

НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ БИОПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА, ОБЛАДАЮЩИХ ПОВЫШЕННОЙ ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Барбараи Л.С., Журавлева И.Ю., Борисов В.В., Климов И.А., Турдакина Н.А.

Научно-производственная проблемная лаборатория реконструктивной хирургии сердца и сосудов с клиникой СО РАМН, г. Кемерово

THE NEW GENERATION OF HEART VALVE BIOPROSTHESES WITH HIGH THROMBORESISTANCE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY

The aim of the study was to elaborate the new generation of the heart valve bioprostheses resistant to calcification, thrombogenesis and infection. This article substantiates the conception of cardiovascular bioprostheses polyfunctional modification.

Porcine aortic valves were preserved with the original preservation agents referred to as VK-1 and VK-2 (mono- and polymeric epoxy compounds mixtures of different composition). Heparin was immobilized on leaflet to obtain thromboresistance and the preparation CH-1 to obtain antibacterial activity. Calcification of biomaterial has been studied using subcutaneous implantation in rats; cross-links resulting from preservation by amino acid analysis; stress/strain properties using of the tensile-testing machine; surface properties using scanning electron microscopy. Glutaraldehyde samples were the controls. Thromboresistance has been evaluated using thrombocyte tests and dynamic thrombus formation on a leaflet in blood. Antibacterial activity has been assessed *in vitro* using the *St. aureus* and *Ps. aeruginosa* cultures.

Calcium content in epoxy-treated biomaterial was $2,5 \pm 0,1$ mg/g dry tissue in 90 days of implantation (versus $242,31 \pm 19,04$ mg/g in GA-treated samples). Cross-link amount was 2,6 times in VK-2-treated leaflets, and 13 times in VK-1-preserved that amount in controls. Maximum tensile stress was respectively 1,5 and 1,6 times higher. 2632 ± 120 mg of heparin was immobilized on 1 g of VK-1-treated leaflets and 2210 ± 150 mg on VK-2-treated ones. The smoothest surface has been obtained with VK-2 treatment and heparin immobilization. The latter yielded minimum thrombus mass on leaflets in contact with blood. CH-1 immobilization provided high antibacterial activity of both VK-1 and VK-2-preserved leaflets: growth inhibition zones of *St. aureus* were respectively $12,94 \pm 0,29$ and $12,75 \pm 0,39$ mm; and those of *Ps. aeruginosa* – $9,28 \pm 0,29$ and $9,0 \pm 0,54$ mm.

Conclusion:

1. The developed method employs epoxy mixtures VK-1 and VK-2 for initial preservation of heart valve bioprostheses and some biologically active compounds for modification thereof. Bioprosthesis featuring high resistance to calcification, thrombogenesis and infection can be created by this method.
2. Calcification resistance is attributed to the bonds between collagen reactive groups and epoxy compounds. Hemocompatibility may be obtained by virtue of leaflet surface smoothing with VK-2 and further enhanced by heparin immobilization.

Antibacterial properties of the biomaterial are obtained with additional covalent CH-1 immobilization.

Введение

Клиническое применение биопротезов клапанов сердца, консервированных глutarовым альдегидом (ГА), в настоящее время ограничено высоким риском первичной тканевой несостоятельности, связанной с кальцификацией биологической ткани [9, 11]. Поэтому в качестве альтернативных консервантов биологической ткани были предложены химические агенты, относящиеся к классу эпоксисоединений. Антикальцифицирующий эффект эпоксидных консервантов доказан экспериментальными исследованиями [2, 5, 10, 13].

С 1991 года биопротезы клапанов сердца «КемКор», консервированные мономерным диэпоксидом, выпускаются и успешно применяются в Кемеровском кардиологическом центре [2]. В настоящее время эти биопротезы приобрели популярность в ведущих клиниках России [6, 7].

Однако проблема инфекционных и тромбоэмболических осложнений остается актуальной и для эпоксиобработанных биопротезов. Одним из пу-

тей решения этой проблемы может являться полифункциональная модификация биоматериала.

Целью настоящего исследования явилась оценка возможности создания нового поколения биопротезов клапанов сердца, резистентных к кальцификации, тромбообразованию и инфекции.

Материал и методы

Методы консервации и модификации биоматериала

Створки аортальных комплексов свиньи, консервированные 0,625% раствором глutarового альдегида («Reanal», Венгрия), служили в качестве контрольной группы образцов.

Вторую и третью группы створок консервировали эпоксидными препаратами, условно названными VK-1 и VK-2 соответственно. Данные препараты представляют собой смеси моно- и полимерных эпоксидов различного состава [1].

Повышения тромбореистентности добивались путем ковалентной иммобилизации гепарина на

биологический материал [1], а препарат СН-1 использовали для придания собственных антибактериальных свойств.

Аминокислотный анализ

Аминокислотный анализ использовали для оценки трансформаций биоматериала, происходящих в процессе консервации.

