

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ КОНСЕРВИРОВАНИЯ БИОТРАНСПЛАНТАТОВ

Аванесян Р.А., Ивлева А.Д.

¹ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России», Ставрополь, Россия (355000, Ставрополь, ул. Мира, 310), e-mail: stgma@br.ru

Статья посвящена изучению методов консервирования биотрансплантатов и их влияния на органы и ткани с помощью лабораторных экспериментов на животных. Было проведено исследование иммунологической активности гомологичной кожи при воздействии на нее различными химическими и физическими факторами, нашедшими применение при консервировании тканей. Животных (кроликов) сенсibilизировали подкожным введением 1 мл экстракта кожи. Через 15–16 суток им вводили разрешающую дозу того же экстракта в количестве 9–10 мл. Таким способом проведено сравнение воздействия различных консервирующих сред на антигенную активность тканей. По такой же методике проведено сравнение влияния 0,25-, 0,5-, 0,75-, 1-, 1,5- и 3%-ного растворов формальдегида при экспозиции от 12 ч до 10 суток на иммунологическую активность гомологичной кожи. Результаты опытов показали, что изменение иммунологической активности гомологичной кожи при консервировании в растворах формалина слабых концентраций находится в прямо пропорциональной зависимости от процентного содержания формалина и экспозиции в консервирующем растворе. Другие результаты испытаний физических свойств нормальной и консервированной костной ткани показали, что механическая прочность консервированной костной ткани уменьшается, причем это более заметно при использовании в качестве консерванта 0,25%-ного формалина. Полученные данные говорят о необходимости поиска новых технологий консервирования биотрансплантатов для повышения качества заготавливаемых органов и тканей.

Ключевые слова: консервирование, хранение, заготовка, пересадка органов и тканей, биотрансплантат

EXPERIMENTAL LABORATORY STUDY OF METHODS OF PRESERVING BIOTRANSPLANT

Avanesyan R. A., Ivleva A.D.

¹Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia (355000, Stavropol, street Peace, 310), e-mail: stgma@br.ru

The article is devoted to the study of methods of preserving biotransplant and their effects on organs and tissues from laboratory experiments on animals. A study was conducted immunological activity of homologous skin, when exposed to various chemical and physical factors which have found application in the preservation of tissues. Animals (rabbits) were sensitized by subcutaneous injection of 1 ml of the extract of the skin. After 15-16 days they entered the resolving dose of the same extract in the amount of 9-10 ml. Thus a comparison of the effects of different preservative fluids on the antigenic activity of tissues. Using the same methodology a comparison of the effect of 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 and 3% solutions of formaldehyde exposure time from 12 hours to 10 days on the immunological activity of homologous skin. The results of the experiments showed that the change in the immunological activity of homologous skin for canning in solutions of weak formalin concentration is directly proportional to the percentage content of formalin and exposure in the preservative solution. Other test results of physical properties of normal and canned bone tissue showed that the mechanical strength of canned bone tissue decreases, and it is more noticeable when used as a preservative with 0,25% formalin. The findings indicate the need to find new technologies for the preservation of biotransplant to improve the quality of harvested organs and tissues.

Keywords: conservation, storage, harvesting, transplantation of organs and tissues, biotransplant

Трансплантация органов и тканей является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины [3, 5, 7, 12]. Особенно остро на повестке дня стоит вопрос об адаптации пересаживаемых тканей организму реципиента [1, 4, 6, 8]. Главным препятствием на пути создания надежных способов длительной консервации органов (3 суток и более), а также организации банков – хранилищ органов являются биологические проблемы

выживаемости клеток и органов в условиях ишемии, которая действует на донорские органы на всех этапах: в организме донора, при изъятии, консервации, в период трансплантации и даже в раннем посттрансплантационном периоде [2, 9, 10, 11, 13]. Поэтому методы консервации органов и тканей становятся важным разделом трансплантологии и являются вспомогательным мероприятием и этапом трансплантации. Известно, что способы консервирования органов и тканей зависят от вида воздействия на трансплантат.

1. Заместительное консервирование:

- 1) биологическая перфузия;
- 2) нормотермическая аппаратная перфузия.

