-binding properties of conserved material were evaluated. Interaction of the material and conserving solutions was also evaluated by means of IR-spectroscopy. Results. According to IR-spectroscopy, both GA and DE chemical bounds were identified in the wall of xeno-vein treated with GA+DE combination. The amount of conserving agent in specimens was determined by sequence of treatment. Independently of conservation method, all specimen demonstrated 1.7–2.7 higher ($p < 0.05$) mechanical strength in radial direction versus longitudinal direction. The greatest anisotropy of elasticity and mechanical strength was demonstrated in specimens treated with GA. Calcium-binding properties are not influenced by treatment method. The highest amount of calcium was found in GA-treated specimens and the lowest in DE-treated specimens ($p = 0.00008$). Specimens treated with DE+GA combination demonstrated medium quantities of calcium. Conclusion. Considering significant amount of collagen in conduit tissue, utilization of epoxy compounds is preferred for basic conservation, versus aldehyde compounds. This is because the former improves mechanical properties of the material and decreases its calcium binding potential.

Key words: valve-containing conduit, bovine jugular vein, glutaraldehyde, epoxy based conservants, calcium binding properties.

Zhuravleva I.Yu. *– doctor of medical sciences, professor, the head of the laboratory of bioprothesis, e-mail: i_zhuravleva@meshalkin.ru*
Karpova E.V. *– candidate of chemical science, senior researcher of the laboratory of physical methods, e-mail: karpovae@nioch.nsc.ru*
Kuznetsova E.V. *– junior researcher of the laboratory of bioprothesis, e-mail: ev_kuznetsova@meshalkin.ru*
Yunoshev A.S. *– candidate of physics and mathematics science, the head of the laboratory of high-speed processes, e-mail: yunoshev@hydro.nsc.ru*
Korobeynikov A.A. *– junior researcher of the laboratory of experimental surgery and morphology, e-mail: a_korobejnikov@meshalkin.ru*
Timchenko T.P. *– junior researcher of the laboratory of bioprothesis, e-mail: t_timchenko@meshalkin.ru*
Nichay N.R. *– junior researcher of the centre new technologies, cardiac surgery of department pediatric cardiac surgery, e-mail: n_nichay@meshalkin.ru*
Soynov I.A. *– junior researcher of the centre new technologies, cardiac surgery of department pediatric cardiac surgery, e-mail: i_sojnov@meshalkin.ru*
Gorbatykh A.V. *– candidate of medical sciences, junior researcher of the centre new technologies, cardiac surgery of department pediatric cardiac surgery, e-mail: a.gorbatykh@meshalkin.ru*