Аминокислотный состав был определен в нативных, контрольных и опытных образцах створок (по 15 образцов каждого вида). Пробы для анализа готовили следующим способом: отмывку образцов производили в 0,5 л дистиллированной воды при постоянном помешивании в течение одного часа с 3-кратной сменой воды. Образцы всех проб одновременно лиофильно высушивали из замороженного до -60°C состояния при подогреве до $+50^{\circ}\text{C}$ в течение 3 часов. Гидролиз 1,5–2,0 мг высушенных образцов в 0,15–0,2 мл соляной кислоты HCl проводили в запаянных ампулах при 110°C в течение 24 часов. После упаривания соляной кислоты сухой остаток растворяли в 2,5 мл литийцитратного буфера, центрифугировали и проводили анализ супернатанта.

Метод реализован на автоматическом аминокислотном анализаторе модели «CL-5001» («BIOTRONIK», ФРГ). Регистрацию пиков и обработку данных проводили с помощью компьютерного интегратора «CR-3A» («SHIMADZU», Япония).

Для каждой аминокислоты осуществлен расчет относительного содержания ее остатков, приходящихся на 1000 аминокислотных остатков белков исследованного образца.

Оценка накопления кальция створками в модели подкожной имплантации

Эксперименты были выполнены на модели подкожной имплантации створок 75 молодым крысам-самцам линии «Вистар» с массой тела $64,3 \pm 2,5$ г. Каждому животному в асептических условиях имплантировали по три створки, консервированные ГА, ВК-1 и ВК-2. Все эксперименты были выполнены в соответствии с Европейской конвенцией по защите и гуманному обращению с экспериментальными животными (Страсбург, 1986).

225 образцов были удалены через 30, 60 и 90 суток после имплантации. После этого образцы высушивали, взвешивали на аналитических весах «Mettler AB-104» («Mettler Toledo», Швейцария) и гидролизировали в концентрированной хлорной кислоте. Наличие кальция в гидролизате определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (AAS-1, Германия). Содержание кальция в створках рассчитывали на 1 мг сухой ткани.

Физико-механические испытания

Физико-механические испытания проведены в условиях продольного растяжения однотипно приготовленных образцов. Образцы в виде «лопаток» со стандартной длиной рабочего сегмента (L)

(ГОСТ 11262-80) вырезали из биологической ткани с помощью специального ножа (по 15 образцов каждого вида). Эксперименты выполнены на разрывной машине «Instron-1122».

По результатам испытаний рассчитывали следующие показатели: σ – разрушающее напряжение при растяжении ($\text{кг}/\text{см}^2$), E_{max} – максимальное относительное удлинение (%) и h – средняя толщина образца (мм).

Определение количества иммобилизованного гепарина

Количество иммобилизованного гепарина определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности раствора толуидинового синего после взаимодействия с образцами [3]. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре «UV/VIS Ultraspec Plus» («LKB-Pharmacia»).

Метод сканирующей электронной микроскопии

Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) использовали для изучения структуры поверхностей створок, обработанных различными методами, а также для наблюдения адгезированных клеток *St. aureus* на не обработанных и обработанных препаратом СН-1 образцах.

Дегидратацию образцов проводили в серии растворов этилового спирта с возрастающей концентрацией (от 60 до 100%), после чего высушивали в вакууме в течение 24 часов (аппарат для вакуумной сушки «AGL-05»).

Формирование электропроводящего покрытия проводили на вакуумном посту «ВУП-4» (СССР) при помощи приставки для ионного распыления (золота и платины) в диодной системе в инертной среде аргона. Толщина напыления золото-платиновых пленок составила приблизительно 500 нм. Затем образцы помещали в растровый электронный микроскоп «TESLA BS-340» (Чехословакия). Просмотр образцов проводили при 15 кВ.

Метод количественной оценки тромботических масс на образцах после контакта с кровью

Для изучения тромборезистентных свойств биологического материала была разработана методика экспресс-оценки пристеночного тромбообразования *in vitro* применительно к плоским объектам. Образцы одинакового размера инкубировали в условиях постоянного встряхивания в свежей донорской крови (без добавления антикоагулянтов) при температуре 37°C в течение 20, 40 и 60 минут. После этого образцы отмывали от остатков крови дистиллированной водой и высушивали до постоянного веса (m_1), взвешивали на аналитических весах «Mettler AB-104» («Mettler Toledo», Швейцария), отмывали от тромботических масс 0,2% раствором NaOH и вновь высушивали до постоянного веса (m_2).

Количество тромботических масс (P , $\text{мкг}/\text{см}^2$), осевших на образцах створок в различные промежутки времени, рассчитывали по формуле:

$$P = S / (m_1 - m_2),$$

где S – площадь образца.

Оценка антибактериальной активности

Для оценки антибактериальной активности СН-1-обработанных створок был адаптирован метод антибиотических дисков [15]. Из створок специальным ножом вырезали диски диаметром 5 мм. После иммобилизации препарата СН-1 диски отмывали от несвязанного СН-1 и помещали на чашки Петри с питательным агаром, орошенным *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Moraxella*. Учет зон подавления роста микроорганизмов производили по истечении 24 часов.

Изучение антибактериальной активности на модели инкубации в потоке инфицированной крови

Для оценки антибактериальных свойств модифицированного биоматериала была разработана оригинальная модель инкубации образцов в потоке инфицированной крови.