2. Консервирование, подавляющее обмен веществ:

- 1) охлаждение до температуры, близкой к 0°C , в жидких солевых средах или в других жидкостях без питательных веществ;
- 2) гипотермическая перфузия;
- 3) проточный метод;
- 4) бесперфузионный метод.

3. Охлаждение в твердых средах до температуры близкой к 0°C ;

4. Замораживание при температуре ниже 0°C :

- 1) при температуре от 1°C до -50°C ;
- 2) при температуре от 51°C до -100°C ;
- 3) при температуре от -101°C до -273°C ;
- 4) замораживание с высушиванием (лиофилизация).

5. Комбинированное (заместительное или подавляющее обмен веществ) консервирование:

- 1) гипотермическая перфузия плазмозамещающими растворами;
- 2) гипотермия в сочетании с гипербарической оксигенацией;
- 3) сочетание гипотермии, гипербарической оксигенации, перфузии;
- 4) бесперфузионное охлаждение до температуры, близкой к 0°C , в жидких средах, содержащих кровь, плазму, сахара, АТФ и др. [4, 15, 16].

Значительное место среди различных методов консервирования занимают жидкие консервирующие среды (изотонический и гипертонический растворы хлорида натрия, жидкость Тирода, раствор Тингера—Локка, слабые растворы карболовой кислоты, хлорамина, мертиолата, диоксида, фурацилина, формальдегида, глутаральдегида, этилового спирта). Целесообразность их применения связана с возможностью создания благоприятных условий для консервируемых тканей. Изотоничность, изогидричность, ионно-электролитная уравновешенность – вот те свойства, которые необходимы для сохранения тканей в

физиологически полноценном состоянии [17, 18]. Использование жидких консервирующих сред мы считаем перспективным, потому что подбором составляющих их компонентов можно влиять на генетический код консервируемой ткани, сохранять ее в состоянии анабиоза, «когда жизнь приостанавливается, прерывается более или менее полно...» (П.Ю. Шмидт, 1955) под влиянием различных угнетающих условий, и, наконец, бороться с микробным загрязнением ткани.

Цель исследования

С помощью экспериментально-лабораторных исследований определить характер воздействия различных консервирующих растворов на органы и ткани для оценки эффективности современных методов заготовки биотрансплантатов.

Материал и методы исследования

Основной компонент всех консервирующих растворов и гелей – формалин, так как при использовании формализированных трансплантатов явления тканевой несовместимости устраняются. Исходя из важности этого вывода, было проведено лабораторное исследование иммунологической активности гомологичной кожи при воздействии на нее различными физическими и химическими средствами, нашедшими применение при консервировании тканей. Выбор кожи обусловлен ее активностью в антигенном отношении. Опыты осуществлялись по принятой методике: животных (кроликов) сенсibilизировали подкожным введением 1 мл экстракта кожи. Через 15–16 суток им внутривенно вводили разрешающую дозу того же экстракта в количестве 9–10 мл.

Методика приготовления экстракта: кожу гомогенизируют растиранием с толченым стеклом в ступке до получения абсолютно гомогенной кашицы. Растворимые белки извлекают физиологическим раствором путем прибавления его к гомогенату в отношении 2:1. Затем при непрерывном встряхивании сюда же добавляют эфир до полного насыщения гомогената. Пробирки с гомогенатом центрифугируют в течение 15 мин при охлаждении льдом с поваренной солью. Из трех слоев, образующихся после центрифугирования (эфир, экстракт, осадок), экстракт отсасывают и используют для изучения. Содержание белка в экстракте определялось рефрактометрически и в среднем составляло 1,48–1,54%. Экстракт изготовлен из свежей кожи (контрольная серия), высушенной, хранившейся при 2–4°С в 2%-ном растворе хлорамина, растворе Люголя, 70°- и 96°-ном спиртах и 3%-ном формалине (опытные серии) при экспозиции 12 ч, 1, 3, 5, 10 суток.

Далее, по вышеописанной методике сенсibilизации с последующим введением разрешающей дозы мы изучили влияние 0,25-, 0,5-, 0,75-, 1-, 1,5- и 3%-ного растворов формальдегида при экспозиции от 12 ч до 10 суток на иммунологическую активность гомологичной кожи.

