

Некоммерческое акционерное общество
«Медицинский университет Караганды»

УДК 617.55-089-844-007.43

На правах рукописи

БРИЗИЦКАЯ ЛЮБОВЬ ВЯЧЕСЛАВОВНА

**Сравнительный анализ биосовместимости децеллюляризованной
ксеногенной брюшины и ацеллюлярного дермального коллагена
«Permacol» при пластике дефектов передней брюшной стенки
(экспериментальная работа)**

6D110100 – «Медицина»

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Научные консультанты:

кандидат медицинских наук, профессор
Нуркаси Тулепбергенович Абагов, кафедра
хирургических болезней НАО «МУК»

кандидат медицинских наук, исследователь
Людмила Леонидовна Ахмалтдинова,
НАО «ННКЦ»

Зарубежный научный консультант:

M.D, PhD, Professor Yoshihiro Noso,
Hiroshima International University, Hiroshima,
Japan

Республика Казахстан
Караганда, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	3
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Сетчатые имплантаты в хирургии грыж передней брюшной стенки	10
1.2.1 Биологические импланты животного происхождения	13
1.2.2 Биологические импланты на основе донорских тканей	15
1.2.3 Биологические импланты на основе ксеногенной брюшины	17
1.3 Иммунологическая биосовместимость эндопротеза как критерий успешной имплантации	20
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1 Дизайн исследования	32
2.2 Биоэтические аспекты эксперимента	35
2.3 Материалы исследования	35
2.4 Анестезия лабораторных животных	36
2.5 Первичная сенсibilизация экспериментального животного	36
2.6 Забор крови у лабораторных животных	38
2.7 Метод выявления антигенных свойств	39
2.8 Биохимические и иммунологические методы анализа	44
2.8.1 Определение уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови крыс	45
2.8.2 Определение иммунологических маркеров в сыворотке крови крыс	45
2.8.3 Определение внеклеточных нуклеиновых кислот в сыворотки крови крыс	46
2.8.4 Определение гистоноподобных белков в сыворотке крови крыс	46
2.9 Методы статистической обработки данных	47
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
3.1 Оценка общего состояния лабораторных животных после имплантации биологических материалов	48
3.2 Результаты оценки сенсibilизирующих свойств биологических материалов	48
3.3 Результаты определения содержания циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови	52
3.4 Результаты определения иммунологических маркеров воспаления в сыворотке крови	53
3.5 Результаты исследования гистоноподобных белков и внеклеточных нуклеиновых кислот в сыворотке крови	55
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	59
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	67
ПРИЛОЖЕНИЯ	81

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

Закон Республики Казахстан «О науке» от принят 18 февраля 2011 года, №407-IV ЗРК;

ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;

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

Положение о диссертационном совете НАО «МУК» от 16.08.2021 (версия 1);

Правила присуждения ученых степеней, утвержденные приказом МОН РК от 31 марта 2011 года № 127;

Заключение этической комиссии КГМУ №18 от 16.05.2019г;

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

Правила управления медико-биологических экспериментов, доклинических и клинических исследований, а также требований к доклиническим и клиническим базам. Приказ МЗ РК от 2 апреля 2018 г. №142;

Руководство Американской Ветеринарной Медицинской Ассоциации по эвтаназии животных: “AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2019 Edition”.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

FBR – (foreign body reaction) реакция на инородное тело
G-CSF – гранулоцит колонии стимулирующий фактор
GM-CSF – гранулоцит/макрофаг колонии стимулирующий фактор
IL – интерлейкин
MMPs – матриксная металлопротеиназа
PDGF – тромбоцитарный фактор роста
PGA – полигликолевая кислота
PLA – полилактогликолевая кислота
PP – полипропилен
PTFE – политетрафторэтилен
TGF- β – трансформирующий фактор роста-бета
TNF- α – (ФНО) фактор некроза опухоли
ВКМ – внеклеточный матрикс
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
КРС – крупный рогатый скот
ПАФ – полный адъювант Фрейнда
ПИ – повидон-йод
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭГ – полиэтиленгликоль
РНК – рибонуклеиновая кислота
СРБ – С-реактивный белок
ТИК – тканеинженерные конструкции
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЦИК – циркулирующий иммунный комплекс
ИЛ – интерлейкин
вкНК- внеклеточные нуклеиновые кислоты
вкДНК- внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота
вкРНК- внеклеточная рибонуклеиновая кислота
КРФ НК- кислоторастворимая фракция нуклеиновых кислот

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Эндопротезы для пластики грыж передней брюшной стенки в своей эволюции претерпели значительные изменения, расширив арсенал от однослойных полипропиленовых сеток до композитных сетчатых протезов, 3D имплантатов с памятью формы, и биологических материалов, аллогенного и ксеногенного происхождения. Несмотря на постоянное совершенствование хирургической техники, свойства эндопротеза и технологии их изготовления, по-прежнему остается проблема осложнений в отдаленные послеоперационные периоды наблюдения, в том числе количество рецидивов и необходимость повторных операций, не привели к желаемым результатам с течением времени [1]. Более того, анализ литературных данных приводит сведения о том, что риск развития местных осложнений со стороны раны, такие как инфицирование, нагноение, формирование сером в разы выше после грыжесечения с использованием эндопротеза, чем при других чистых общехирургических вмешательствах [2-4].

Хирургическая потребность в имплантате, отвечающем всем современным требованиям, непрерывно побуждает к поиску и разработке новых пластических материалов, которые бы обладали способностью ремоделировать нативные ткани реципиента без развития выраженного иммунологического ответа и хронического воспаления. Данная концепция привела к разработке и изучению имплантатов биологического происхождения. Благодаря технологиям тканевой инженерии биологические материалы изготавливаются из донорского материала человека (аллографт) или животного (ксенографт свиньи, бычий) и представляют собой внеклеточный матрикс (ВКМ) [5-7]. Известно, что коллаген, как основной компонент внеклеточного матрикса, помимо каркасной функции, опосредованно выступает медиатором миграции и адгезии клеток, а также последующей васкуляризации и образования соединительной ткани [8]. Благодаря своему потенциалу регенерации тканей он используется в различных биомедицинских прикладных областях, в том числе хирургии [9]. Однако, помимо желаемого эффекта, данные материалы вызывают различной степени выраженности местную и общую воспалительную реакцию после имплантации. Наличие инородного материала в организме реципиента, в частности в передней брюшной стенке, вызывает ряд событий, динамика и интенсивность которых, зависят от индивидуальной реакции пациента и выполненного оперативного вмешательства. В рамках репаративного процесса возникает воспалительная реакция, направленная на восстановление поврежденного участка и инкапсуляцию чужеродного биоматериала для отделения его от окружающей ткани [10]. В этом сложном и организованном во времени процессе, любой дисбаланс или несоответствие в процессах заживления или в функциях вовлеченных клеток из-за присутствия или деградации биоматериала может вызвать неожиданные

реакции ткани хозяина, которые могут привести к клиническим осложнениям и отторжению имплантата [11]. Биологические материалы имеют большой потенциал в реконструктивной хирургии живота, так как их применение может позволить снизить иммунный и воспалительный ответ на имплантацию, а также обладая резистентностью к инфекционному агенту, позволит уменьшить риски развития осложнений [12].

Одним из ведущих представителей в мировой практике абдоминальной хирургии является ацеллюлярный дермальный коллаген Permacol, одобренный управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в марте 2005 г, который широко используется в качестве каркаса для реконструкции дефектов передней брюшной стенки и при грыжах различной локализации в мировой практике [13].

Обзор литературных данных показал наибольшее количество описанных исследований в клинической практике с использованием Permacol, что свидетельствует о высоких характеристиках со стороны биосовместимости. Этот имплантат биологического происхождения имеет самую низкую частоту рецидивов и повреждения со стороны агрессивности иммунной системы реципиента в течение 2 лет, а так же обладает высокой бактериальной резистентностью [14,15].

Несмотря на то, что Permacol занимает серьезную позицию в краткосрочном лечении различных дефектов передней брюшной стенки, имеются немногочисленные данные, о рецидивах грыжевых дефектов и спайкообразованиях с внутренними органами после имплантации.

Отсутствие долгосрочных наблюдений, высокая стоимость имплантата, а также недоступность на рынке Республики Казахстан биоматериалов требуют поиск новых альтернативных материалов в хирургической практике [16-19].

Развитие и смена фаз репаративного процесса отражает важность количественной и качественной характеристики провоспалительных агентов зоны имплантации для возможной оценки успешной имплантации исследуемого биологического материала. Разработанный научным коллективом Медицинского университета Караганды и Национального центра Биотехнологий (г. Астана), новый пластический материал для замещения дефектов передней брюшной стенки, представляет собой внеклеточный матрикс ксенобрюшины, полученный из париетальной бычьей брюшины, путем двойного цикла децеллюляризации и стерилизации гамма-излучением [20]. Учитывая, что выделение внеклеточного матрикса из тканей донора связано с процессами обесклеточивания, важным вопросом является полное удаление клеток из матрикса с сохранением ультраструктуры коллагеновых и эластиновых фибрилл. Не полное обесклеточивание с сохранением белковых фрагментов на матриксе может привести к негативным последствиям после имплантации, развитию отторжения имплантата. На сегодняшний день отсутствуют

экспериментальные работы по изучению сенсibiliзирующих и иммуногенных свойств внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки, что определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования: Комплексный анализ биосовместимости децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в сравнении с ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol» у крыс после применения материалов

Задачи исследования:

1. Оценить антигенные свойства децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена у крыс.
2. Сравнить динамику системного воспалительного ответа по уровню ИЛ-2, С-реактивного белка, ФНО- α и ЦИК у крыс после эндопротезирования децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена.
3. Определить уровень внеклеточных нуклеиновых кислот и гистонopodobных белков для выявления возможного повреждения тканей в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в сравнении с ацеллюлярным дермальным коллагеном у крыс после эндопротезирования.

Научная новизна:

1. Впервые в экспериментальных условиях проведена оценка сенсibiliзирующих свойств после эндопротезирования децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины.
2. Впервые изучена динамика воспалительных цитокинов в крови у крыс после эндопротезирования децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины.
3. Впервые были исследованы фракции гистонopodobных белков и внеклеточных нуклеиновых белков у крыс после эндопротезирования децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины.
4. Проведена сравнительная оценка биосовместимости нового эндопротеза- децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol» с учетом исследования антигенной и иммунологической толерантности.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Использование внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки в эксперименте не вызывает сенсibiliзации и последующих реакций гиперчувствительности «немедленного» и «замедленного» типа в эксперименте *in vivo*;

- Использование внеклеточного матрикса ксенобрюшины вызывает физиологический, сопоставимый с материалом сравнения, системный воспалительный ответ (по уровню СРБ, ФНО, ИЛ-2 и сывороточных

иммунных комплексов), который нормализуется в процессе послеоперационного периода.

- Использование внеклеточного матрикса ксенобрюшины демонстрирует сопоставимый с материалом сравнения эффект на обмен нуклеиновых кислот, отсутствие признаков повреждения тканей и хронизации продуктов распада в крови.

Практическая значимость

Проведенные в диссертационной работе исследования расширяют имеющиеся представления об использовании биологических материалов для пластики дефектов передней брюшной стенки, а именно изучены сенсibiliзирующие свойства и иммунологическая толерантность внеклеточного матрикса ксенобрюшины. Полученные в ходе настоящей работы результаты дополняют имеющуюся научную базу экспериментального изучения внеклеточного матрикса ксенобрюшины в рамках доклинической оценки безопасности имплантата.

Личный вклад автора

Диссертантом совместно с научным руководителем Абатовым Н.Т и научным коллективом смоделирован дефект передней брюшной стенки с целью дальнейшей имплантации исследуемого биоматериала.

Самостоятельно реализовано экспериментальное исследование на 146 лабораторных животных по изучению сенсibiliзирующих свойств и оценке иммунологической толерантности внеклеточного матрикса ксенобрюшины, проведены пробы выявления ранней и поздней реакции гиперчувствительности. Соискателем самостоятельно проведен забор крови в пробирки у экспериментальных животных и последующее выведение их из эксперимента. Под руководством научного руководителя к.м.н., исследователя НАО «ННКЦ» Ахмалтдиновой Л.Л. проведены лабораторные исследования полученных в эксперименте образцов крови экспериментальных животных после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины на базе лаборатории коллективного пользования НАО МУК. Самостоятельно автором сделан анализ и интерпретация полученных результатов, выполнена статистическая обработка данных.

Диссертационная работа выполнялась в рамках научно-исследовательской работы по грантовому финансированию МОН РК № государственной регистрации 0115PK00305 по теме: «Разработка и применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки», соискатель являлся ассистентом ответственного исполнителя НИР, в рамках которого выполнялась диссертационная работа.

Весь материал систематизирован, документирован и оформлен в виде диссертационной работы лично соискателем.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены: на международном зарубежном конгрессе «55th Congress of the European

Society for Surgical Research» (г.Инсбрук, Австрия, 2020г.), на международной 67-ой научно-практической конференции «Медицинская наука XXI века-взгляд в будущее» (г.Душанбе, Таджикистан, 2019г.), на заседании кафедры хирургических болезней (протокол № 9, от 24.04.2023г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 научных работ, из них: 3 в научных изданиях рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК; 1 публикация в международном научном издании «Bulletin of Experimental Biology and Medicine», индексируемом в информационной базе Scopus (наивысший процентиль 35%).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 85 страницах компьютерного набора текстового редактора Microsoft Word. Структурными элементами диссертации являются: введение, 3 раздела основной части, заключение и список использованных источников. Диссертация иллюстрирована 16 рисунками и 11 таблицами. Список литературы включает в себя 187 источника на русском и английском языках.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Сетчатые имплантаты в хирургии грыж передней брюшной стенки

Оперативные вмешательства по поводу грыж передней брюшной стенки составляют подавляющее большинство среди операций плановой хирургии, как в Казахстане, так и за рубежом, и согласно различным литературным данным занимают от 8% до 24% всех операций в абдоминальной хирургии. Отдельное внимание на себя обращают рецидивные и рецидивирующие грыжи, грыжи с множественными и геометрически сложными дефектами передней брюшной стенки, комбинированные грыжи. Данная проблема должна рассматриваться как одна из важнейших социально-экономических задач общественного здоровья ввиду нарастающего числа носителей сложных грыж среди лиц трудоспособного населения, сравнительно низкой эффективности шаблонных методик грыжесечения, большого процента местных и общих послеоперационных осложнений, рецидивов, порой инвалидизации, ограничения и/или утраты работоспособности [21-23].

Требования к «идеальному имплантату» были описаны еще в середине прошлого столетия, и регулярно дополнялись согласно накапливаемым знаниям по данной проблеме [24,25] Были сформулированы следующие параметры:

- устойчивость к химическим агентам
- доступная стерилизация
- достаточная механическая прочность
- отсутствие канцерогенов
- способность ограничивать реакцию инородного тела
- возможность изготавливать в требуемой форме и размере
- бактериальная резистентность

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования в поисках эндопротеза, отвечающего вышеуказанным требованиям, до сих пор не привели к созданию «идеального имплантата», данный вопрос по-прежнему остается «святым Граалем» медицинской промышленности. В настоящее время в хирургии грыж передней брюшной стенки применяют следующие типы эндопротезов:

- 1) Стандартные нерассасывающиеся синтетические эндопротезы;
- 2) Композитные синтетические материалы;
- 3) Биологические имплантаты.