ВК-1- и ВК-2-консервированные образцы биоматериала, не обработанные и обработанные препаратом СН-1, фиксировали на специальных катушках и помещали в герметичную термостатируемую (37 °С) циркуляторную систему, заполненную гепаринизированной (500 000 МЕ/л) свежей донорской кровью. В кровь добавляли суточную взвесь культуры *St. aureus* (исходная концентрация микробных клеток составила 3×10^9 /л). Во время проведения эксперимента в кровь добавляли 25 000 МЕ гепарина с периодичностью в 4 часа. Скорость циркуляции составила 11,4 л/ч, продолжительность инкубации – 24 часа, по окончании кото-

рой концентрация *St. aureus* составила 16×10^{12} /л. Затем в асептических условиях образцы извлекали и дважды промывали стерильным раствором 0,9% NaCl. Часть образцов (n = 12) изучали при помощи сканирующей электронной микроскопии, оставшиеся образцы (n = 36) взвешивали, гомогенизировали и определяли содержание микробных клеток в 1 г биологической ткани методом последовательных разведений [15]. Производили высеv 5–6 последних разведений гомогената на мясопептонный агар. Рост колоний происходил при 37 °С в течение 24 часов.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку проводили с помощью прикладного пакета «STATGRAPHICS» на компьютере «Pentium-166». Рассчитывали значение средней арифметической величины (M), стандартной ошибки ($\pm m$) и критерия Стьюдента (t).

Результаты и обсуждение

Методом аминокислотного анализа установлено, что эпоксидные смеси ВК-1 и ВК-2 обладают лучшими сшивающими свойствами по сравнению с глутаровым альдегидом. Плотность поперечной сшивки при использовании препарата ВК-2 в 2,6 раза, а препарата ВК-1 – в 13 раз выше, чем в контрольных образцах (табл. 1).

Различная сшивающая способность ВК-1 и ВК-2 может быть обусловлена различиями химических компонентов, входящих в препарат, а также стереохимической конфигурацией реакционных групп компонентов по отношению к реакционным группам коллагеновой матрицы.

Известно, что все эпоксидные препараты взаимодействуют с Lys, OHLys, Met и Tуг коллагене-

Таблица 1

Относительное содержание аминокислот в створках ксенониопротезов клапанов сердца на 1000 аминокислотных остатков

Аминокислота	Нативная	ГА	ВК-1	ВК-2
Thr	27,3 ± 0,2	27,6 ± 0,6	23,2 ± 0,5	21,6 ± 0,2
Ser	45,3 ± 0,4	46,7 ± 1,1	39,6 ± 0,4	30,9 ± 0,3
Glu	97,7 ± 0,5	103,0 ± 0,5	88,2 ± 1,2	91,4 ± 0,7
Pro	110,4 ± 1,2	117,6 ± 1,2	110,8 ± 1,8	120,9 ± 4,2
OHPro	25,7 ± 0,5	28,6 ± 0,4	64,8 ± 1,7	54,1 ± 1,1
Gly	238,2 ± 1,2	252,1 ± 4,1	272,7 ± 3,2	277,7 ± 3,7
Ala	124,3 ± 0,9	127,7 ± 0,8	132,2 ± 3,1	136,4 ± 0,7
Val	44,3 ± 0,8	41,9 ± 1,2	37,1 ± 1,4	38,3 ± 0,6
Met	10,7 ± 0,3	10,6 ± 0,2	–	8,5 ± 0,4
Ile	19,9 ± 0,3	20,2 ± 0,3	16,7 ± 0,5	14,7 ± 0,3
Leu	42,4 ± 0,3	42,6 ± 0,6	36,1 ± 0,5	35,6 ± 0,5
Tyr	10,4 ± 0,3	9,4 ± 0,2	1,9 ± 0,5	–
Phe	21,9 ± 0,4	20,9 ± 0,4	19,7 ± 1,4	18,0 ± 0,3
His	12,9 ± 0,2	15,8 ± 0,3	39,2 ± 0,6	50,8 ± 0,6
OHLys	11,0 ± 0,2	1,4 ± 0,2	–	1,2 ± 0,1
Lys	34,0 ± 0,3	3,3 ± 0,2	–	–
Asp	66,5 ± 0,5	70,0 ± 0,5	60,1 ± 0,9	61,8 ± 0,4
Arg	57,1 ± 0,8	63,1 ± 1,2	56,3 ± 1,3	38,1 ± 0,4

новой матрицы [2, 3, 5]. Продукты взаимодействия эпокисоединений с Lys, OH-Lys и Tyr – это химически и биологически стабильные вторичные амины. ГА взаимодействует лишь с двумя аминокислотами – лизином и оксилизином.

Коммерческие препараты глутарового альдегида содержат приблизительно 4% свободного альдегида, 16% моногидрата, 9% дигидрата и 71% циклических гемацеталей (2 изомера), причем как гемацетали, так и свободный альдегид способны к полимеризации. В реакции с первичными аминами Lys, OH-Lys и n-терминальными остатками аминокислот коллагена глутаральдегид, помимо классических оснований Шиффа, образует пиридиниевые поперечные связи, причем этот тип связей является, вероятно, основным. Кроме того, первичные амины в коллагене реагируют с полимерными формами глутаральдегида [19].