Существующим методам консервирования присуще весьма нежелательное явление – уменьшение запаса прочности костной ткани. Для ответа на вопрос, ухудшаются ли механические свойства кости, консервированной при помощи формалина, предпринято настоящее исследование. Испытывались свежая и консервированная (0,25–0,5%-ные растворы формалина от 1 суток до 6 месяцев) кость. Из консервированной кости выпиливались циркулярные фрагменты длиной 10 мм. Из многих методов объективной оценки механических свойств костной ткани мы остановили свой выбор на изучении прочности сжатию, так как давление является постоянным и самым сильным механическим фактором внешней среды. Прочность на сжатие (δ сж) представляет отношение усилия (Р), вызывающего разрушение ткани, к площади ее поперечного сечения (F). Определение усилия, приводящего к разрушению кости, производилось на приборе, используемом для испытания механической прочности материалов.

Результаты

При введении разрешающей дозы экстракта из консервированной названными способами кожи (за исключением формализированной), независимо от экспозиции, у кроликов развивалась характерная клиническая картина анафилактического шока. Животные погибали через 50–150 с. На вскрытии обнаруживались однотипные изменения: переполнение правой половины сердца венозной кровью, резкая гиперемия печени, венозный застой в органах брюшной полости, спазм мочевого пузыря. Введение экстракта из формализированной кожи не вызывало смерти животных, что свидетельствует об изменении иммунологических свойств такой кожи.

Таблица 1

Воздействие физических и химических факторов на антигенную активность тканей

Фактор	+4°C	3%-ный р-р формалина	2%-ный р-р хлорамина	р-р Люголя	96°-ный спирт	70°-ный спирт	Неконсервированная ткань
Экспозиция	<i>Реакция животного</i>						
1 сутки	смерть	нет	смерть	смерть	смерть	смерть	смерть
3 суток	-	-	-	-	-	-	-
5 суток	-	-	-	-	-	-	-
10 суток	-	-	-	-	-	-	-

У контрольных кроликов уже к концу введения экстракта наблюдалась кратковременная адинамия, атония, затем следовала остановка дыхания на 10–15 с и ослабление сердечных сокращений. В течение 3–4 мин состояние животных постепенно возвращалось к исходному.

Таблица 2

Изменение антигенной активности тканей при консервации их в растворах формалина различных концентраций и при различной экспозиции.

Концентрация	0,25%	0,5%	0,75%	1%	1,5%	3%	Неконсервированная ткань
<i>Экспозиция</i>	<i>Реакция животного</i>						
12 часов	очень сильная	сильная	слабая	очень слабая	очень слабая	нет	смерть
1 сутки	сильная	слабая	очень слабая	очень слабая	нет	-	-
3 суток	слабая	слабая	очень слабая	нет	-	-	-
5 суток	очень слабая	очень слабая	нет	-	-	-	-
10 суток	нет	нет	-	-	-	-	-

Результаты опытов учитывали по степени реакции кроликов на введение разрешающей дозы экстракта.

1. Очень сильная реакция – утрачивались роговичные рефлексy, падал мышечный тонус. В течение 1,5–2 мин после введения разрешающей дозы у кроликов обнаруживались явления адинамии, атонии скелетной мускулатуры при очень редком дыхании и резком ослаблении сердечных сокращений. Восстановление утраченных функций и возврат к исходному состоянию происходил в течение 5–7 мин.

2. Сильная реакция – не отмечались полная адинамия и атония скелетной мускулатуры, сохранялись роговичные рефлексy. Восстановление утраченных функций наступало через 3 мин.

3. Слабая реакция – сохранялись роговичные рефлексy, мышечный тонус. Резкое учащение сердцебиений и дыхания. Возврат к исходному состоянию через 1,5–2 мин.

4. Очень слабая реакция – незначительно учащались сердцебиение и дыхание.

Введение экстракта животным не сопровождалось реакцией при консервировании кожи в 0,25–0,5%-ных растворах формалина на 10-е сутки, при консервировании в 0,75-ном и 1%-ном растворах на 5-е сутки и, наконец, при консервировании в 1,5%-ном растворе на 3-и сутки.