Первые 2 вида материалов, благодаря низкой стоимости, относительной простоте производства и доступности получили широкое распространение в хирургической практике.

Стандартные синтетические эндопротезы на сегодняшний день являются наиболее распространёнными материалами, применяемыми в герниологии. Данные имплантаты были разработаны в 50-х годах XX столетия, и с тех пор накоплен огромный опыт их применения в

хирургической коррекции грыж передней брюшной стенки. К данной группе сетчатых имплантатов относятся: полипропилен (PP), полиэфир и политетрафторэтилен (PTFE).

Эндопротезы из полипропилена, благодаря своей прочности, низкой стоимости и накопленному достаточному хирургическому опыту безопасного применения данных материалов, являются наиболее часто используемыми имплантатами при герниопластике [26]. Полипропилен получают путем полимеризации пропилена, производного пропана. Это гидрофобный полимер, устойчивый к воздействию ферментов, который изготавливается в форме моноволоконной сетки. Данный тип эндопротеза вызывает интенсивную периимплантационную фиброзную реакцию, что приводит к образованию грубого соединительнотканного рубца, склонному к рецидиву грыжи. Более того, процесс фиброобразования приводит к значительному уменьшению площади сетки «shrinkage» (по данным ряда авторов до 30%), а порой и к рецидиву грыжевого дефекта. Также, полипропилен подвержен окислительному стрессу и последующему повреждению филамента – явление, изредка наблюдаемое при микроскопии, приводящее к снижению механической прочности протеза [27].

На сегодняшний день PP сетки делят на 2 категории: тяжелые и легкие, однако, строгое разграничение их остается проблематичным [28]. Изначально, критерием деления была масса сетки. Имплантаты свыше 80 гр/м² было принято считать тяжелыми, остальные описаны как легкий вес. Позже было установлено, что свойства эндопротеза зависят не только от веса, но также от структуры сетки, ее упругости, податливости, и размера пор. Согласно этим критериям термин «тяжелые сетки» приписывается к жестким, неэластичным имплантатам с малыми размерами пор в 1 мм. Механическая прочность таких эндопротезов значительно превышает физиологические потребности (примерно 16 Н/см) [29]. Тяжелый вес сеток вызывает чрезмерную реакцию пролиферации тканей, процессов фиброобразования зоны имплантации. Это приводит к снижению эластичности передней брюшной стенки, ощущению инородного тела и, в некоторых случаях, хронической послеоперационной боли. Сетки с легким весом имеют большие по диаметру поры более 1 мм. Они достаточно хорошо приживаются и вызывают меньше постимплантационных реакций в сравнении со стандартными тяжеловесными имплантатами. Механическая прочность при растяжении близка к физиологической, эластичность выше, чем у стандартных эндопротезов (удлинение на 25-30% при физиологическом стрессе). Жесткость брюшной стенки после герниопластики с использованием легких имплантатов менее выражена, ощущение инородного тела, и риск развития хронической послеоперационной боли снижаются. Имеются данные от пациентов, свидетельствующие о снижении болевого синдрома, уменьшении потребления анальгетиков в раннем послеоперационном периоде, ранней активизации и возвращении трудоспособности [30]. Однако легковесные

эндопротезы не лишены недостатков. Имеются литературные данные о снижении механической прочности имплантата в послеоперационном периоде, явления миграции и, как следствие, рецидив грыжи [31]. Также было проведено и опубликовано ряд исследований, связывающих использование полипропиленовых эндопротезов для пластики паховых грыж с послеоперационным снижением мужской фертильности и увеличением перитонеальных спаек после операции [32].

Другим синтетическим имплантатом, широко применяемом в хирургической коррекции грыж передней брюшной стенки, является полиэстер (химическое название – полиэтилентерефталат), синтезирован через реакцию поликонденсации своих мономеров (BIS- β -hydroxyterephthalate). Данный полимер более биостабилен чем полипропилен и менее уязвим к оксидативному стрессу чем и PP и PTFE [33]. Полиэстер производится в виде мультифиламентной, гидрофильной сетки, которая легко адаптируется к естественной кривизне брюшной стенки. Данный вид имплантатов индуцирует значительные фиброзные реакции окружающих тканей, что облегчает стабильную фиксацию эндопротеза после имплантации в переднюю брюшную стенку. При сравнении с полипропиленовой сеткой, данный материал обладает лучшей гибкостью, что делает процедуру имплантации проще. Полиэстер менее подвержен к послеоперационному сморщиванию, которое достаточно выражено после имплантации полипропилена. Однако, как и с PP, внутрибрюшинное использование противопоказано, так как вызывает брюшинные спайки, пролежни, кишечные свищи [34]. Также ряд исследований свидетельствует о слабой сопротивляемости данного вида эндопротезов к инфекции [35].

Политетрафторэтилен (PTFE) представляет собой синтетический полимер, полученный в процессе полимеризации тетрафторэтилена. PTFE является гидрофобным: ни вода, ни водосодержащие вещества не проникают в PTFE, поскольку фторуглероды демонстрируют снижение дисперсионных сил из-за высокой электроотрицательности фтора. Это свойство определяет устойчивость имплантатов из PTFE к образованию спаек с органами брюшной полости [36]. Волокна эндопротеза PTFE плотно уложены (поры менее 75 нм), поэтому они считаются микропорными имплантатами, которые инкапсулируются, нежели прорастают фибробластами после имплантации. Благодаря специфическим антиадгезионным свойствам, PTFE может применяться интраабдоминально, при внутрибрюшинных техниках герниопластики. Однако, в течение процесса заживления соединительная ткань образует фиброзную волокнистую капсулу вокруг имплантата, вызывая деформацию протеза [37]. Это может привести к нарушению функционирования имплантата и увеличению риска развития рецидивов, которая может достигать 20% после пластики вентральных грыж [38]. Серьезным недостатком сеток PTFE является их относительная восприимчивость к инфекции. В ряде исследований сообщалось о низкой

резистентности PTFE к бактериальному агенту, что приводил к более 10% случаев инфекций, связанных с имплантатом [39].

Использование вышеописанных стандартных хирургических синтетических имплантатов для пластики грыж передней брюшной стенки в потенциально контаминированном операционном поле сопряжено с высоким риском развития инфекции, локальных гнойных или генерализованных септических осложнений, и даже летальным исходом. Кроме того, полипропиленовые и полиэфирные сетки, имплантируемые в брюшную полость, подвержены образованию висцеральных спаек, что впоследствии может привести к кишечной непроходимости или кишечному свищу.

Непрерывный поиск наиболее безопасного и эффективного имплантата для герниопластики привел к изучению и применению многочисленных материалов с модифицированными свойствами для достижения лучших результатов, к которым можно отнести рассасывающиеся (абсорбируемые) и/или частично рассасывающиеся эндопротезы.

Основным компонентом абсорбируемых синтетических имплантатов является полимер полигликолевой кислоты (PGA) (Dexon), иногда используемый в качестве сополимера с полиакриловой кислотой (PLA) (полилактогликолевая кислота) (Vicryl, Polyglactin 910). Синтезируется в процессе поликонденсации или полимеризации (последний способ дает форму с более высокой молекулярной массой и преимущественно используется). PGA характеризуется гидролитической неустойчивостью из-за наличия сложноэфирной связи в ее основе. Он производится в виде плетеной сетки, которая полностью рассасывается в течение от 90 до 180 дней. Имплантаты PGA гибки, легко соответствуют требуемой кривизне, улучшены характеристики для имплантации. Они используются для временного закрытия дефектов передней брюшной стенки, например, травма, хирургические осложнения, множественные лапаротомии, компартмент синдром [40, 41]. Такая стратегия позволяет избежать ведения «открытого живота» и имеет ряд преимуществ: снижает риск развития осложнений в брюшной полости и кишечных свищей, уменьшает ригидность краев раны, что осложняет закрытие передней брюшной стенки [42]. Еще одной отличительной особенностью абсорбируемых сеток, в отличие от нерассасывающихся материалов, является то, что они не требуют извлечения в случае инфицирования. Однако, остается вопрос высокой стоимости данных материалов и отсутствие всеобщей доступности.

1.2.1 Биологические имплантаты животного происхождения

Ярким представителем данной группы материалов является имплантат Surgisis™ (Small Intestinal Submucosa (SIS) Cook Surgical, США), полученный путем децеллюляризации подслизистого слоя свиной тонкой кишки, применяемый для реконструкции передней брюшной стенки [43-47]. Согласно приведенным в литературе данным, период биодеградации имплантата Surgisis составляет 6 месяцев, а зона имплантации замещается нативными тканями. Проведенное исследование Franklin et al. (2002)

показало достаточную эффективность использования Surgisis – при 19 выполненных герниопластиках послеоперационных вентральных грыж, на протяжении 1 года послеоперационного наблюдения не было зафиксировано случаев рецидива (0%) [48]. Позже, в 2008 году, Franklin провел ретроспективный анализ 116 случаев хирургического лечения грыж живота различной локализации с применением Small Intestinal Submucosa: послеоперационные, паховые, пупочные, в условиях бактериального инфицирования, или потенциальной контаминации операционной раны. Согласно двухлетнему мониторингу результатов, рецидивы грыжевых дефектов наблюдались в 5,3% случаях [49].

Ueno et al. (2004) провели когортное исследование по изучению Surgisis в качестве пластического материала для герниопластики в условиях бактериальной контаминации [50]. За полуторогодичный период наблюдения после имплантации рецидив наблюдался у 30% (6 человек) пациентов. Helton et al. сообщает об опыте применения Surgisis для хирургической коррекции послеоперационных вентральных грыж в условиях потенциальной контаминации операционного поля (стерильные – 41,5%, потенциально обсемененные – 24,5%, инфицированные – 34%). Из 53 прооперированных больных рецидив описан у 9 пациентов (17%). Риск развития осложнений, в частности рецидива, напрямую зависел от бактериальной среды операционной раны: в условиях бактериальной контаминации процент повторных грыж составлял 39%, в то время как в условиях стерильности операционной раны процент рецидива не превышал 5% [51].

Согласно данным более поздних публикаций, проведено 5-тилетнее проспективное рандомизированное исследование применения Surgisis для пластики паховых грыж [52]. В исследовании приняли участие 76 человек, период наблюдения после операции составлял 24 недели. Согласно результатам исследования ни у одного из пациентов не отмечался рецидив паховой грыжи (0%). Группа ученых Ravo и др. (2020) наблюдали 101 пациента в течение 10 лет после выполнения пластики задней стенки пахового канала с помощью биоимплантата SIS. Результаты показали, что частота рецидивов паховой грыжи составила всего 1,9%. Хроническая боль и ощущение инородного тела после пластики паховой грыжи являются двумя другими распространенными осложнениями, влияющими на качество жизни пациентов. Среди пациентов, наблюдаемых в этом исследовании, у одного пациента была хроническая боль в области операции (умеренный уровень) из-за интенсивных физических нагрузок через 2 года после операции. Приведенный низкий процент рецидивов считается приемлемым для клиницистов при использовании биологических материалов [53].

Другим ведущим представителем данной группы является Permacol Biological Implant (Covidien, Mansfield, США), представляет собой свиной ацеллюлярный дермальный коллаген [54,55], предназначенный для пластики грыж живота, укрепления мышечного массива грудной и брюшной стенки.

Hsu P.W. et al. (2008) изучали применение свиного дермального коллагена Permacol для герниопластики. Исследование включало в себя 28 пациентов с грыжами живота различной локализации, без признаков инфицирования на момент операции. В ходе послеоперационного наблюдения нагноения и признаков отторжения имплантата не отмечалось, однако рецидив заболевания зарегистрирован в 10,7% случаев [56].

Другой областью применения имплантата Permacol явилась реконструктивная хирургия передней брюшной стенки после лапаростомии, на фоне кишечных свищей. Connolly P.T. et al. (2008) описали опыт применения Permacol при данной патологии, где в 12 из 61 случая закрытия лапаростомии применялся биологический имплантат [57]. Согласно приведенным литературным данным сохранялся высокий процент (41,7%) осложнений в виде инфицирования и отторжения имплантата, повторного открытия свища и формирования грыжи. Авторы пришли к мнению, что Permacol имеет ограниченные показания к пластике дефектов живота в условиях явной или условной бактериальной контаминации. Тем не менее, описан опыт успешного применения биоимплантата в условиях бактериального инфицирования. Armellino et al. (2006) приводят данные о 6 герниопластиках вентральных грыж, осложненных наличием свища, а также раневой инфекцией от предшествующей пластики сетчатым эндопротезом. За период двухлетнего послеоперационного наблюдения случаев рецидива или отторжения имплантата не наблюдалось [58].

Veritas Collagen Matrix – биологический имплантат, полученный из бычьего перикарда. Данный биопластический материал предназначен для реконструктивной хирургии мягких тканей, а именно: герниопластика грыж живота различной локализации, закрытия дефектов мышечного каркаса грудной стенки. Однако, в доступной литературе наблюдается ограниченное количество публикаций и недостаточность научных доказательств успешного клинического применения Veritas Collagen Matrix в качестве имплантата при грыжесечении. Приведено одно ретроспективное исследование по изучению эффективности Veritas Collagen Matrix при пластике грыж передней брюшной стенки. Limpert et al. приводят данные о 26 проведенных операциях по поводу первичных и рецидивных грыж живота, однако случаи рецидива в послеоперационном 6-месячном наблюдении регистрировались у 19% пациентов [59].

Что касается таких биологических материалов как Peri-Guard, FortaGen, FlexHD, Allomax, Tutorpatch, SurgiMend, по вышеуказанным имплантатам нет клинически значимых результатов успешного применения, кроме как единичных случаев использования данных материалов при герниопластике.

1.2.2 Биологические имплантаты на основе донорских тканей

Одним из ведущих представителей этой группы является имплантат Alloderm (компания Life Cell. Corp., Woodlands, США) – обесклеточенный дермальный матрикс, полученный из донорского трупного кожного аллотрансплантата, с использованием технологии низкотемпературной

лиофилизации. Изучению биологического имплантата AlloDerm в качестве эндопротеза для пластики дефектов передней брюшной стенки отводится наибольшее количество научных трудов – 23 исследования, включающие в себя анализ 984 случаев [60, 61, с.419; 62-69]. Подавляющее большинство работ посвящено изучению клинического применения данного материала, его способности к имплантации, а также оценке количества рецидивов, после герниопластики с применением AlloDerm, тем не менее проспективные рандомизированные контролируемые исследования по изучению биосовместимости имплантата AlloDerm отсутствуют [70- 72].