Образующиеся структуры содержат несколько активных атомов кислорода, принадлежащих карбонильным группам, которые способны к активному образованию прочных комплексов с ионами кальция. Учитывая, что наиболее стабильны комплексы Ca^{2+} с координационным числом 6–7, в комплексообразовании вовлекаются кислороды, принадлежащие фосфат-иону, в результате чего образуется центр нуклеации кристалла гидроксиапатита [4, 20]. Дальнейший процесс характеризуется лишь количественным нарастанием массы кристалла.

Таким образом, связи, образуемые глутаровым альдегидом и эпокисоединениями, носят принципиально различный характер. Глутаральдегид формирует ригидные гидрофобные связи, которые существенно снижают пластические свойства биоматериала [10]. Напротив, эпокисидные связи обладают значительной гидрофильностью, формируя в биоматериале структуры, подобные гидрогелю [16]. Благодаря этому эпоксиобработанный биоматериал сохраняет естественные пластические свойства, близкие к нативному биоматериалу, и приобретает высокую резистентность к кальцификации. Этот эффект был продемонстрирован ранее для индивидуальных эпокисидных соединений [2, 10, 13, 16].

Полученные результаты свидетельствуют, что эпокисидные препараты ВК-1 и ВК-2 также придают биоматериалу повышенную резистентность к кальцификации. Так, содержание кальция в створках, обработанных этими препаратами, оставалось на метаболическом уровне на протяжении всего периода наблюдения (в срок до 90 суток), в то время как в контрольных образцах отмечали прогрессивное накопление кальция (табл. 2).

Физико-механические характеристики ВК-1- и ВК-2-обработанных створок значительно лучше по сравнению с контролем (табл. 3). Толщина эпоксиобработанных образцов была достоверно ниже ($p < 0,01$), а прочность – достоверно больше ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. Частично это можно объяснить плотностью поперечной сшивки коллагена при консервации препаратами ВК-1 и ВК-2.

Таким образом, на первом этапе настоящего исследования была констатирована более высокая сшивающая активность эпокисидных препаратов ВК-1 и ВК-2, повышенная резистентность образцов к кальцификации и улучшенные физико-механические характеристики биоматериала.

Следующим этапом исследования явился выбор способа модификации для придания биологическому материалу повышенной тромборезистентности и собственной антибактериальной активности.

Наличие свободных эпоксигрупп, не вступивших в реакцию с коллагеном в процессе консервации, предоставляет возможность дополнительной модификации биоматериала биологически активными веществами. Препараты ВК-1 и ВК-2 содержат как мономерные, так и полимерные эпокисидные соединения, в том числе с разветвленной структурой, и некоторые эпоксигруппы в таких молекулах недоступны для связывания с коллагеном. Такие группы могут быть использованы для иммобилизации биологически активных веществ.

Для придания антитромбогенных свойств биоматериалу использовали гепарин. Молекулы гепарина содержат набор различных функциональных групп (карбокисильных, гидроксильных, сульфатных, аминогрупп), способных участвовать в

Таблица 2

Содержание кальция в створках в различные сроки имплантации ($\mu\text{г}/\text{мг}$ сухой ткани)

Консервант	Содержание кальция в створках ($\mu\text{г}/\text{мг}$)		
	30 суток	60 суток	90 суток
ГА	109,73 \pm 13,28	186,4 \pm 15,1	242,31 \pm 19,04
ВК-1	1,63 \pm 0,05	1,93 \pm 0,03	2,51 \pm 0,12
ВК-2	1,58 \pm 0,04	1,85 \pm 0,08	2,46 \pm 0,09

Таблица 3

Физико-механические характеристики биоматериала

Консервант	σ , $\text{кг}/\text{см}^2$	E, %	h, см
ГА	59,2 \pm 4,6	38,7 \pm 1,9	0,059 \pm 0,003
ВК-1	93,5 \pm 8,0	35,9 \pm 1,6	0,041 \pm 0,002
ВК-2	87,7 \pm 4,6	43,4 \pm 1,9	0,045 \pm 0,003

реакциях химических превращений, но при выборе метода иммобилизации необходимо учитывать различную степень ответственности этих групп за антикоагулянтную активность [2]. Поскольку антикоагулянтную активность гепарина обеспечивают сульфо- и, в меньшей степени, карбоксильные группы, в процессе иммобилизации следует использовать гидроксильные и аминогруппы.

Эпоксидные группы вступают в реакцию с карбоксильными, аминными, а также О- и N-сульфогруппами гепарина. Однако, учитывая исходную Na⁺-форму гепарина и то, что при участии О- и N-сульфогрупп образуются метастабильные алкилсульфаты, разлагающиеся с образованием исходных продуктов, а гидроксильные группы наименее активны в реакции нуклеофильного замещения, наиболее вероятным оказывается присоединение по амино- и карбоксильным группам [18].

Эти теоретические предпосылки послужили основой для выбора метода ковалентной иммобилизации гепарина [1]. Данный метод предусматривает связывание антикоагулянта тканью створки. Створки, обработанные препаратом ВК-1, демонстрировали большую связывающую активность: количество иммобилизованного гепарина составило 2632 ± 120 $\mu\text{г}$ на 1 г сухой ткани. Несколь-

ко меньшее количество гепарина (2210 ± 150 $\mu\text{г}/\text{г}$) связывали ВК-2-обработанные створки.