Следовательно, изменение иммунологической активности гомологичной кожи при консервировании в растворах формалина слабых концентраций находится в прямо пропорциональной зависимости от процентного содержания формалина и экспозиции в консервирующем растворе. При испытании прочности на сжатие свежей и консервированной кости получены следующие результаты (табл. 3).

Таблица 3

Механическая прочность консервированной костной ткани при различных концентрациях раствора формалина

Время	% раствора формалина	
	0,25%-ный р-р	0,5%-ный р – р
3 суток	- 8,9–9,0 кг/мм ²	- 8,8–9,1 кг/мм ²
15 суток	- 8,8–9,0 кг/мм ²	- 8,8–9,0 кг/мм ²
1 месяц	- 8,8–8,9 кг/мм ²	- 8,8–9,0 кг/мм ²
2 месяца	- 8,7–9,1 кг/мм ²	- 8,7–8,9 кг/мм ²
3 месяца	- 8,5–8,8 кг/мм ²	- 8,7–8,9 кг/мм ²
4 месяца	- 8,7–8,8 кг/мм ²	- 8,7–8,8 кг/мм ²
5 месяцев	- 8,3–8,5 кг/мм ²	- 8,6–8,7 кг/мм ²
6 месяцев	- 8,0–8,2 кг/мм ²	- 8,5–8,6 кг/мм ²

Как видно, механическая прочность консервированной костной ткани уменьшается, причем снижение прочности на сжатие более заметно при использовании в качестве консерванта 0,25%-ного раствора формалина.

Заключение

Существующие методы консервации трансплантатов не позволяют сохранить все остеоиндуктивные мио-, нео- и реваскуляризирующие свойства тканей, сохранить жизнеспособность клеток на протяжении всего срока консервации и тем самым исключить отторжение трансплантата от органа реципиента. Необходимо создание для консервируемых тканей условий, близких к нормальной жизнедеятельности организма. В связи с этим возникает необходимость поиска новой технологии стерилизации, консервации и транспортировки свободных кожно-мышечных, нервных, хрящевых, костных реваскуляризируемых трансплантатов, которая будет позволять заготавливать органы и ткани, создавать запасы трансплантатов в банке трансплантированных тканей для использования их по мере необходимости, производить обмен трансплантатами между различными медицинскими учреждениями, находящимися за многие сотни километров от места получения трансплантата.

Список литературы

1. Григорьянц Л.А. Показания и эффективность использования различных хирургических вмешательств при лечении больных с одонтогенным гайморитом, вызванным выведением пломбировочного материала в верхнечелюстной синус / Григорьянц Л.А., Сирак С.В., Зекерьяев Р.С., Арутюнян К.Э. // Стоматология. 2007. — Т. 86. — № 3. — С. 42–46.

2. Григорьянц Л.А. Использование препарата Цифран СТ в хирургической стоматологии для лечения и профилактики послеоперационных воспалительных осложнений / Григорьянц Л.А., Герчиков Л.Н., Бадалян В.А., Сирак С.В., Григорьянц А.Г. // Стоматология для всех. — 2006. — № 2. — С. 14–16.
3. Григорьянц А.А. Разработка и клиническое применение нового ранозаживляющего средства для лечения заболеваний слизистой оболочки полости рта у детей и подростков / Григорьянц А.А., Сирак С.В., Сирак А.Г., Ханова С.А. // Современные проблемы науки и образования. — 2013. — № 2. — С. 41.
4. Слетов А.А. Экспериментальное определение регенераторного потенциала клеток костного мозга / Слетов А.А., Переверзев Р.В., Ибрагимов И.М., Кодзоков Б.А., Сирак С.В. // Стоматология для всех. — 2012. — № 2. — С. 29–31.
5. Сирак С.В. Клинико-анатомическое обоснование лечения и профилактики травм нижнеальвеолярного нерва, вызванных выведением пломбировочного материала в нижнечелюстной канал / Сирак С.В.: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии». М., 2006.
6. Сирак С.В. Изучение особенностей анатомо-топографического строения нижней челюсти для планирования эндодонтического и имплантологического лечения / Сирак С.В., Долгалев А.А., Слетов А.А., Михайленко А.А. // Институт стоматологии. — 2008. — Т. 2. — № 39. — С. 84–87.
7. Сирак С.В. Использование поликомпонентной адгезивной мази в сочетании с иммуномодулирующим препаратом в комплексной терапии пузырчатки / Сирак С.В., Копылова И.А., Чеботарев В.В., Аль-асфари Ф.М.С. // Пародонтология. — 2012. — Т. 17. — № 2. — С. 62–65.
8. Сирак С.В. Опыт использования местных ранозаживляющих средств при лечении вульгарной пузырчатки с локализацией на слизистой оболочке полости рта и губах / С.В. Сирак, В.В. Чеботарев, А.Г. Сирак, А.А. Григорьянц // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2013. — Т. 8. — № 1. — С. 59–62.
9. Сирак С.В. Влияние пористого титана на остеогенный потенциал клеток костного мозга *in vitro* / Сирак С.В., Слетов А.А., Ибрагимов И.М., Кодзоков Б.А. // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2012. — Т. 27. — № 3. — С. 22–25.
10. Сирак С.В. Оценка риска осложнений эндодонтических манипуляций на основе показателей анатомо-топографического строения нижней челюсти / Сирак С.В., Коробкеев А.А., Шаповалова И.А., Михайленко А.А. // Эндодонтия Today. — 2008. — № 2. — С. 55–60.