Gupta et al. (2006) приводит данные о проведении сравнительного исследования двух биологических имплантатов AlloDerm и Surgisis в хирургическом лечении вентральных грыж. 74 участника исследования были разделены на 2 группы, среди которых 41 герниопластика была выполнена с использованием Surgisis, 33 операции были проведены с применением биоимплантата AlloDerm. Результаты исследования показали, что в группе пациентов после герниопластики с AlloDerm процент рецидива составлял 24,2%, что на практике означает повторные операции каждому четвертому пациенту [61, с.420-425]. Опыт применения биологического имплантата AlloDerm на протяжении 10 лет приводит группа ученых во главе с Sailes et al (2010). За упомянутый период было произведено 100 грыжесечений с использованием AlloDerm, тем не менее, процент повторного появления грыжи остается на достаточно высоком уровне – 19% [73].

Обескелоченный коллагеновый матрикс имеет широкий диапазон применения в качестве пластического материала, а именно, применяется для замещения дефектов передней брюшной стенки, при резекциях объемных образований органов брюшной полости, для ликвидации последствия травм брюшной стенки. На основании разнородности и ограниченности выборки, ученые столкнулись с вопросом высокого процента рецидива грыж после применения биоимплантата AlloDerm. Были сформулированы выводы о том, что при наличии данных, полученных из авторитетных высококачественных исследований, необходимы четкие показания и хирургические подходы для проведения максимально эффективной пластики грыж живота. Более того, массовое использование матрично-пластических материалов, полученных от трупа, лимитируется юридическими вопросами ограниченного количества их забора и развития возможного иммунологического конфликта с клиническим проявлением отторжения материала.

На основании вышеприведенных данных, можно сделать вывод, что в течение двух десятков лет в арсенале реконструктивной хирургии появился новый вид эндопротезов, называемый «биопластические материалы». По сути, данный термин, характеризует класс биodeградируемых биологических изделий, отвечающих следующим критериям:

- Каркасная функция для трансплантируемых алло- или аутоклеточных элементов;
- гистологическое сходство с нативными тканями;

- стимуляция гистоспецифической регенерации;
- поддержание равновесия параметров газообмена и гидробаланса зоны имплантации;
- биорезистентность к инфекционному агенту.

Несмотря на положительные эффекты от применения имплантатов данной группы, остаются нерешенными вопросы иммунологической безопасности исходного донорского материала. Также, остается вопрос, из какого исходного донорского материала изготавливать биоимплантат. Считается, что технология изготовления биологических имплантатов определяют, в том числе иммуногенные свойства материала, и может быть причиной различных постимплантационных осложнений *in vivo*. Учитывая вышесказанное, на сегодняшний день продолжается поиск биологических материалов, которые по своему строению были бы максимально «схожи» к макроорганизму, сопровождающиеся минимальным иммунологическим ответом, которые можно применить для пластики дефектов живота.

1.2.3 Биологические имплантаты на основе ксеногенной брюшины

Попытки использования брюшины животного происхождения в качестве пластического материала известны более 100 лет назад. Впервые Halsted было предложено использовать свиную брюшину в реконструктивной хирургии в 1893 году. Годы спустя Morris (1902) для профилактики спайкообразования в брюшной полости применил стерилизованную паром висцеральную брюшину крупного рогатого скота. Ученые Hanel и Prime в 1909 году описывали опыт применения висцеральной бараньей брюшины в качестве пластического материала для замещения дефектов твердой мозговой оболочки. Годы спустя, в 1918 году, советский ученый Смирнов А. В. воспроизвел данный эксперимент, и сделал выводы, что ксеногенная брюшина подвергается биодеградации и замещается собственной соединительной тканью на протяжении 6 месяцев после имплантации. В дополнение к наработкам Смирнова А.В., ученые Pudenz и Odom, повторив эксперимент с пластикой твердой мозговой оболочки висцеральной брюшиной КРС в эксперименте, отметили начало биодеградации имплантата и замещение его соединительной тканью уже в период от 4 до 19 суток [74,с.44]. Ценные свойства брюшины животного происхождения подтвердили множество экспериментальных и клинических работ, выполненные такими учеными как Кузнецов Н.Н. (1952), Хохлов П.П. (1957), Елисеев Н.Т. (1968), Попов П.Я. (1963), Слободчиков М.Е. (1965) и другие, открыв новые горизонты в изучении применения данного биологического материала в реконструктивной хирургии.

Была накоплена доказательная база о безопасности применения консервированной ксеногенной брюшины, приведены данные об отсутствии общих и местных аллергических реакций, выраженного воспалительного ответа со стороны организма хозяина. Консервированная брюшина обладала достаточными прочностными характеристиками, приемлемыми темпами биодеградации, не снижающими биомеханические свойства имплантата.

Впервые консервированную бычью брюшину применил Хохлов П.П. (1957), которую широко использовали в различных областях реконструктивной хирургии: для пластики дефектов твердой мозговой оболочки, остеосинтеза трубчатых костей, при хирургической коррекции патологически подвижной почки, создания герметичности при открытом пневмотораксе, применяли как биологическую повязку в лечении термических ожогов.

В доступной литературе описано исследование по применению консервированной гетерогенной ксенобрюшины при паховых грыжах [74, с. 47]. Технология изготовления биологического материала включала в себя предстерилизационную механическую очистку от жира, далее образцы брюшины промывали в проточной воде с мылом, с последующей консервацией в 2% растворе хлорамина. По истечении 2 суток, образцы брюшины повторно обильно промывались проточной водой, а затем снова помещались в резервуар с 2% раствором хлорамина на 12 суток. После проведения вышеописанных процедур материал становился пригодным для использования [74, с.48-49]. Однако, несмотря на видимые преимущества, нерешенным оставался вопрос иммунологического ответа на наличие белковых структур в составе биологического материала. Более того, хлорсодержащий раствор для консервирования является агрессивным компонентом для тканей в зоне имплантации, что может привести к раздражению и воспалению окружающих тканей. Консервированная бычья брюшина не получила в свое время массового применения в хирургической коррекции грыж передней брюшной стенки по причине недостаточной клинической эффективности и иммунологической безопасности [75, с.2].

Новая возможность применения в качестве биопластического материала ксеногенной брюшины появилась с развитием технологий тканевой инженерии. Результатом совместного многолетнего сотрудничества Национального центра биотехнологии и Национального научного центра онкологии и трансплантологии (г. Астана, Казахстан) было появление биологически активной раневой повязки на основе бычьей брюшины [75, с. 3-5]. Однако, технология децеллюляризации при получении данной биоповязки предполагала использование в качестве детергента 4% раствор дезоксихолата натрия, который оказывал деструктивное воздействие на коллагеновые и эластиновые волокна, подтвержденное методом электронной микроскопии. Как следствие, такая технология получения биоматериала не предполагала его применение в полостях организма реципиента, в частности, в брюшной полости и передней брюшной стенке.

Учитывая вышеописанную проблему, научный коллектив Национального центра биотехнологий (г.Астана, Казахстан) совместно с коллегами из Медицинского университета Караганды (Караганда, Казахстан) разработали метод изготовления внеклеточного матрикса ксенобрюшины, который включал в себя два цикла децеллюляризации более щадящими детергентами 0,25% додецилсульфат натрия и 0,5% Тритон X-100, не

оказывая деструктивного влияния на ультраструктуру коллагеновых и эластиновых фибрилл опытных образцов имплантата [76, с.1]. Данная технология обработки исключала наличие белковых структур на матриксе, что подтверждалось электронной микроскопией, тем самым позволяла применять внеклеточный матрикс ксенобрюшины внутри анатомических структур организма. В период 2015-2017 годы, было проведено исследование по изучению внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки в эксперименте. В частности были изучены морфологические аспекты взаимодействия ВКМ с организмом экспериментального животного, структурные изменения зоны имплантации, адгезивные свойства имплантата при под апоневротической пластике дефектов передней брюшной стенки, биомеханические свойства. Согласно результатам проведенного исследования, было обнаружено, что после имплантации ВКМ у 96% животных за период трехмесячного наблюдения осложнения отсутствовали. Послеоперационная рана заживала первичным натяжением, признаков иммунологического отторжения имплантата не обнаружено. При оценке спаечного процесса в брюшной полости после имплантации изучаемого материала, было установлено, что внеклеточный матрикс ксенобрюшины не вызывает массивных спаек в брюшной полости, слабовыраженные спайки по линии шва были ассоциированы с применяемым шовным материалом.

Были также изучены морфологические аспекты применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины. Результаты показали, что к 5-7 суткам постимплантационного периода происходит стадийно-специфическая смена экссудативной фазы раневого процесса в пролиферативную фазу с дальнейшей тенденцией формирования стромы к 14 суткам и далее к 30 суткам, с формированием зрелого соединительнотканного рубца без признаков персистенции хронического воспаления. При оценке биомеханических свойств ВКМ демонстрировал достаточную механическую прочность, преимущественно за счет своей эластичности – результат удлинения при разрыве 110%. Согласно результатам изучения биомеханических свойств, после имплантации внеклеточный матрикс ксенобрюшины демонстрирует повышение прочности в 2,6 раза. При этом пиковые значения нагрузки на разрыв составили 14,5Н, не теряя прочностных свойств на каждом сроке наблюдения эксперимента [77].

Проведенный анализ литературных данных по применению биологических материалов для реконструкции дефектов живота в клинической практике демонстрирует отсутствие имплантата на основе ВКМ ксенобрюшины. На сегодняшний день произведен научный задел по экспериментальному обоснованию применения ВКМ для пластики дефектов передней брюшной стенки путем ранее изученных морфологических аспектов имплантации, изучения прочности на разрыв и адгезивных свойств. Однако, отсутствие данных о сенсibiliзирующих свойствах имплантата, а также реакции иммунного ответа организма хозяина в рамках доклинической

оценки безопасности внеклеточного матрикса ксенобрюшины определяет актуальность настоящего диссертационного исследования.

1.3 Иммунологическая биосовместимость эндопротеза как критерий успешной имплантации

Потребность в новых биосовместимых материалах для эффективной реконструкции передней брюшной стенки, обеспечивающих должную механическую прочность без снижения ее функциональности, одноэтапную пластику грыжевых ворот (особенно в условиях бактериальной контаминации), привели к изучению имплантатов биологического происхождения [78-82]. Опыт использования материалов на основе донорских тканей животных известен давно, однако без применения технологий обесклеточивания, данные имплантаты не нашли широкого клинического применения по причине высокого риска иммунологического конфликта. С появлением технологии децеллюляризации исследования в области применения биологических материалов стали более перспективными [83]. Одним из главных параметров применения подобного рода имплантатов является замещение поврежденного участка ткани с ремоделированием структуры и функции ткани, не вызывая иммунологического отторжения. На сегодняшний день биологические эндопротезы получают из различного рода полимеров: полиоксибутираты, хитозан, коллаген, альгинаты, желатин и прочее. Эти материалы обладают достаточной биосовместимостью и могут выполнять функцию стимуляции биологических процессов в зоне имплантации [84]. Иммунологический ответ и выраженность воспалительной реакции напрямую предопределяется физико-химическим составом материала, а также способностью биологических имплантатов встраиваться в процесс ранозаживления [85].

На основании вышеизложенного, можно полагать, что приемлемый вариант биологического имплантата должен соответствовать критериям:

- Макромолекулярная структура с прогнозируемым периодом резорбции, не вызывающая иммунологических реакций отторжения имплантата;
- Встраивание в физиологические биохимические процессы макроорганизма конечных или промежуточных продуктов деструкции;
- Максимальная синхронность периодов регенерации зоны имплантации и биодеградации материала.

В настоящее время перспективой использования биологических имплантатов является их применение в качестве матрицы, которая, наряду с каркасной функцией, стимулирует адгезию, пролиферацию, и репарацию поврежденных участков [86].

В зависимости от источника получения биологические материалы делятся на:

- Биоимплантаты животного происхождения (ксенографт);
- Биоимплантаты из донорского материала человека (аллографт).

Однако, помимо желаемого эффекта, данные материалы вызывают различной степени выраженности местную и общую воспалительную реакцию после имплантации. Среди прочих факторов степень этой реакции зависит от структуры и функциональных особенностей имплантируемого материала [87]. Адекватное течение репаративного процесса требует высокой координации всех фаз: гемостаза, воспаления, пролиферации и ремоделирования, и каждого задействованного типа клеток. По этой причине понимание событий и процессов, происходящих во время заживления ран, особенно в присутствии инородного материала, имеет решающее значение для пластики брюшной стенки. Во время выполнения герниопластики, после повреждения брюшины или в результате последующего механического контакта с имплантатом, высвобождаются различные вещества, такие как гистамин или вазоактивные хинины, под действием которых повышается проницаемость кровеносных сосудов. Первым типом клеток, привлекаемым хемокинами, появляющимися в области повреждения, являются полиморфноядерные нейтрофилы, которые способствуют поглощению инородных частиц или микроорганизмов. Следующим важным моментом в фазе воспаления является появление в зоне интереса моноцитов, которые привлекают провоспалительные цитокины ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α [88]. Моноциты, дифференцируясь в макрофаги, адгезируются в зоне имплантации и сливаясь с гигантскими клетками инородного тела, пытаются фагоцитировать биоматериал. Макрофаги также могут в течение первых 48ч предотвращать, а затем стимулировать от 48ч до 54ч после повреждения пролиферацию мезотелиальных клеток. Кроме того, мезотелиальные клетки выделяют различные цитокины и факторы роста в зону имплантации, опосредованно стимулирующие ранозаживление. Лейкоциты на ранних фазах также способствуют пролиферации обычно покоящихся мезотелиальных клеток. В макрофагальных инфильтратах обнаружены лимфоциты типа Т, развивающие иммунный ответ. Секреторные продукты макрофагов модулируют пролиферацию фибробластов во время пролиферативной фазы. Под действием трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), покоящиеся фибробласты дифференцируются в миофибробласты, играющие существенную роль в репаративном процессе, путем синтеза коллагена и восстановления внеклеточного матрикса [89]. Фибриллярный коллаген обеспечивает поддержку и прочность на растяжение, которые придают внеклеточному матриксу его структурную целостность. В раннем постимплантационном периоде (до 3 суток), мезотелиальные клетки покрывают перитонеальные макрофаги, присутствующие в области имплантации, и пролиферируют в течение следующих дней, образуя множественные клеточные островки, слияние которых приводит к восстановлению мезотелия, что в конечном итоге характеризуется репарацией брюшины и зоны имплантации [90].

Основным показателем биосовместимости имплантата является реакция организма на инородное тело. Реакция зоны имплантации на границе

тканей передней брюшной стенки хозяина и поверхности биоматериала сохраняется на протяжении всей жизни эндопротеза, в отличие от физиологического процесса ранозаживления и формирования рубца. Взаимоотношения клеток в клеточном инфильтрате периимплантационной зоны представляют собой непрерывный процесс, приводящий к хроническому воспалению. Характер и качество воспалительного ответа на инородное тело различной природы удивительно постоянно и характеризуется быстрой аккумуляцией огромного числа фагоцитарных клеток, в частности, моноцитов крови и тканевых макрофагов [91-94].