Однако после контакта образцов с кровью было установлено, что процесс тромбообразования проходит активнее на ВК-1-обработанных створках по сравнению с образцами, обработанными препаратом ВК-2 (рис. 1). Иммобилизация гепарина уменьшает тромбогенность биоматериала: к 60-й минуте контакта с кровью образование тромботических масс на створках, модифицированных гепарином, было достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем на негепаринизированных.

Этот эффект может быть связан с изменениями свойств поверхности биоматериала, обработанного различными сшивающими агентами и гепарином. Методом сканирующей электронной микроскопии установлено, что структура поверхности образцов, консервированных глутаровым альдегидом, имеет существенные отличия от эпоксиобработанных поверхностей. ГА-консервированный биоматериал имеет более выраженный рельеф, более «грубую» структуру микрофр с типичными глобулярными образованиями типа «цветной капусты» (рис. 2, а). Поверхность ВК-1- и ВК-2-обработанных створок более упорядочена, макрофры слабо выражены. Поверхность коллагена напоминает правильно упакованные жгуты или ячеистые образования (рис. 2, б и 3, а). Наиболее гладкую поверхность демонстрируют образцы, обработанные препаратом ВК-2 (рис. 3, б).

Ковалентная иммобилизация гепарина оказывает дополнительный сглаживающий эффект на поверхность образцов независимо от того, какой эпоксидный препарат был использован для базовой консервации. Однако первичная трансформация поверхности биоматериала происходит все-таки под влиянием консерванта и является определяющей для формирования рельефа. Ранее было установлено, что для каждого вида биоматериала предпочтительно использовать свой консервирующий агент. Так, для консервации биопротезов кровеносных сосудов из внутренней грудной артерии крупного рогатого скота предпочтительнее использовать диглицидиловый эфир этилен-

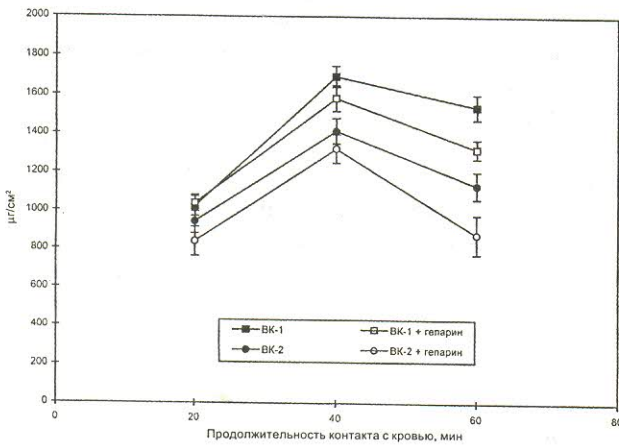


Рис. 1. Количество тромботических масс ($\mu\text{г}/\text{см}^2$) на образцах створок после контакта с кровью. Эффект базовой консервации и дополнительной иммобилизации гепарина.

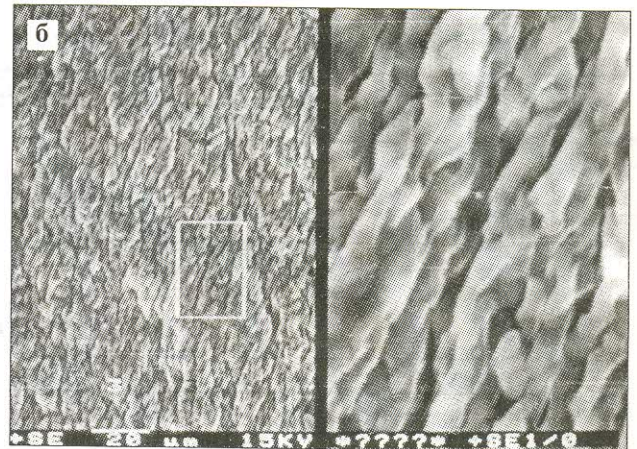
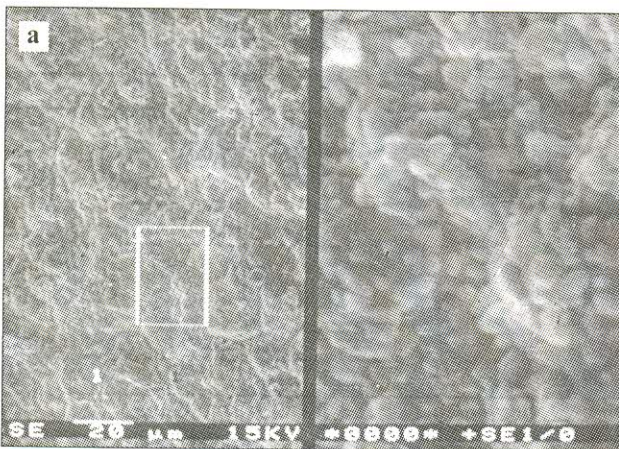


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия. Поверхность створки, консервированной глутаровым альдегидом (а) и препаратом ВК-1 (б). $\times 600$ (левое поле) и $\times 3000$ (правое поле).