11. Сирак С.В. Стоматологическая заболеваемость детского населения ставропольского края до и после внедрения программы профилактики/Сирак С.В., Шаповалова И.А., Максимова Е.М., Пригодин С.Н. // Стоматология детского возраста и профилактика. — 2009. — Т. 8. — № 1. — С. 64–66.
12. Сирак А.Г. Морфофункциональные изменения в пульпе зубов экспериментальных животных при лечении глубокого кариеса и острого очагового пульпита с использованием разработанных лекарственных композиций / Сирак А.Г., Сирак С.В. // Современные проблемы науки и образования. — 2013. — № 2. С. 44.
13. Mikhalchenko D.V. Influence of transcranial electrostimulation on the osseointegration of dental implant in the experiment/Mikhalchenko D.V., Poroshin A.V., Mikhalchenko V.F., Firsova I.V., Sirak S.V.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. — 2014. — Т. 5. — № 5. — С. 705–711.
14. Grimm W.D. Complex, three-dimensional reconstruction of critical size defects following delayed implant placement using stem cell-containing subepithelial connective tissue graft and allogenic human bone blocks for horizontal alveolar bone augmentation:a case report as proof of clinical study principles/Grimm Dr.W.D., Plöger Dr.M., Schau Dr.I., Vukovic Dr.M.A., Shchetinin E., Akkalaev A.B., Avanesian R.A., Sirak S.V.//Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2014. — Т. 9. — № 2 (34). — С. 131–133.
15. Grimm W.D. Prefabricated 3d allogenic bone block in conjunction with stem cell-containing subepithelial connective tissue graft for horizontal alveolar bone augmentation:a case report as proof of clinical study principleS/Grimm W.D., Plöger M., Schau I., Vukovic M.A., Shchetinin E., Akkalaev A.B., Arutyunov A.V., Sirak S.V.//Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2014. — Т. 9. — № 2 (34). — С. 175–178.
16. Sirak S.V. Clinical and morphological substantiation of treatment of odontogenic cysts of the maxilla/Sirak S.V., Arutyunov A.V., Shchetinin E.V., Sirak A.G., Akkalaev A.B., Mikhalchenko D.V.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. — 2014. — Т. 5. — № 5. С. — 682–690.
17. Sirak S.V. Microbiocenosis of oral cavity in patients with dental implants and overdentures/Sirak S.V., Avanesyan R.A., Akkalaev A.B., Demurova M.K., Dyagtyar E.A., Sirak A.G.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. — 2014. — Т. 5. — № 5. — С. 698–704.
18. Sirak S.V. Social composition and motivation of patients in applying for implant dental service/Sirak S.V., Avanesyan R.A., Sirak A.G., Shchetinin E.V., Demurova M.K.//Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. — 2014. — Т. 5. — № 5. — С. 691–697.

Рецензенты:

Слетов А.А., д.м.н., профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ставрополь;

Калиниченко А.А., д.м.н., главный врач клиники «Фитодент», г. Михайловск.