На сегодняшний день остается без ответа вопрос, почему не иммуногенные и инертные материалы вызывают этот тип воспаления, известный как реакция на инородное тело или *foreign body reaction* (FBR). В качестве объяснения патофизиологических процессов, лежащих в основе этого типа хронического воспаления, в исследованиях биоматериалов получила широкое распространение теория абсорбции протеина. Целью этого процесса является отграничивание инородного материала в зоне имплантации от интактных тканей посредством формирования собственной биосистемы. Подобные механизмы реализуются при специфических процессах, например при туберкулезе, когда макроорганизм не в состоянии избавиться от бактериального агента. *Mycobacterium tuberculosis*, и типичной реакцией организма является образование гранулем на границе с биоматериалом. Эти гранулемы характеризуются присутствием мультинуклеарных гигантских клеток, которые происходят из расплавленных макрофагов и моноцитов, которыми усеяна граница между инородным телом и тканями хозяина [95].

Имплантируемые эндопротезы достаточно быстро, в течение нескольких секунд после имплантации, абсорбируют слой белков макроорганизма, причем этот процесс происходит задолго до инициации клеточного ответа на биоматериал. Структура, концентрация и тип этих протеинов зависит от свойств поверхности биоматериала [96]. Примерами таких протеинов являются IgG (активация классического каскада системы комплимента), C3 (активация альтернативного пути системы комплимента), фибриноген (связывание GPIIb-IIIa на тромбоцитах) и фактор XII (запуск контактной активации) [97-99].

Взаимодействие адгезиозных рецепторов клеток воспаления с поверхностно абсорбируемыми белками инициирует процесс клеточного распознавания и защиты от имплантируемого биологического материала или инородного тела. Фагоциты в первую очередь взаимодействуют с этими спонтанно абсорбируемыми протеинами, а не собственно с материалом. Иммунологическая активность деградирующих протеинов, вторичного процесса после их абсорбции поверхностью биоматериала, запускает активацию прикрепленных фагоцитов [100]. В зависимости от физико-химических свойств поверхности имплантата и типа абсорбируемых белков, степень деградации протеинов варьируется, определяя тем самым типичную

FBR для каждого вида имплантатов [101]. Фагоциты способны определять деградирующие белки биологических эндопротезов и отвечать через серию воспалительных и ранозаживляющих ответов, обычно начинающихся с этапа формирования фибринового сгустка. Первичная воспалительная реакция, спровоцированная высвобождением потенциальных медиаторов воспаления, привлекает другие типы клеток, включая Т-клетки, полиморфноядерные и эозинофильные гранулоциты, клетки плазмы и фиброциты [102]. В течение нескольких последующих дней этот инфильтрат из различных видов клеток формирует раннюю гранулему с характерным наслоением клеточных пластов, которые могут быть также определены во время созревания гранулемы по характерным гигантским клеткам и наружному слою фиброза (поздняя стадия воспаления). Причем поздняя гранулема не является статическим типом хронического воспаления, а представляет собой хронический очаг с повышенной клеточной активностью даже спустя годы после имплантации [103,104]. Моноциты и тканевые макрофаги места контакта зоны имплантата с тканями макроорганизма подвергаются апоптозу, умирают и замещаются клетками с периферии.

Факт существования тканевой реакции, неблагоприятно влияющей на результат пластики, до появления легких сеток с крупными порами, практически не обсуждался. Хирургические сетки безапелляционно рассматривались как инертные и биосовместимые. Однако если считать вышеизложенное относительно FBR справедливым, то абсолютно все хирургические сетки должны демонстрировать типичную воспалительную реакцию. И действительно, экспериментальные и клинические исследования демонстрируют типичную реакцию инородного тела в зоне имплантации всех модификаций сеток, доступных хирургу на сегодняшний день. Морфологические аспекты гранулем инородного тела представлены достаточно в полном объеме, однако, лишь недавно исследования были сосредоточены на клеточных и молекулярных взаимодействиях в различные фазы репаративного процесса с целью создания нового взгляда на молекулярные механизмы ее формирования.

Обсеменение белками крови поверхность биоматериала может рассматриваться как временный матрикс, который обеспечивает структурными и биохимическими компонентами процесс реакции инородного тела. Цитокины, хемоаттрактанты, митогены, факторы роста способны активировать клетки иммунной системы [105]. Хемокины, а также тромбоцитарный фактор роста (PDGF), лейкотриен (LTB₄) и интерлейкин (IL-1) способны направлять моноциты крови в зону имплантации и инициировать дифференцировку тканевых макрофагов [106]. Трансформирующий фактор роста – бета (TGF- β) является еще одним мощным регулятором численности клеток, однако специфические функции его подтипов остаются не до конца изученными. Макрофаги, в числе других, продуцируют фактор некроза опухоли (TNF- α), IL-6, PDGF и гранулоцит-макрофаг колонии стимулирующий фактор (G-CSF, GM-CSF). Данные

хемокины провоцируют миграцию моноцитов/макрофагов в зону имплантации, в пространство между биоматериалом и тканью реципиента [107-110]. После чего, посредством активности интегринов, происходит адгезия клеток путем связывания с различными адсорбированными белковыми лигандами, включая фибриноген, фибронектин, IgG и фрагменты комплемента [111,112]. Являясь представителями большого семейства рецепторов клеточной поверхности, интегрины играют роль медиаторов межклеточного взаимодействия и взаимодействия с экстрацеллюлярным матриксом [113]. McNally и Anderson обнаружили, что бета-1 интегрины играют важную роль в адгезии макрофагов, а IL-4 индуцирует слияние макрофагов в гигантские клетки инородного тела (foreign body giant cells). Организовываясь в клеточный инфильтрат, макрофаги пытаются фагоцитировать биоматериал и сливаются, образуя клетки инородного тела. IL-4 [114], IL-13 и другие цитокины являются мощными индукторами процесса слияния макрофагов [115]. Слияние макрофагов является биоматериал-зависимым процессом [116], что указывает на важность адсорбции поверхностно-специфичных протеинов для прохождения необходимого фенотипирования и слияния клеток в гигантские клетки инородного тела. В процессе, описанном более 40 лет назад как “разочарованный фагоцитоз” [117], макрофаги и гигантские клетки продуцируют медиаторы для деградации биологического материала, такие как активные формы кислорода, ферменты деградации и кислоты. Поверхность биологических материалов восприимчива к высоким концентрациям данных агентов деградации, что может привести к повреждению имплантата. Так, спустя месяцы или годы после герниопластики, при сканирующей электронной микроскопии обнаруживаются поверхностные повреждения хирургических эндопротезов из полипропилена, полиэстера и политетрафторэтилена [118]. В отличие от ремоделинга, в процессе ранозаживления, при реакции на инородное тело пул клеток и цитокинов стимулирует фиброзную реакцию, имеющую своей целью инкапсулировать инородный объект и отделить его от окружающих тканей. Грануляционная ткань, идентифицируемая по наличию макрофагов, инфильтрации фибробластами и неоваскуляризации, является предшественником формирования фиброзной капсулы. Наружная грануляционная ткань отделена от биоматериала клеточным инфильтратом, состоящим из нескольких слоев моноцитов, макрофагов и гигантских клеток инородного тела [119]. Эти клетки способны секретировать факторы роста и ангиогенные факторы, которые играют важную роль для пролиферации фибробластов/фиброцитов и ангиогенеза [120]. Центральное место в этом процессе отводят TGF- β [121], способному на ранней стадии формирования капсулы инородного тела вызывать дифференциацию покоящихся фибробластов в миофибробласты, синтезирующие коллаген. При этом коллаген I типа, являясь главной мишенью TGF- β , начинает накапливаться в капсуле инородного тела, особенно в поздней стадии формирования

гранулемы. Было показано, что в отличие от других цитокинов, таких, как IL-10 или IL-13, которые дифференциально определяются только внутри клеточных слоев, непосредственно покрывающих биоматериал, TGF- β представлен во всех слоях гранулемы, особенно вблизи зон фиброза [122]. Наряду с макрофагами, фибробласты и лейкоциты продуцируют TGF- β при реакции на инородное тело, активно участвуя в фиброзообразовании. Также отмечается высокий уровень экспрессии IL-13 и фактора роста соединительной ткани, достигающий пика в более поздние сроки, что может свидетельствовать о способности этих цитокинов самостоятельно влиять на фиброзную инкапсуляцию [123].

Макрофаги секретируют не только цитокины и факторы роста, но также и протеолитические ферменты, к числу которых относятся матриксные металлопротеиназы (MMPs). Макрофаги и гигантские клетки инородных тел, прикрепленные к биоматериалу, продуцируют MMPs и их ингибиторы, влияя тем самым на реконструкцию внеклеточного матрикса и фиброз. MMPs гидролизуют компоненты внеклеточного матрикса и влияют на поведение клеток. Кроме того, MMPs регулируют высвобождение цитокинов из внеклеточного матрикса, активируют цитокины, такие, как TGF- β , факторы некроза опухоли, или их рецепторы на поверхности клеток [124]. Благодаря этим механизмам MMPs тесно вовлечены в хемотаксис воспалительных клеток [125]. При этом, было обнаружено, что MMP-2 и MMP-9 обладают двойной функциональностью, поскольку могут способствовать как провоспалительной, так и противовоспалительной активности [126, 127]. Низкие уровни MMPs важны для заживления ран, поскольку MMP-2 регулирует активацию клеток, ангиогенез и фиброзообразование [128]. Соответственно, повышенная экспрессия MMP-2 коррелирует с нарушением ранозаживления при реакции на инородное тело [129, 130]. Действующие в двух направлениях – на инициацию воспаления и реконструкцию внеклеточного матрикса, MMPs могут рассматриваться как важные медиаторы для прогрессирования фиброзной инкапсуляции (рисунок 1) [131].

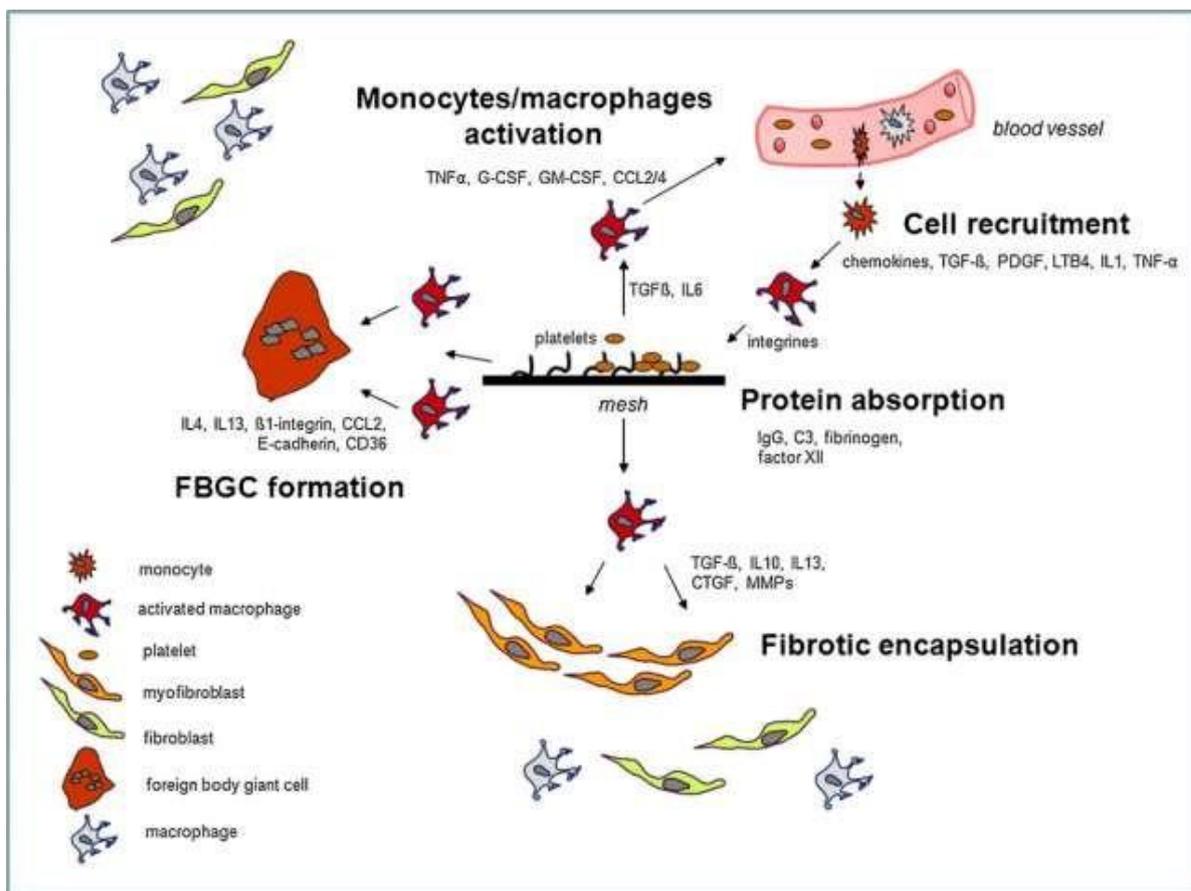


Рисунок 1 – Стадии реакции на инородное тело: абсорбция белков, активация макрофагов, слияние в гигантские клетки инородного тела, трансформация фибробластов и фиброзная инкапсуляция.

Фиброзная реакция, как результат хронического воспаления, в значительной степени влияет на качество отдаленных результатов пластики грыжевых дефектов. На сегодняшний день тканевой ответ на имплантат понимается как хроническое асептическое воспаление, присутствующее на протяжении многих лет в зоне имплантации между эндопротезом и тканями реципиента. Постепенно растет понимание того, что активность этого хронического воспаления в зоне имплантации должна быть снижена, насколько это возможно. В то же время, знание молекулярных механизмов реакции на инородное тело создает предпосылки для развития новых биоматериалов, которые бы служили транспортной системой для биоактивных агентов, способных уменьшить воспалительный ответ и в конечном итоге привести к улучшению клинических результатов.

На основании вышеизложенного, далее будут приведены характеристики клинического применения различных видов биологических материалов с описанием иммунологических аспектов реакции организма реципиента в ответ на имплантацию.

Наряду с клиническим изучением изменений зоны имплантации и биоматериала, в литературе приводятся данные, полученные

экспериментальным путем, описывающие местную воспалительную реакцию и оценку изучаемых показателей в острой и хронической фазах воспаления.