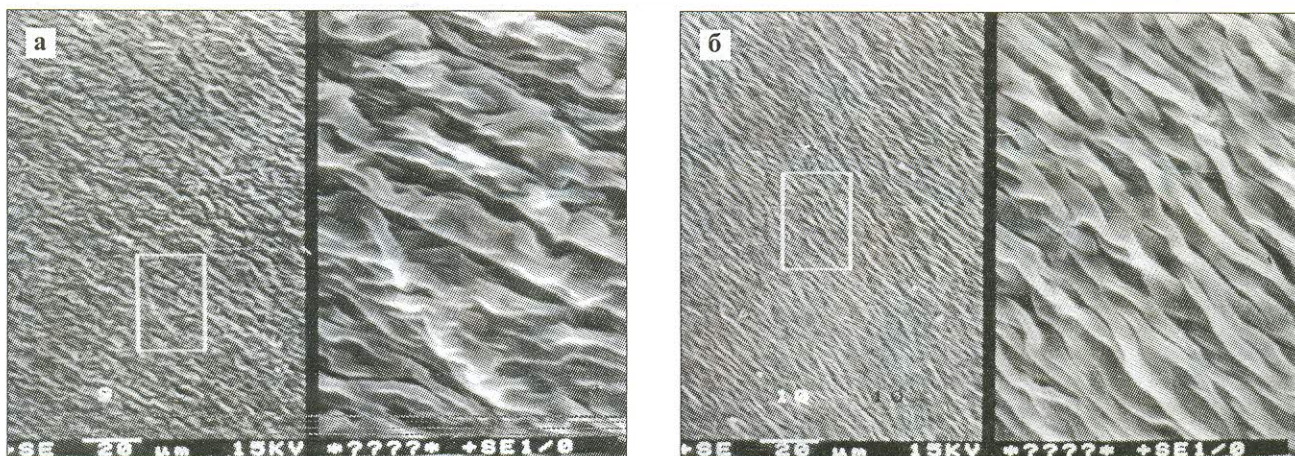


Рис. 3. Сканирующая электронная микроскопия. Поверхность створки, консервированной препаратом ВК-2 (а) и препаратом ВК-2 с дополнительной гепаринизацией (б). $\times 600$ (левое поле) и $\times 3000$ (правое поле).

гликоля, перикард для закрытия септальных дефектов лучше всего консервировать препаратом ВК-1. На основании результатов, приведенных в данной работе, можно заключить, что препарат ВК-2 может быть успешно использован для консервации ксенобиопротезов клапанов сердца. Этот выбор базируется на нескольких критериях, включающих плотность поперечной шивки, физико-механические характеристики и свойства поверхности [3]. Такой подход обусловлен стереохимическими различиями в строении биоматериала, спецификой коллагена и, следовательно, пространственными взаимоотношениями данного белка и сшивающего агента.

Следующим этапом работы явилось исследование антибактериальных свойств биоматериала. Было показано, что благодаря иммобилизации препарата СН-1 створки приобретают антибактериальную активность в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (табл. 4). Максимальный эффект был получен в отношении кокковой микрофлоры: зоны подавления роста составили в сред-

нем 10 мм, минимальный – в отношении *Enterobacter*. Полученные результаты позволяют утверждать, что прочно фиксированный на ткани препарат СН-1 придает антибактериальные свойства биоматериалу. В противоположность этому все исследования последних лет, посвященные разработке кардиоваскулярных биопротезов с антибактериальными свойствами, основаны на выделении антибиотиков или других антибактериальных агентов из «депо» [8, 14].

В дальнейшем антибактериальную активность биоматериала оценивали на модели, имитирующей естественный кровоток.

В циркулирующей крови было отмечено логарифмическое нарастание *St. aureus*. По окончании эксперимента (через 24 часа) количество микробных клеток в 1 мл крови увеличилось в 5300 раз. Это обусловило массивное инфицирование контрольных (немодифицированных) образцов (табл. 5). Содержание микробных клеток на СН-1-обработанных образцах в 175 раз ниже, чем в контроле, что также подтверждается данными СЭМ. На поверхности контрольных образцов обнаружили

Таблица 4

Диаметры зон подавления роста микроорганизмов (мм)

Микроорганизм	ВК-1	ВК-1 ± СН-1	ВК-2	ВК-2 ± СН-1
<i>St. aureus</i>	0	12,94 ± 0,29	0	12,75 ± 0,39
<i>St. epidermidis</i>	0	11,25 ± 0,48	0	11,0 ± 0,41
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	10,0 ± 0,37	0	10,0 ± 0,37
<i>Ps. aeruginosa</i>	0	9,28 ± 0,29	0	9,00 ± 0,54
<i>E. coli</i>	0	10,5 ± 0,25	0	9,75 ± 0,48
<i>Enterobacter</i>	0	8,75 ± 0,25	0	8,75 ± 0,25
<i>Citrobacter</i>	0	9,5 ± 0,29	0	9,5 ± 0,5
<i>Moraxella</i>	0	11,0 ± 0,41	0	11,75 ± 0,48

Таблица 5

Содержание *St. aureus* в биоматериале после инкубации в потоке инфицированной крови (клеток/г ткани)

Консервант	Немодифицированные	СН-1-модифицированные
ВК-1	$7,73 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$
ВК-2	$2,12 \times 10^9$	$1,2 \times 10^8$

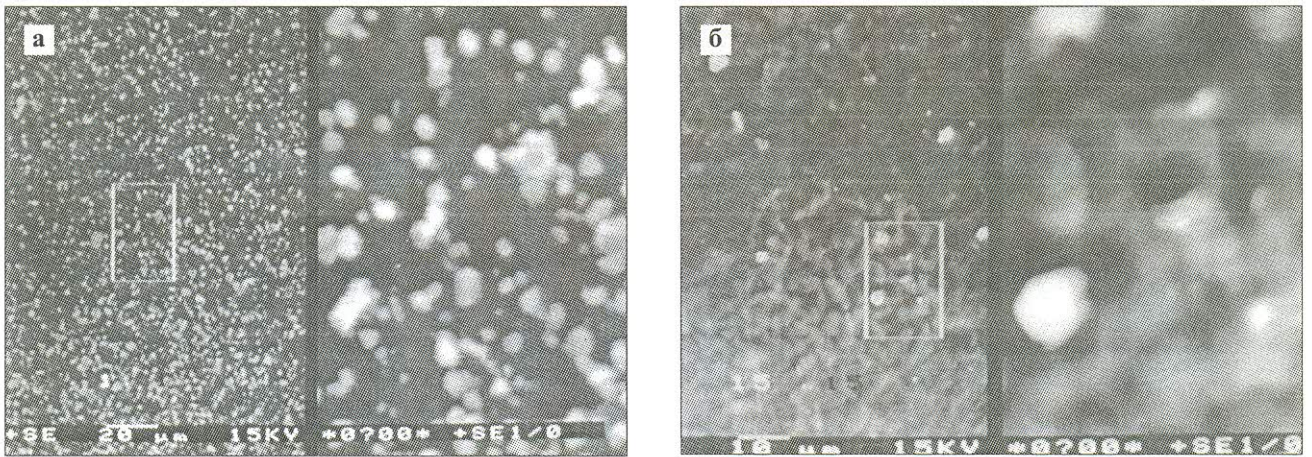


Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия. Поверхность створки после инкубации в инфицированной крови: а – консервация препаратом ВК-2; б – консервация препаратом ВК-2 и дополнительная иммобилизация СН-1. $\times 600$ (левое поле) и $\times 3000$ (правое поле).

множественные колонии и индивидуальные клетки (рис. 4, а). На поверхности СН-1-обработанных образцов наблюдаются единичные колонии, большая часть поверхности остается неконтаминированной и имеет неизмененную структуру (рис. 4, б).

Результаты свидетельствуют о различиях антибактериальных свойств ВК-1- и ВК-2-обработанных модифицированных СН-1 створок, на ВК-2-створках адгезируется достоверно меньше ($p < 0,05$) микробных клеток на 1 г ткани.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания биопротезов с повышенной резистентностью к кальцификации, тромбообразованию и инфекции. Эпоксисоединения могут быть использованы для базовой консервации. Правильно выбранный сшивающий агент придает биоматериалу высокую плотность поперечной шивки и тем самым – улучшенные физико-механические свойства. При этом поверхности придают необходимую структуру, а в дальнейшем рельеф может быть дополнительно сглажен, что немаловажно для получения гемосовместимых биопротезов. Для консервации биопротезов клапанов сердца предпочтительнее использовать эпоксидный препарат ВК-2. Следующей стадией обработки должна быть иммобилизация биологически активных веществ. Для повышения тромборезистентности целесообразно использовать гепарин, а для придания антибактериальных свойств – препарат СН-1.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам Кемеровского кардиологического центра Т.Д. Галиной, Л.Г. Савенковой, И.М. Моисееву, к.б.н. Р.А. Мухамадиярову, к.б.н. И.Л. Гантимуровой за дачу крови на проведение экспериментов.

Литература

1. Барбараш Л.С., Новикова С.П., Журавлева И.Ю. и др. Способ консервирования биоткани для протезирования клапанов сердца и сосудов // Пат. РФ № 2008767 (РФ) – Оpubл. и Б. И. – 1994. – № 5.

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

3. Барбараш Л.С., Криковцов А.С., Журавлева И.Ю. Биологические протезы артерий. – Кемерово, 1996. – 208 с.

4. Журавлева И.Ю., Гантимурова И.Л., Ромашевская Е.И., Кокорин А.И., Барбараш Л.С. Взаимодействие ионов $Cu(II)$ с коллагеновыми ксеноимплантатами, консервированными глутаральдегидом // Биосовместимость. – 1994. – Т. 2. – № 4. – С. 20–26.

5. Журавлева И.Ю., Кузнецов П.В., Гантимурова И.Л., Барбараш Л.С. Диэпоксиды и их производные в консервации биопротезов клапанов сердца // Биосовместимость. – 1994. – Т. 2. – № 1. – С. 13–22.