Так, группой немецких ученых (Silke Lucke et al, 2014) [132] было проведено сравнительное экспериментальное исследование двух биологических материалов, полученных из свиного коллагена – Permacol и, так называемая, нерассасывающаяся ксенодерма (Non-Resorbable Xenoderm, NRX; Medical Biomaterial Products GmbH, Neustadt-Glewe, Germany), целью которого, было получить дифференцированное представление о воспалительных процессах, связанных с имплантатом через изучение популяции иммунных клеток (макрофаги CD68+, макрофаги CD163+, Т-лимфоциты, тучные клетки и NK-клетки). Полученные результаты показали, что оба типа макрофагов были вовлечены в воспалительную реакцию после имплантации Пермакола. Количество провоспалительных CD68+ (M1) макрофагов снижалось с течением времени после имплантации, равно как и количество гигантских клеток инородных тел, которые образовывались путем слияния макрофагов. Что касается клеточных взаимодействий, значительная положительная корреляция между CD68+ (M1-подобными) макрофагами и Т-лимфоцитами наблюдалась в острой фазе воспаления для обоих материалов, чего не наблюдалось в хронической фазе. Наблюдаемая в настоящем исследовании положительная корреляция между Т-клетками и CD68+ (M1-подобными) макрофагами обусловлена преимущественно клетками Th1, что не противоречит литературным данным [133]. Через 1 месяц после имплантации площадь положительного окрашивания CD163+ (M2-подобных) макрофагов была выше, чем у CD68+ (M1-подобных) макрофагов, что говорит о переключении CD68+ (M1-подобных) макрофагов, доминирующих в ранней фазе после имплантации, на CD163+ (M2-подобные) макрофаги в хронической фазе и согласуется с данными J. G. Tidball and S. A. Villalta [134]. В поздней фазе после имплантации для обоих материалов была обнаружена поразительная положительная корреляция между Т-лимфоцитами и CD163+ (M2-подобными) макрофагами, тогда как в острой фазе воспаления этого не было. Было предположено, что эти Т-клетки имеют фенотип Th2 и участвуют в гуморальном иммунитете и координации иммунных реакций на имплантированный материал. Кроме того, провоспалительный ИЛ-2 играет критическую роль в дифференцировке Т-клеток, а экспрессия рецептора ИЛ-2 на поздней фазе воспаления может привести к более выраженной воспалительной реакции, сочетающейся с образованием специфических антител против свиного коллагенового матрикса [135].

Одним из ранних лабораторных предикторов послеоперационных осложнений в абдоминальной хирургии считается С-реактивный белок (СРБ) [136-138]. Насколько известно из доступной литературы, только в одном исследовании было установлено, являются ли послеоперационные анализы крови ценными предикторами инфекционных осложнений после пластики вентральной грыжи с применением сетчатых эндопротезов [139]. В этом

исследовании Pochhammer et al.(2020) пришли к выводу, что послеоперационный уровень СРБ позволял прогнозировать течение послеоперационного периода до 7-го дня послеоперационного периода. В данном исследовании самый высокий расчетный уровень СРБ наблюдался на 5-6-й день после операции и составил $94,7 \pm 77,6$ мг/л в группе с осложнениями по сравнению с $39,5 \pm 29,1$ мг/л в группе без осложнений ($p < 0,001$).

В исследовании, проведенном Julien Janet et al (2021), приводятся данные по изучению СРБ после оперативного вмешательства по поводу грыж передней брюшной стенки с использованием биологического имплантата Permacol [140]. В данном исследовании принимало участие 66 пациентов, одно из немногих исследований, в котором оценивалась способность СРБ прогнозировать осложнения после пластики послеоперационной грыжи, и первая, в которой основное внимание уделялось использованию биологических эндопротезов. Результаты показали, что не только уровень СРБ, но и уровень лейкоцитов выступают предикторами развития послеоперационных осложнений после пластики грыжи передней брюшной стенки. Частота послеоперационных осложнений была высокой, 48,5%. При сохраняющемся уровне СРБ > 100 мг/л до 10-х суток после операции частота осложнений была намного выше (95%), чем у пациентов с уровнем СРБ ниже этого порогового значения ($p < 0,001$). Разница в количестве лейкоцитов между двумя группами в данном исследовании также была значимой: 16,7 против 9,1 Г/л соответственно ($p < 0,001$). Лейкоциты рутинно измеряли на основе уровней СРБ, и изменения их динамики в течение нескольких дней могут служить дополнительным свидетельством послеоперационных осложнений. Однако в других исследованиях количество лейкоцитов существенно не повышало точность диагностики [141].

Резюмируя вышесказанное, авторы пришли к выводу что, пациентов, перенесших операцию по поводу пластики грыжи передней брюшной стенки с использованием биологического материала, со значениями СРБ > 100 мг/л следует рассматривать как группу высокого риска по развитию раневых осложнений.

Другая группа исследователей во главе с Youssef Aachoui (2011) Государственного университета Индианы, США, провела исследование по изучению иммунного статуса экспериментальных животных в ответ на имплантацию материала Surgisis [142]. Была изучена безопасность и эффективность Surgisis на инбредных линиях мышей C57BL/6 и BALB/c, а также дана оценка изменений микросреды (цитокины и хемокины), вызванные Surgisis, и его влияние на качество и титр специфического ответа антител. Результаты показали, что SIS активирует IL-4 и CD30-лиганд и способствует экспрессии генов Nod-подобных рецепторов (NLR) и связанных с ними нижестоящих эффекторов, что подразумевает модуляцию экспрессии цитокинов и хемокинов через эти рецепторы. SIS умеренно повышает экспрессию нейтрофильных хемотаксических факторов,

моноцитарный хемотаксический фактор, макрофагальный хемотаксический фактор, фракталкин, лимфотактин и факторы роста, такие как макрофагальный колониестимулирующий фактор. В результате исследования SIS оказался по своей природе сильным и эффективным в порождении опосредованного антителами типа Th2 ответа, прежде всего типа IgG1, и что не мало важно, SIS отличался отсутствием провоцирования провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1b, TNF-a).

Что касается экспериментальных исследований биоматериала AlloDerm, то данный имплантат изучался в качестве пластического эндопротеза на моделях лабораторных кроликов и свиней для реконструкции брюшной стенки, а именно, были изучены процессы репарации послеоперационной раны и процессы образования перитонеальных спаек [143, 144]. В рамках изучения иммунологического ответа Wainwright et al. в своем исследовании отметили что пациенты, не проявляли специфического клеточного иммунного ответа на трансплантат через 60 дней после операции с использованием анализа пролиферации лимфоцитов. Однако стоит отметить, что в данном исследовании речь шла о раневых повязках на основе AlloDerm, применяемых при ожоговых ранах [145]. На сегодняшний день в доступной литературе не приводится данных об исследованиях, оценивающих клинические иммунологические последствия имплантации AlloDerm в брюшную полость. Тем не менее, представлена первая экспериментальная модель приматов для пластики грыж передней брюшной стенки биоматериалом AlloDerm с иммунологическими характеристиками имплантации [146]. В данном исследовании наличие иммунного ответа на биоимплантат оценивали путем мониторинга уровней специфических цитокинов как в имплантате, так и в сыворотке, в дополнение к активации макрофагов в ходе эксперимента. В рамках оценки клеточного иммунного ответа измерялись цитокины IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ и TNF- α . Среди всех показателей, отмечался подъем только IL-6 на 10 и 20 сутки послеоперационного наблюдения, в то время как отсутствие активированных специфических для Т-клеток цитокинов, таких, как IL-2 и IFN- γ , указывало на отсутствие клеточного иммунного ответа. В сыворотке животных, которым имплантировали AlloDerm, были обнаружены уровни всех протестированных цитокинов ниже пороговых значений, кроме IL-10 и IL-6; У 33% животных с имплантированным AlloDerm наблюдалось раннее повышение IL-10. Эти повышенные уровни вернулись к исходным значениям до имплантации через 35 дней, что согласуется с ответом на хирургическое вмешательство.

Изучение реакции организма в ответ на трансплантацию за последние десятилетия привлекло внимание многих ученых к изучению

циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот, которые представлены как вкДНК и вкРНК. Диагностическая значимость свободных нуклеиновых кислот имеет место быть при различных физиологических и патологических процессах организма сопровождаемых нарушением клеточных структур [147]. Различные исследования показали повышения уровня этих показателей в крови при травматизации и некрозе донорских тканей после успешной трансплантации. Из этого следует, что вкДНК и вкРНК можно расценивать как ранний предиктор отдаленной реакции организма на чужеродный Ag и дает возможность расценивать это как альтернативу инвазивным методам диагностики при отказе или невозможности проведения биопсии [148].

Ученые США (2022) провели перспективное исследование на 77 пациентах-реципиентах поджелудочной железы. Целью этого исследования было установить взаимосвязь вкДНК как маркера отторжения и некроза. Результаты показали, что средний уровень вкДНК при отсутствии признаков отторжения составил 0,28% в течение первого месяца наблюдения и снижался до 0,17% через 3 месяца после трансплантации, в то время как средний уровень вкДНК повышался во время эпизодов отторжения или инфицирования до 0,56%. Данное исследование показало, что этот биомаркер является чувствительным для активного процесса отторжения донорских тканей [149].

Другое исследование проведенное группой испанских ученых (Pedro Ventura et all, 2022) провели ретроспективное исследование в когорте из 36 пациентов, которые получили донорскую поджелудочную железу и были госпитализированы для взятия биопсии. Средний возраст пациентов составлял 42,3 года, средний вес 58,7 кг. Биопсия у пациентов проводилась на 45 сутки, предварительно взяв кровь для определения уровня вкДНК. В общем, было диагностировано 18 случаев острого отторжения (43%), из которых 9(50%) опосредованно реакцией Т-клеток, 6(33%) были неопределенными, а 3(17%) с доказанной биопсией острым отторжением. Среднее количество вкДНК при этом значительно превышало у пациентов с признаками отторжения, выявленным на биопсии (103,70cp/mL) по сравнению с уровнем данного показателя у пациентов, на биопсии которых не было выявлено признаков отторжения (51,5cp/mL). На основании этих данных был сделан вывод, что неинвазивный анализ крови на измерение вкДНК может быть включен в клиническую практику, чтобы облегчить диагностику случаев реакции отторжения органов и тканей [150].

В исследовании, проведенном китайскими учеными (2022), приводятся данные по изучению вкДНК после пересадки почек, в котором установлена прямая связь повышения уровня свободных ДНК в моче и в плазме и

повреждения донорского трансплантата. Фракции вкДНК увеличивалась в зависимости от вида повреждения почки, что наиболее существенно при антитело-опосредованном отторжении. Уровень вкДНК при отторжении связанным с антителами был выше (1,94%, IQR:1,15%, 2,33%), чем при Т-клеточном опосредованном отторжении (0,55%, IQR:0,50%, 0,73%, $P = 0,002$) и при отрицательном результате гистологического подтверждения (0,58%, IQR:0,42%, 0,78%, $P < 0,001$), тем не менее, был ниже, чем при иммунологической реакции организма в виде отторжения смешанного типа (2,49%, IQR: 1,16%, 4,90%, $P = 0,342$). Уровень концентрации свободных ДНК в моче так же зависел от типа повреждения, особенно прослеживалось повышение при полиомавирусной нефропатии (12,22 нг/мл, IQR:6,53 нг/мл, 31,66 нг/мл), чем при Т-клеточном отторжении (5,24 нг/мл, IQR:3,22 нг) и в случаях без гистологического подтверждения повреждения трансплантата (3,09 нг/мл, IQR:1,94). Таким образом, ученые подтвердили, что наибольшее повышение фракции вкДНК в плазме крови присутствует при антитело-опосредованном отторжении, в то время как в моче при полиомавирусной нефропатии что свидетельствует о важном дифференциальном значении данного показателя при различных причинах повреждения почечного трансплантата [151].

Последние десятилетия, циркулирующие вкДНК и вкРНК привлекли внимание многих ученых для изучения их в качестве инструмента тестирования различных патологических состояниях организма, пренатального скрининга, скрининга рака и контроля роста опухоли. Так же эти показатели обладают большим потенциалом в роли предиктора иммунологического отторжения трансплантата и может использоваться в качестве неинвазивной биопсии при исследовании различных заболеваний и патологий. Было показано, что повышение уровня циркулирующих вкНК могут коррелировать с реакцией отторжения организма на солидные органы, опережая гистологические данные биопсий и минуя последние в тех случаях, когда инвазивные методы диагностики труднодоступны [152-157].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Реализовано сравнительное экспериментальное исследование. Для определения объёма выборки использовалось «ресурсное уравнение» по Mead, так как исследование имеет пилотное направление. Авторы предлагают использовать данную формулу расчета в случаях, когда необходимым является сравнение межгрупповых показателей, и результат предположить является не возможным.

$$E=N-T$$

где E-ошибка степени свободы, N- общее количество животных, T- общее количество групп [158].

Все животные были распределены по группам, согласно поставленным задачам и в соответствии виду имплантированного ксеноимпланта. В каждой группе было разделение на подгруппы согласно срокам исследования и выведению животных из эксперимента. Для контроля брали 6 интактных крыс. Каждому экспериментальному животному был присвоен идентификационный номер (Рисунок 2).

Изучение антигенного влияния ксеноимплантов проводилось на 60 нелинейных лабораторных крысах. При расчете количества животных в каждой группе для определения аллергического влияния исследуемых материалов для $E=20$ составило 22, однако с учетом разделения в группах на подгруппы, нами принято решение взять по 30 крыс в исследуемой группе и в группе сравнения. Случайное групповое распределение животных по 2 группам и 3 подгруппам по 10 особей представлено ниже. Каждую группу составляли животные с соответствующим применяемым материалом, подгруппу – по методу выявления развития сенсибилизации. Стандартизация эксперимента осуществлялась за счет разработанных стандартных операционных процедур (приложение А).

Аллергенное действие внеклеточного матрикса ксенобрюшины оценивалось с помощью стандартных методов выявления развития сенсибилизации: эпикутанная сенсибилизация, конъюнктивальная проба, реакция гиперчувствительности «замедленного типа» [159].

Исследование уровня ЦИК выполнялось на 80 животных. При расчете количества животных в каждой группе было увеличено до 40 крыс в каждой группе. Изучение циркулирующих иммунных комплексов осуществлялось путем сравнительной оценки уровня высокомолекулярных, среднемолекулярных, низкомолекулярных ЦИК в крови на сроках 7, 14, 21, 30, 90 сутки после имплантации исследуемых биологических материалов.

Исследование биомаркеров системной иммунной реакции и биохимических предикторов повреждения клеток осуществлялось на 80 нелинейных лабораторных крысах, посредством сравнительной оценки трансплантационной реакции животного на биоимплантат с определением в крови уровня С-реактивного белка (СРБ), фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α), интерлейкина-2 (ИЛ-2), внеклеточных нуклеиновых кислот

(вкДНК, вкРНК) и их предшественников-кислоторастворимой фракции (КРФ), гистоноподобных белков (Н1, Н2А-Н3-Н4, Н2В) на сроках 7, 14, 21, 30, 90 сутки после имплантации исследуемых биологических материалов. Объем выборки для данного этапа эксперимента рассчитывался при $E=20$ и составил 22, однако с учетом разделения в группах на подгруппы аналогичным образом нами принято решение взять по 40 крыс в обоих сравниваемых группах. Распределялись животные по группам так же случайным образом.

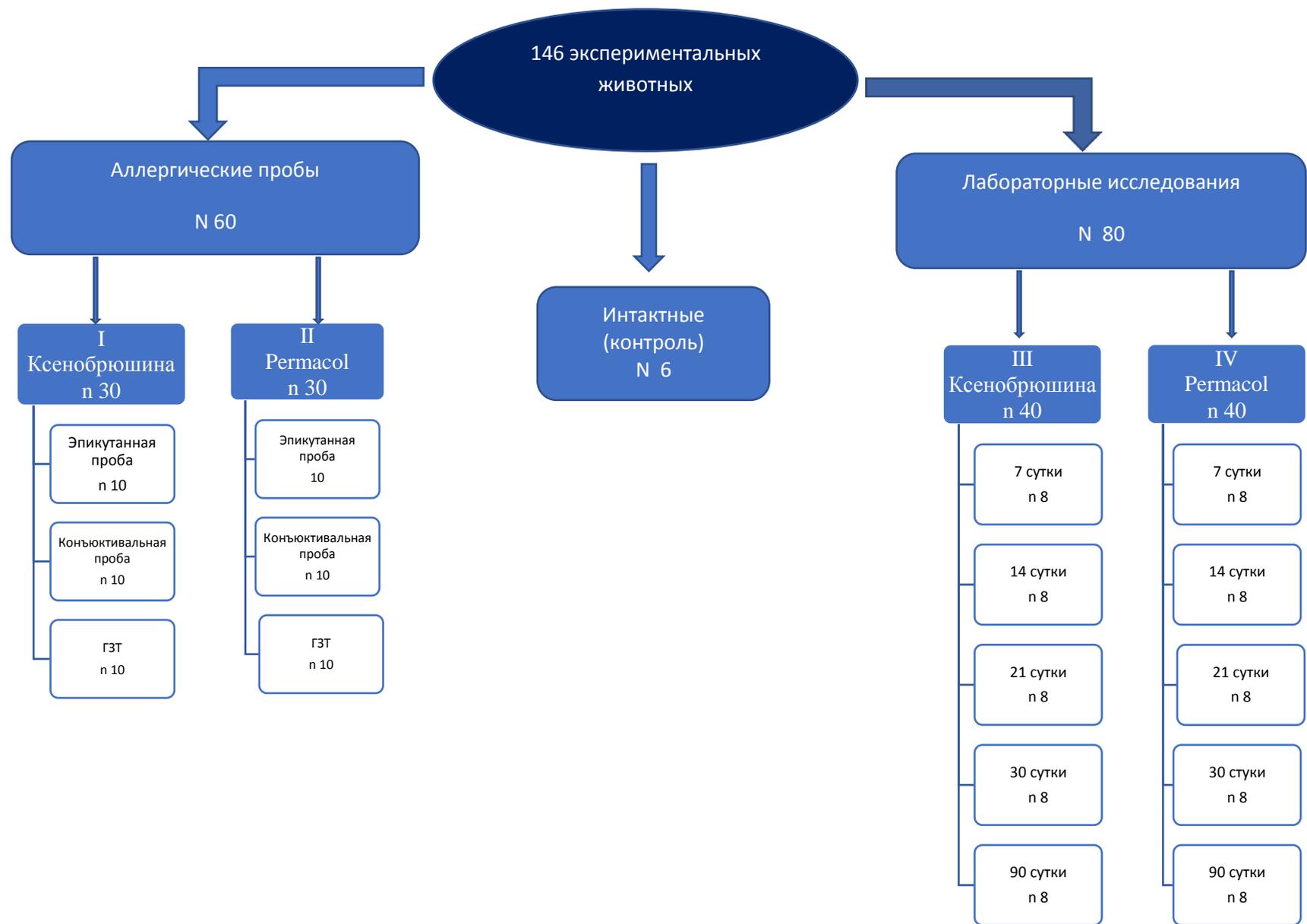


Рисунок 2- Дизайн исследования

2.2 Биоэтические аспекты эксперимента

В эксперименте использовались животные согласно соблюдению изложенных требований в приказе Министерства Здравоохранения Республики Казахстан «Об утверждении правил проведения медико-биологических экспериментов, доклинических (неклинических) и клинических исследований», утв. 2 апреля 2018 года №142 и так же правил Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для исследований в рамках эксперимента или других научных целях (Страсбург 1986г.), Американском медицинской ассоциации ветеринаров American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2019 Edition. Проведение экспериментального исследования одобрено комитетом по биоэтике НАО «Медицинский Университет Караганды» (протокол №18 от 16.05.2019г.).

Все лабораторные крысы на протяжении 14 дней прошли одинаковую акклиматизацию с последующим содержанием в условиях вивария РГП на ПХВ НАО «МУК». Каждая группа животных содержалась в клетках при оптимальной для биологических процессов температуре 18-22°С соблюдением дневного и ночного режимов (12 часов - при свете, 12 часов - в темноте) и соблюдением стандартного рациона питания и питья.

Все манипуляции над животными проводились согласно стандартным операционным процедурам (Приложение А) в условиях асептики и антисептики, при минимизации стресса, все инвазивные процедуры под общей анестезией.

Животные выводились из эксперимента в состоянии наркоза путем обескровливания в результате забора крови внутрисердечной пункцией, что соответствует пункту М3.13.1 Руководства по эвтаназии животных Американской ассоциации ветеринаров “AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition”.

По окончании проведения лабораторных исследований все экспериментальные животные списаны и утилизированы в соответствии с пунктом 52 Постановления Правительства РК от 07.08.2012 № 1030 о внесении изменений и дополнений в постановление Правительства Республики Казахстан от 21 декабря 2011 года №1576 «Об утверждении Правил отбора проб перемещаемых (перевозимых) объектов и биологического материала».

2.3 Материалы исследования

Объектом исследования являлись крысы с имплантированным изучаемым материалом отечественного производства - децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины, полученный методом двойного цикла децеллюляризации детергентферментативным методом с последующей стерилизацией гамма-излучением париетальной брюшины крупного рогатого скота [20, с.67] (рисунок 3). В качестве сравниваемого материала брали бесклеточный коллаген Пермакол («Permacol», Covidien,

США), полученный из свиной дермы и уже используемый в клинической реконструктивной хирургии при герниопластике.



Рисунок 3 – опытный образец внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Данное экспериментальное исследование проведено на 146 белых зрелых крысах с массой тела в диапазоне 180-220 г. Выбор объекта исследования обусловлен выносливостью и резистентностью данных животных к различным патологическим инфекциям. Для рандомизации в группы включались лабораторные крысы обоих полов, сопоставимые по массе ($\pm 10\%$), без внешних признаков патологии, с присвоением каждой особи идентификационного номера.

2.4 Анестезия лабораторных животных

Имплантация изучаемых материалов и забор материалов исследования производились согласно нормативам в области биомедицинских исследований под общим эфирным наркозом. Для этого крысу помещали в индукционную камеру объёмом 3 л с 3мл диэтилового эфира («Реахим», Россия), время экспозиции составляло 5 мин. Техника эфирной анестезии и расчет дозировки определялась на основе СОП (Приложение А).

2.5 Первичная сенсibilизация экспериментального животного

Перед началом эксперимента осуществлялась первичная сенсibilизация экспериментального животного в соответствии с видом используемого тестируемого образца в клинике – посредством вшивания биоимплантата в переднюю брюшную стенку. После введения крысы в наркоз, производилась фиксация животного, подготовка операционного поля, и далее – моделирование дефекта передней брюшной стенки: после сбривания шерсти на вентральной поверхности тела животного, в асептических условиях производился разрез кожи вдоль белой линии, а затем вырезался фрагмент передней брюшной стенки размером 15мм*15мм (рисунок 4).

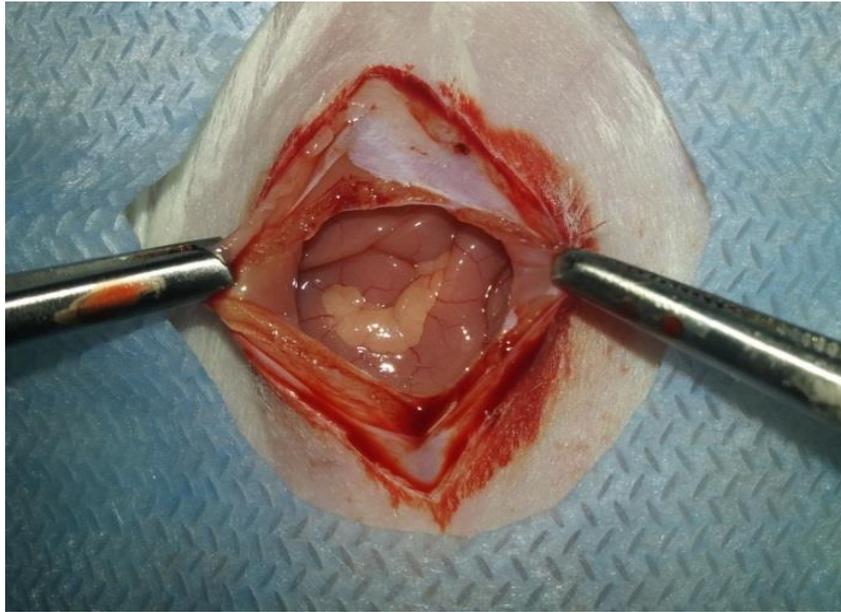


Рисунок 4 – Формирование дефекта передней брюшной стенки

Далее производилась пластика полученного дефекта передней брюшной стенки внеклеточным матриксом ксенобрюшины или биоимплантатом Permacol, размер имплантата 15мм*15мм, согласно групповому разделению. Изучаемые материалы фиксировались к мышечному массиву передней брюшной стенки шелковой нитью 4/0 на атравматичной игле по методу inlay (рисунок 5, 6).



Рисунок 5 – фиксация имплантатов к передней брюшной стенке

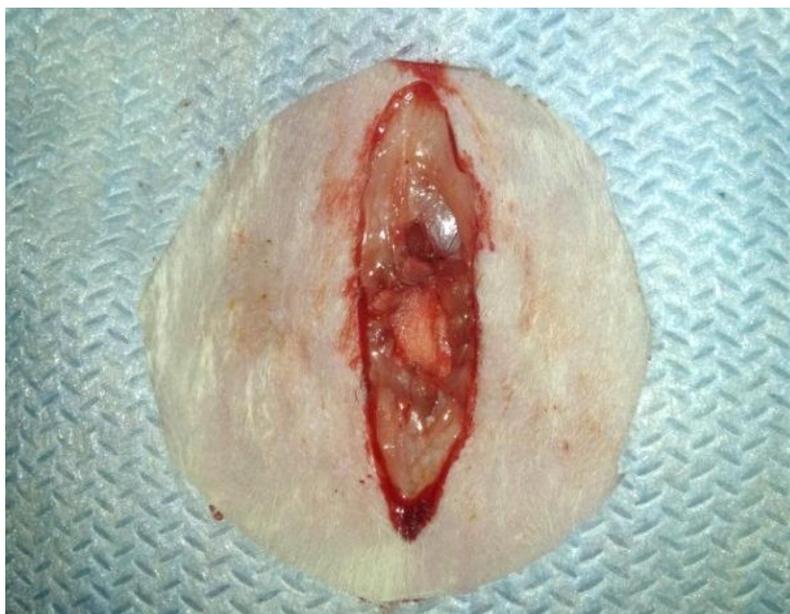


Рисунок 6 – окончательный вид имплантации

Послеоперационное наблюдение включало в себя мониторинг общего состояния животных, двигательная активность, аппетит, реакция на световые и звуковые раздражители, состояние кожного покрова. Зона имплантации оценивалась по состоянию операционной раны, скорости ее заживления, состоянию швов. С целью профилактики раневой инфекции в послеоперационном периоде каждая крыса получала курс антибактериальной терапии препаратом энрофлоксацин (торговое название «Энфлорекс», изготовитель World-Vet, производство Турция) в дозировке 0,1 мл – 10 мг.

2.6 Забор крови у лабораторных животных

Забор крови для лабораторных исследований производился у животных путем внутрисердечной пункции с последующим выведением животного из эксперимента, в сроки, согласно дизайну исследования. Для этого, после введения животного в эфирный наркоз и фиксации его к предметному столику, острым путем производили раскрытие грудной клетки, визуально определяли верхушку сердца, и под углом 30 градусов производили пункцию левого желудочка, при этом постоянно потягивая поршень на себя (рисунок 7).

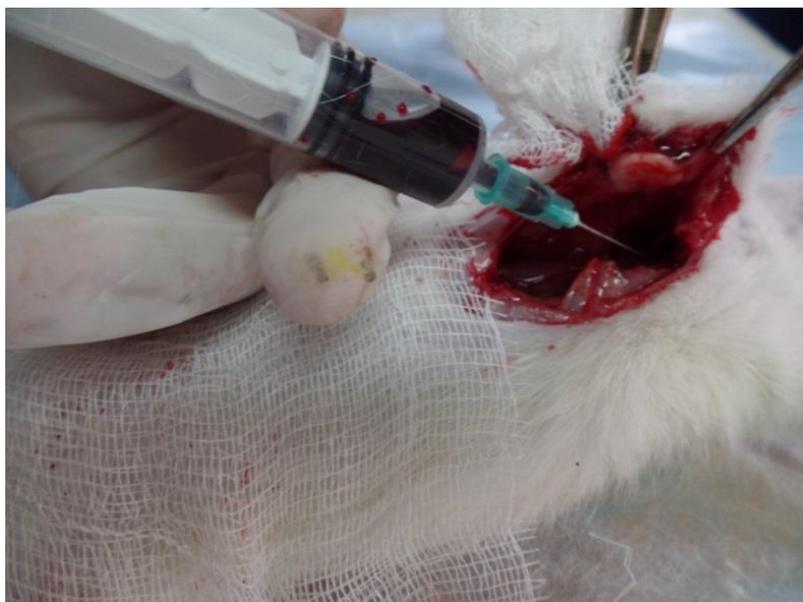


Рисунок 7 - Забор крови путем внутрисердечной пункции

При появлении крови в шприце продвижение иглы прекращалось, и производился забор 5 мл крови, что и являлось способом выведения животного из эксперимента, рекомендованным Американской ассоциацией AVMA Guidelines. Пробирки с образцами крови помещались в контейнер.

2.7 Методы выявления антигенных свойств

На 3 сутки после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена Remasol проводилась эпикутанная сенсibilизация. Данная проба проводилась путем 20 повторных накожных аппликаций и использовалась для выявления реакции гиперчувствительности «немедленного» типа. Исследование выполнено на группах животных, сформированных по однородной массе тела по 10 особей в каждой. На выстриженный участок кожи боковой поверхности туловища экспериментального животного укладывали биоимплантат размером 10мм*10мм, время экспозиции – 5 минут (рисунок 8). Аппликации производились на протяжении 4 недель по 5 раз в неделю.



А) ксенобрюшина



В) Permacol

Рисунок 8 – Накожная аппликация исследуемыми имплантатами

Наблюдение за общим состоянием, поведением, двигательной активностью животных велось в течение всего периода постановки пробы. Особое внимание уделялось состоянию кожи в месте контакта с биоимплантатом. Реакцию кожи учитывали ежедневно по шкале оценки кожных проб согласно Колхир П.В. [160] (таблица 1).

Таблица 1 – Шкала оценки кожных проб

Балл	Результаты наблюдения
0	Изменения кожи отсутствуют
1	Не сливающаяся эритема, единичные папулы
2	Сливающаяся эритема, папулы, везикулы
3	Выраженная гиперемия, отек,
4	Гиперемия + зуд + папула + везикулы

Тестирование животных проводилось дважды – после 10 и 20 аппликаций.

Конъюнктивная проба проводилась на 7 сутки после операции на 20 экспериментальных животных. Для постановки пробы были использованы водные растворы внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена Permacol, полученные путем гомогенизации материала в жидком азоте. Для этого, образец биоимплантата размером 10мм*10мм - замораживали в жидком азоте и растирали в ступке до порошкообразной консистенции, разводили в 1,0 мл стерильного физиологического раствора. Полученная мелко-дисперсионная взвесь явилась материалом для проведения пробы (рисунок 9, 10).