6. Караськов А.М., Стенин В.Г., Иванов А.А., Ленько Е.В., Грехов Е.В., Тихонова И.И. Применение ксенопротеза «КемКор» у детей с пороками трикуспидального клапана // Тез. II научных чтений, посвященных памяти академика РАМН Е.Н. Мещалкина. – Новосибирск, 2000. – С. 175–176.

7. Семеновский М.Л., Соколов В.В., Морозов А.В. 4-летний опыт использования биопротезов клапанов сердца в митральной позиции // Трансплантология и искусственные органы. – 1996. – № 1. – С. 74–80.

8. Abstracts of papers presented at the Rifampin Bonded Graft European Trial (RBGET) Meeting, 12–13 May, 1995. VASCUTEK, 1995.

9. Burdon T.A., Miller D.C., Oyer P.E., Mitchell R.S., Stinson E.B., Starnes V.A., Shumway N.E. Durability of porcine valves at fifteen years in a representative North American patient population // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1992. – Vol. 103. – № 2. – P. 238–252.

10. Imamura E., Sawatani O., Koyanagi H., Noishiki Y., Miyata T. Epoxy compounds as a new cross-linking agent for porcine aortic leaflets: Subcutaneous implant studies in rats // J. Card. Surg. – 1989. – Vol. 4. – P. 50–57.

11. Jamieson W.R.E., Hayden R.I., Miyagishima R.T., Tutassaura H., Munro A.I., Gerein A.N., Burr L.H., MacNab J., Janusz M.T., Chan F., Ling H., Tyers F.O.

The Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: clinical performance to 15 years // *J. Card. Surg.* – 1991. – Vol. 6. – № 4 (suppl.). – P. 550–556.

12. Lee J.M., Pereira C.A., Kan W.K. Effect of molecular structure of poly (glycidyl ether) reagents on crosslinking and mechanical properties of bovine pericardial xenograft materials // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 981–992.

13. Nojiri C., Noishiki Y., Koyanagi H. Aorta-coronary bypass grafting with heparinized vascular grafts in dogs // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1987. – Vol. 93. – P. 867–877.

14. Phaneuf M.D., Ozaki C.K., Bide M.J., Quist W.C., Alessi J.M., Tannenbaum G.A., LoGerfo F.W. Application of the quinolone antibiotic ciprofloxacin to Dacron utilizing textile dyeing technology // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1993. – Vol. 27. – P. 233–237.

15. Stanier R.Y., Doudoroff M., Adelberg E.A. The microbial world. Prentice-Hall, Inc.: New Jersey, 1970.

16. Tomizawa Y., Noishiki Y., Okoshi T., Miyata T., Koyanagi H. Aortocoronary bypass grafting with hydrophilic small caliber vascular grafts // *ASAIO Trans.* – 1989. – Vol. 35. – P. 199–202.

17. Tu R., Quijano R.C., Lu C.L., Shen S., Wang E., Hata C., Lin D. A preliminary study of the fixation mechanism of collagen reaction with a polyepoxy fixative // *Int. J. Artif. Organs.* – 1993. – Vol. 16. – P. 537–544.

18. Tu R., Lu C.L., Thyagarajan K., Wang E., Nguyen H., Shen S., Hata C., Quijano R.C. Kinetic study of collagen fixation with polyepoxy fixatives // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1993. – Vol. 27. – P. 3–9.

19. Woodroof E.A. The chemistry and biology of aldehyde treated tissue heart valves // *Tissue Heart Valves.* – London–Boston, 1979. – P. 347–362.

20. Wuthier R.E. Calcification of vertebrate hard tissues // H. Sigel, ed. *Metal ions in biological systems.* – New-York–Basel, 1988. – P. 411–472.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ МЗ РФ

НАУЧНО-УЧЕБНЫЙ ЦЕНТР

Лицензия № 16-040 от 21 ноября 1997 года

123182, МОСКВА, УЛ. ЩУКИНСКАЯ, Д. 1, ТЕЛ./ФАКС (095) 193-86-53, ТЕЛ. (095) 196-87-97

Проводит набор слушателей на одно- и двухнедельные хозрасчетные циклы по актуальным проблемам клинической лабораторной диагностики.

- Иммуноферментный анализ
- Методы иммунохимического анализа
- Специфические белки
- Клиническая интерпретация лабораторных тестов
- Иммуноферментный анализ в репродуктивной эндокринологии
- Новые тесты в клинической лабораторной диагностике
- Другие

Обучение проводится на базе лаборатории клинической и экспериментальной биохимии и лабораторного центра «Патохимия крови» в следующих формах: лекции, практические и семинарские занятия, лабораторные работы, семинары по обмену опытом, выездные занятия, стажировка, консультации, тренинг специалистов, методическое обеспечение клинико-лабораторных работ.

Обучение проводится индивидуально либо в малых группах (2–4 человека). Стоимость цикла повышения квалификации (без проживания и стипендиального фонда):

- 1 месяц – 6 000 руб.,
- 1 неделя – 1 500 руб.

По окончании 2-недельного цикла обучения выдается свидетельство о повышении квалификации установленного образца. Оплата по наличному и безналичному расчету после подписания договора.

Куратор циклов по клинической лабораторной диагностике –
к.м.н. Олефиренко Галина Александровна
Тел. (095) 190-53-41