Рисунок 9 – Гомогенизированный образец ксенобрюшины



Рисунок 10 – Готовый образец водного раствора ксенобрюшины

При помощи пластиковой пипетки с мягким, вытянутым концом экспериментальному животному из опытной группы вводили одну каплю суспензии внеклеточного матрикса ксенобрюшины на конъюнктиву левого глаза (рисунок 11). На конъюнктиву правого глаза, с минимальным временным разрывом закапывался физиологический раствор (контроль) (рисунок 12).

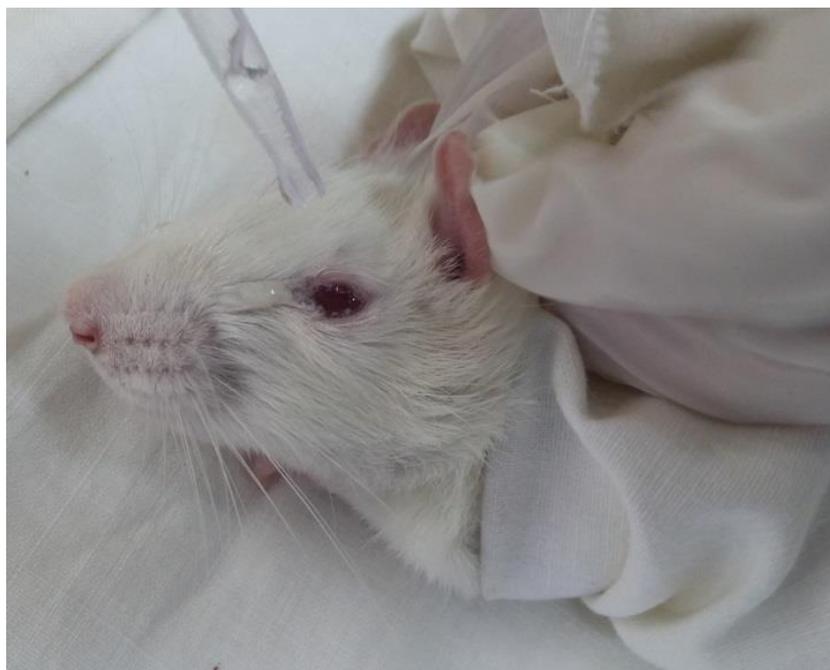


Рисунок 11 – Введение суспензии ксенобрюшины на конъюнктиву левого глаза

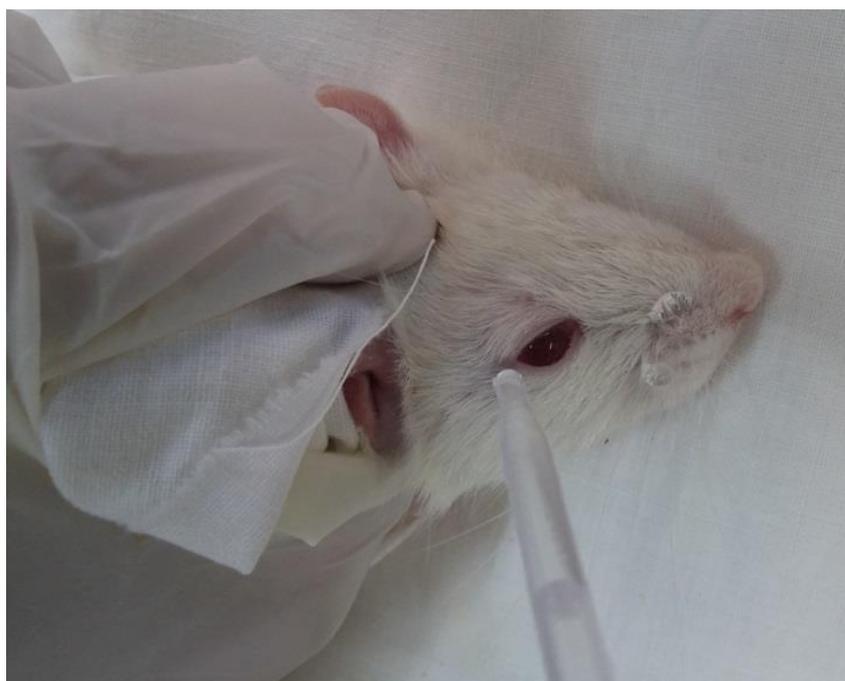


Рисунок 12 – Введение физиологического раствора (контроль) в правый глаз

Аналогичным способом проведена проба в группе сравнения с введением на конъюнктиву глаза суспензию ацеллюлярного дермального коллагена Permasol (рисунок 13).



Рисунок 13 – Введение суспензии Permasol на конъюнктиву левого глаза

Реакцию учитывали через 15 минут и через 24 - 48 часов и оценивали в баллах по следующей шкале согласно Колхир П.В [142]. (таблица 2).

Таблица 2 – Шкала оценки конъюнктивальной пробы

Балл	Результаты наблюдения
0	Изменения отсутствуют
1	Незначительная гиперемия слезного протока
2	Гиперемия слезного протока и склеры по направлению к роговице
3	Гиперемия всей конъюнктивы и склеры. Возможен зуд.

Для изучения *реакции гиперчувствительности «замедленного» типа* 20 животным на 21 день после операции на выстриженный участок дорзальной поверхности тела, у основания хвоста, вводился внутрикожно водный раствор в объеме 0,05 мл, содержащий диспергированные внеклеточный матрикс ксенобрюшины и ацеллюлярный дермальный коллаген Permasol (рисунок 14). Приготовление данных растворов описано выше (см. *конъюнктивальная проба*).



Рисунок 14 – Внутрикожное введение водного раствора ксенобрюшины

Так как представленные биологические имплантаты могут являться активатором клеточного и трансплантационного иммунитета, они не нуждаются в дополнительной поддержке полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Через 1 час, 24 часа и 48 часов учитывали реакцию на наружной поверхности кожи в месте инъекции и оценивали в баллах по шкале согласно Колхир П.В. [160] (таблица 3).

Таблица 3 – Шкала оценки иммунокомплексной реакции

Балл	Результаты наблюдения
0	Изменения отсутствуют
1	Бледно-розовая эритема
2	Ярко-розовая эритема
3	Красная эритема
4	Инфильтрация и отек кожи
5	Выраженная инфильтрация, корочки, геморрагии

2.8 Биохимические и иммунологические методы анализа

По завершении исследования сенсibilизирующего действия внеклеточного матрикса ксенобрюшины и изучения иммунологических постимплантационных реакций, в плазме крови определяли содержание ЦИК, СРБ, ФНО- α , ИЛ-2, КРФ, вкДНК, вкРНК, гистонopodobные белки.

Биохимические методы исследования проводились на базе кафедры молекулярной биологии НАО «МУК».

Иммунологические методы проводились в лаборатории коллективного пользования научно-исследовательского центра НАО «МУК».

2.8.1 Определение уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови крыс

Циркулирующие иммунные комплексы представляют собой комплексы антиген-антитело, образующиеся как ответ гуморальной иммунной системы на чужеродный агент. В результате образования и отложения таких комплексов возникает гиперчувствительность III типа. В результате циркуляции больших титров таких комплексов происходит их накопление в тканях, либо отложение на стенках сосудов, вследствие чего происходит повреждение структур за счет активации комплемента и других иммунных воспалительных элементов. Выраженность воспалительного процесса зависит как от локализации иммунных комплексов, так и их размеров [161].

Согласно дизайну исследования, для определения циркулирующих иммунных комплексов использовался метод преципитации из сыворотки крови комплексов антиген-антитело в растворе полиэтиленгликоль-6000 (ПЭГ-6000) (AppliChem, Germany), приготовленном с использованием 0,1М боратного буфера (рН 8,4), с последующим фотометрическим определением оптической плотности преципитата [162].

Детекция высокомолекулярных (ВМ) ЦИК осуществлялась с помощью раствора ПЭГ-6000 в концентрации 3,5%, среднемолекулярных (СМ) ЦИК – 5% раствор ПЭГ-6000, для низкомолекулярных (СМ) ЦИК использовался 7% раствор ПЭГ-6000. Опытные образцы сывороток получали путем отстаивания порции крови экспериментального животного без добавления антикоагулянта в течение 120 минут. Далее полученные сыворотки разводились в 3 раза боратным буфером (рН 8,4), после чего в 3 пробирки соответственно концентрациям (3,5%, 5%, 7%), добавляли по 1,8 мл раствора ПЭГ-6000, в контрольную пробирку – 1,8 мл боратного буфера. Затем, разведенные образцы сыворотки в объеме 200 мкл добавляли в пробирки с растворами ПЭГ-6000 и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Оптическая плотность преципитата определялась при длине волны 450 нм. Производился расчет разности показателей оптической плотности преципитата между контрольной и опытными пробами, полученный результат умножали на 1000 с получением условных единиц содержания ЦИК в 1,0 мл сыворотки.

2.8.2 Определение иммунологических маркеров в сыворотке крови крыс

С-реактивный белок (СРБ) - один из ранних и чувствительных маркеров воспаления участвующий в активации комплемента. Поскольку система комплемента представляет собой эффектор антиксеногенной цитотоксичности, СРБ служит ранним фокусом для гетерогенной аккомодации [163]. В трансплантологии при гладком течении послеоперационного периода наблюдается повышение концентрации СРБ с пиком на 2-3 день и последующим постепенным его снижением [164].

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) – продуцируется макрофагами, имеет выраженное системное провоспалительное действие, запускает цитотоксические эффекты и способствует отторжению материала. Нормализация уровня ФНО является маркером благоприятного приживления имплантата. Цитокины данной категории продуцируются активированными мононуклеарными фагоцитами, эндотелиальными клетками, активированными НК-клетками, антигенстимулированными Т-клетками (CD4+ и CD8+) [165, 166].

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) - является главным ростовым фактором Т-лимфоцитов. ИЛ-2 стимулирует дифференцировку, пролиферацию всех клонов Т-лимфоцитов, натуральных киллеров, В-лимфоцитов, эозинофилов, тромбоцитов. ИЛ-2 стимулирует не только количественные, но и функциональные способности: усиливает антигенпрезентацию, активирует цитотоксическую активность натуральных киллеров, активирует синтез антител. Активированные Т-лимфоциты являются основными медиаторами иммунологического ответа отторжения имплантата [167-169].

Данные компоненты определяли методом твердофазного хромогенного иммуноферментного анализа с использованием наборов Rat C-Reactive Protein Elisa Kit, Rat TNF alpha Platinum Elisa Kit, Rat IL-2 Platinum Elisa Kit производства Affymetrix eBioscience на ИФА-роботизированной станции Эволис (БиоРад) согласно инструкции производителя.

2.8.3 Определение внеклеточных нуклеиновых кислот в сыворотке крови крыс

В крови определяли уровни внеклеточных нуклеиновых кислот (вкДНК и вкРНК) и их предшественников-кислоторастворимые фракции (КРФ).

Динамика изменения уровня вкНК и КРФ фиксировали по методу Л.И. Маркушевой и соавторов. Измерительная единица- мкг/мл [170].

В пробирке смешивали 1мл крови и 5 мл 0,5 н раствор хлорной кислоты, полученную смесь центрифугировали со скоростью 5000 об/мин в течение 15 мин. Верхний жидкостной слой использовали для подсчета КФР. Осадок снова смешивали с 10мл 10% хлорной кислотой, настаивали при температуре 37° и повторно центрифугировали с вышеуказанной скоростью в течении 15 минут. Верхний слой использовали для определения вкРНК, затем осадок смешивали с 3мл 10% хлорной кислотой и настаивали 7 минут при температуре 70° и снова центрифугировали в таких же условиях. Верхний слой содержимого пробирки использовали для определения вкДНК. Гидролизаты НК и КРФ анализировали методом спектрофотометрии с использованием длины волны 290 нм.

2.8.4 Определение гистоноподобных белков в сыворотке крови крыс

Количественное определение фракций гистоноподобных белков реализовано спектрофотометрическим методом с использованием биуретового реактива и длины волны 330 нм. Предварительно выделяли

растворы фракций гистоноподобных белков. Для этого смешивали 1 мл плазмы крови с 2 мл 5% хлорной кислоты и настаивали при температуре 0-4 С° в течении часа, далее раствор проходил цикл центрифугирования в течении 15 минут при скорости 1000 оборотов в минуту. Таким образом надосадочная жидкость использовалась для определения Н1 фракции гистоноподобных белков. Для получения раствора фракции Н2А-Н3-Н4 гистоноподобных белков оставшийся осадок смешивали с 3мл спиртового раствора и настаивали в течении 18 часов в условиях температуры 0-4 С°, затем раствор проходил аналогичный цикл центрифугирования. Раствор фракции гистоноподобных белков Н2В приготавливался при смешивании в пробирке оставшегося осадка и 2 мл 0,25 М соляной кислоты, настаивании в течении 15 мин при температуре 0-4 С° и центрифугировали в течении 10 мин [170].

2.9 Методы статистической обработки данных

Статистические расчеты данных исследования выполнялись с помощью программ IBM SPSS Statistics 22.0 и табличного процессора Microsoft Excel. Для сравнения количественных признаков между выборками, производился расчет медианы (Me) и интерквартильного интервала (IQR), так как распределение отличное от нормального. Для сравнения вычисленных медианных значений показателей между 2 независимыми группами использовался непараметрический критерий Mann-Whitney. Проверка статистических гипотез на наличие значимого уровня различий между группами считалось при $p < 0,05$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Оценка общего состояния лабораторных животных после имплантации биологических материалов

В постимплантационном периоде среди экспериментальных животных смертность отсутствовала. Состояние крыс расценивалось как удовлетворительное. Поведенческие реакции в ответ на световые и звуковые раздражители, а также пищевое поведение не изменилось, и было сопоставимо между экспериментальной группой и группой сравнения. Патологических изменений со стороны волосяного и кожного покрова, а также со стороны слизистых оболочек за период наблюдения не зарегистрировано. В течение эксперимента наблюдалась положительная динамика массы тела крыс (Таблица 4).

Таблица 4 – Динамика массы тела экспериментальных крыс

Группы	Динамика массы (г), сутки после начала опыта												Прирост массы тела, г
	Фон		Период наблюдения (сутки)										
			5		14		21		30		90		
	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR	
Ксенобрюшина	189	12	193	9,5	213	8,6	228	11	236	7,4	345	16	+ 158
«Permacol»	187	14	192	10,3	216	9,3	231	13,5	242	10,6	352	17,6	+ 165
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05

Примечания: Me- медиана значений; IQR- межквартильный интервал;
p – показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с группой сравнения;

Анализ данных таблицы 4 показывает стойкую и сопоставимую динамику прироста массы тела после операции как в группе с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины, так и в группе с биоимплантатом «Permacol» на всем протяжении наблюдения. Статистически значимых отличий между исследуемой группой и группой сравнения не выявлено.

Учитывая вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что хирургическое вмешательство и наличие биоматериала не оказывает значимого влияния на общее состояние экспериментального животного, на его пищевое поведение, что подтверждается уверенным приростом массы тела в течение всего эксперимента.

3.2 Результаты оценки сенсibiliзирующих свойств биологических материалов

В ходе проведения эпикутанной сенсibiliзации по выявлению реакции гиперчувствительности «немедленного» типа путем 20 повторных кожных аппликаций у всех животных в исследуемой группе, где

применялся внеклеточный матрикс ксенобрюшины, и группе сравнения, с использованием ацеллюлярного дермального коллагена «Permasol», не было отмечено видимых изменений в области непосредственного контакта имплантатов с поверхностью кожи на всем сроке наблюдения (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты оценки эпикутанной сенсibilизации

Сроки наблюдения	Внеклеточный матрикс ксенобрюшины				Ацеллюлярный дермальный коллаген Permasol			
	I нед	II нед	III нед	IV нед	I нед	II нед	III нед	IV нед
1 сут	0	0	0	0	0	0	0	0
2 сут	0	0	0	0	0	0	0	0
3 сут	0	0	0	0	0	0	0	0
4 сут	0	0	0	0	0	0	0	0
5 сут	0	0	0	0	0	0	0	0

Согласно шкале оценки кожных проб у всех экспериментальных животных «0» баллов – изменения кожи отсутствуют (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Состояние кожи после 20 аппликаций внеклеточным матриксом ксенобрюшины

При постановке конъюнктивной пробы с использованием гомогенизированного в жидком азоте образца внеклеточного матрикса ксенобрюшины в опытной группе не было зарегистрировано ни одного случая быстрой (в течение первых 15 минут) или отсроченной (через 24-48 часов) аллергической реакции (рисунок 16).



Рисунок 16 – Неизменная конъюнктура левого (опытного) глаза после воздействия водным раствором внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Аналогичные результаты получены в группе сравнения, где для вторичной сенсibilизации был применен гомогенизированный ацеллюлярный дермальный коллаген Permacol. Изменений конъюнктивы левого (опытного) глаза в обеих группах по отношению к правому глазу (контроль) не отмечено (таблица 6).

Таблица 6- результаты оценки конъюнктивальной пробы

Вид имплантата	Сроки наблюдения		
	15 минут	24 часа	48 часов
Внеклеточный матрикс ксенобрюшины	0	0	0
Ацеллюлярный дермальный коллаген Permacol	0	0	0

По результатам наблюдения, согласно шкале оценки конъюнктивальной пробы, у всех экспериментальных животных «0» баллов – изменения отсутствуют.

При изучении реакции гиперчувствительности «замедленного» типа в опытной группе с использованием водного раствора диспергированного внеклеточного матрикса ксенобрюшины в качестве потенциального аллергена, признаков формирования реакции гиперчувствительности «замедленного» типа через известные временные интервалы – 1 час, 24 часа и 48 часов в месте инъекции не обнаружено (рисунок 17).



Рисунок 17 – Отсутствие изменений наружной поверхности кожи в месте инъекции водного раствора внеклеточного матрикса ксенобрюшины

Идентичные результаты получены в группе сравнения, где внутрикожно был введен диспергированный ацеллюлярный дермальный коллаген Permacol (таблица 7).

Таблица 7– Результаты оценки гиперчувствительности «замедленного» типа

Вид имплантата	Сроки наблюдения		
	1 час	24 часа	48 часов
Внеклеточный матрикс ксенобрюшины	0	0	0
Ацеллюлярный дермальный коллаген Permacol	0	0	0

Согласно шкале оценки иммунокомплексной реакции у всех животных в обеих группах «0» баллов – изменения отсутствуют.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что исследуемый имплантат – внеклеточный матрикс ксенобрюшины, равно как и материал сравнения, не вызывает гиперчувствительности «немедленного» типа при постановке эпикутанной и конъюнктивальной проб. Ни у одного из животных не зафиксировано признаков развития аллергической реакции. Проба на гиперчувствительность «замедленного» типа также дала отрицательный

результат у всех животных. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии в исследуемом биологическом имплантате высокомолекулярных и белковых примесей.

3.3 Результаты определения содержания циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови

Результаты определения содержания циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови экспериментальных животных после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена Permasol представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Циркулирующие иммунные комплексы в сыворотке крови экспериментальных животных исследуемых групп

Группа	Срок	ВМ ЦИК, усл.ед		p1	z	СМ ЦИК, усл.ед		p1	z	НМ ЦИК, усл.ед		p1	z
		Me	IQR			Me	IQR			Me	IQR		
Контроль	-	6,0	5,8	-	-	5,6	7	-	-	3,0	6	-	-
Permasol	7 дней	31,87	13	0,01	-2,44	6,37	5	0,53	0,62	12,25	10,5	0,05	-1,94
	14 дней	46,87	17,5	0,01	-2,44	52,75	22	0,01	-2,44	69,5	45	0,01	-2,45
	21 дней	71,54	22	0,01	-2,44	80,8	44	0,01	-2,45	113,2	67,5	0,01	-2,44
	30 дней	82,37	34	0,01	-2,46	69,25	35	0,01	-2,46	80,62	28	0,01	-2,44
	90 дней	5,55	6	0,11	0,65	10,2	8	0,05	1,76	7,1	6,1	0,08	0,71
Ксенобрюшина	7 дней	11,77	15	0,05	-2,94	4,5	4	0,21	0,63	4,6	4,5	0,06	-2,10
	14 дней	10,87	7	0,05	-3,25	19,25	16,5	0,03	-2,84	40,87	45	0,02	-1,57
	21 дней	21,5	25	0,02	-3,27	39,5	23	0,01	-2,53	76,5	17	0,01	-1,68
	30 дней	43,5	20	0,01	-3,26	24,73	11	0,03	-3,36	55,3	23,5	0,01	-2,21
	90 дней	6,75	6,5	0,12	-0,63	10,4	8	0,05	-1,78	6,5	5,9	0,07	-0,69
p2	7 дней	0,041		-	-0,81	0,01		-	1,23	0,034		-	-0,61
	14 дней	0,049		-	-1,22	0,05		-	-1,94	0,045		-	-2,06
	21 дней	0,030		-	-1,64	0,020		-	-2,47	0,041		-	-2,47
	30 дней	0,031		-	2,44	0,028		-	2,44	0,023		-	2,45
	90 дней	0,67		-	-0,59	0,81		-	1,23	0,67		-	-0,65

Примечания: Me- медиана значений; IQR- межквартильный интервал; z- значение критерия Манна- Уитни; p1 - показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с контролем; p2 - показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с группой сравнения.

Анализ данных таблицы 8 свидетельствует о кратном повышении уровня ЦИК в группе с применением имплантата «Permacol» на 7 сутки после имплантации, повышение показателей преимущественно отмечается за счет высокомолекулярной фракции (31,87 усл.ед., $p \leq 0,05$). Пиковые значения ЦИК были зарегистрированы к 21 суткам в двух фракциях из трех, с преобладанием низкомолекулярных иммунных комплексов (113 усл.ед., $p \leq 0,05$). К 30 суткам наблюдается снижение среднемолекулярных и низкомолекулярных фракций, в общей сложности превысив 10-кратное увеличение от контрольных значений (69,25 усл.ед и 80,62 усл.ед против 5,6 усл.ед и 3,0 усл.ед соответственно, $p \leq 0,05$).

В опытной группе, где был использован внеклеточный матрикс ксенобрюшины к 7-му дню постимплантационного периода уровень ВМ ЦИК составлял 11,77 усл.ед, в сравнении с контрольными значениями - 6,0 усл.ед статистически значимых различий в данный срок наблюдения не выявлено ($p \geq 0,05$). Отмечается статистически значимый подъем показателей к 21 суткам наблюдения, преимущественно за счет низкомолекулярной фракции ЦИК (76 усл.ед, $p \leq 0,05$). При сравнительном межгрупповом анализе всех трех фракций ЦИК, статистически значимые изменения регистрируются на каждом временном промежутке послеоперационного мониторинга (таблица 8). Тем не менее, к 90-му дню наблюдается уверенная тенденция снижения ЦИК всех фракций, достигая практически контрольных показателей. Статистически значимых различий между показателями опытной группы и группы сравнения на 90 сутки наблюдения не выявлено ($p \geq 0,05$).

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что синхронный подъем уровня среднемолекулярных и низкомолекулярных ЦИК в обеих группах, с пиком к 21-му дню, обусловлен операционной травмой, реакцией на повреждение, острым асептическим воспалением. В группе с внеклеточным матриксом ксенобрюшины, равно как и в группе с ацеллюлярным дермальным коллагеном Permacol, после 21 суток наблюдается стойкое снижение уровня ЦИК среднего и малого размеров, как наиболее патогенных элементов, способных активировать систему комплемента, что свидетельствует об отсутствии признаков хронизации воспалительного процесса и отторжения имплантата [171].

3.4 Результаты определения иммунологических маркеров воспаления.

Показатели иммунологических маркеров приведены на таблице 9. Для объективного контроля над воспалительным процессом и реакцией отторжения имплантата были выбраны ФНО, ИЛ-2 и СРБ, отражающие специфический и неспецифический клеточный иммунный ответ, который играет ключевую роль в реакциях отторжения.

Таблица 9. Иммунологические маркеры воспаления в сыворотке крови экспериментальных животных исследуемых групп

Группа	Срок	ФНО пг/мл		p1	z	ИЛ-2 пг/мл		p1	z	СРБ мкг/мл		p1	z
		Me	IQR			Me	IQR			Me	IQR		
		Контроль	-			1,64	1,71			-	-		
Permasol	7 дней	7,81	7,60	0,02	-2,32	10,98	2,07	0,02	-2,32	904,66	97,00	0,02	-2,32
	14 дней	9,46	6,41	0,02	-2,23	16,85	2,41	0,02	-2,23	634,44	73,00	0,02	-2,23
	21 дней	7,42	10,09	0,03	-2,06	7,59	2,89	0,19	-1,29	382,66	47,00	0,05	-1,95
	30 дней	2,29	1,49	0,6	-0,51	8,16	2,89	0,19	-1,29	325,66	145,00	0,15	-1,42
	90 дней	2,81	2,59	0,3	-1,03	8,13	5,20	0,07	-1,8	236,5	72,00	0,69	-0,36
Ксенобрюшина	7 дней	7,31	5,46	0,02	-2,32	13,12	7,34	0,03	-2,06	813,66	199,0	0,02	-2,32
	14 дней	4,78	1,49	0,03	-2,07	14,21	7,68	0,04	-2,06	364,33	137,0	0,06	-1,81
	21 дней	3,88	2,39	0,03	-2,06	9,18	4,79	0,03	-1,03	297,66	104,0	0,29	-1,05
	30 дней	3,38	2,39	0,98	-1,64	7,12	2,08	0,17	-1,34	220,44	53,0	0,87	0,15
	90 дней	2,61	2,69	0,3	-1,03	4,98	3,55	0,98	0,0	221,55	140,0	0,6	-0,51
p2	7 дней	0,87		-	-0,16	0,20		-	1,2	0,37		-	-0,88
	14 дней	0,04		-	-1,64	0,46		-	-0,73	0,006		-	-2,74
	21 дней	0,02		-	-0,80	0,64		-	0,32	0,05		-	-1,77
	30 дней	0,04		-	1,82	0,52		-	-0,64	0,05		-	1,84
	90 дней	0,06		-	-0,48	0,03		-	-2,08	0,87		-	-0,16

Примечания: Me- медиана значений; IQR- межквартильный интервал; z- значение критерия Манна- Уитни; p1 - показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с контролем; p2 - показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с группой сравнения.

В опытной группе, где был использован внеклеточный матрикс ксенобрюшины, максимальная концентрация ФНО зафиксирована на 7 сутки – 7,31 пг/мл, превысив исходные показатели в 4,3 раза. В динамике отмечается тенденция к снижению уровня ФНО, с нормализацией показателя к 90 суткам после операции и сравнялся с контрольными значениями – 2,61 пг/мл ($p > 0,05$).

В группе сравнения, где в качестве пластического материала использовался «Permasol», в период с 7 по 21 сутки послеоперационного периода уровень ФНО статистически значимо превышал контрольные величины ($p < 0,05$), достигая при этом пиковых значений – 9,46 пг/мл к 14 суткам наблюдения, и превышая исходные показатели в 5,7 раз. В последующем отмечается снижение концентрации ФНО к 30 суткам

наблюдения и сохранением данного уровня до 90 суток (отсутствие статистически значимых различий с контролем, $p > 0,05$).

Сравнительный анализ уровня ФНО в двух группах показал, что пиковые значения в группе сравнения достоверно выше ($p < 0,05$) чем в опытной группе.

Динамика повышения концентраций ИЛ-2 первые 14 дней была схожа в обеих группах, достигая при этом пиковых значений: в опытной группе – 14,21 пг/мл, в группе сравнения – 16,85 пг/мл, превысив исходные показатели в 2,9 и 3,4 раза соответственно. В последующем, отмечается стойкая тенденция к снижению уровня ИЛ-2, однако к 90 суткам послеоперационного периода сохраняется повышенный уровень ИЛ-2 в группе сравнения (8,13 пг/мл) по отношению как к контрольным значениям (4,87 пг/мл), так и к показателям опытной группы (4,98 пг/мл, $p < 0,05$).

Уровень СРБ резко и статистически значимо поднялся к 7 дню послеоперационного периода в обеих группах. Однако в опытной группе нормализация концентраций СРБ отмечается на 14 день с отсутствием статистически значимых различий по отношению к исходному уровню, а в группе сравнения к 30 суткам ($p > 0,05$). На сроках 14, 21, 30 суток в группе с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины показатель СРБ был достоверно ниже, чем в группе с применением Permacol ($p < 0,05$). В срок 90 суток концентрация СРБ оставалась на уровне исходных значений, не отличалась от контрольных показателей и между группами.

Таким образом, при оценке иммунологической реакции отторжения имплантата динамика концентраций иммунологических маркеров в обеих группах на протяжении 90 суток наблюдения была схожа, отражала физиологическое течение послеоперационного периода, реакцию организма на операционную травму с тенденцией к снижению показателей на более поздних сроках. На 90 сутки после имплантации показатели СРБ, ФНО, ИЛ-2 в обеих группах статистически значимо снижались от пиковых значений ($p < 0,05$), приближаясь к исходным концентрациям. Однако в группе с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины неспецифический воспалительный процесс был менее выражен как по длительности, так и по силе. На основании вышеизложенного, применяемый в хирургической практике ацеллюлярный дермальный коллаген Permacol, не имеет преимуществ перед изучаемым биологическим имплантатом-внеклеточным матриксом ксенобрюшины в сравнительной оценке иммунологических реакций отторжения имплантата [172, 173].

3.5 Результаты исследования гистоноподобных белков, внеклеточных нуклеиновых кислот после имплантации исследуемых биоматериалов

Нами проведено изучение особенностей изменения уровней различных фракций гистоноподобных белков, внеклеточных нуклеиновых кислот и их предшественников (по показателям кислоторастворимой фракции) в крови экспериментальных животных, проведено сравнение содержания,

гистоноподобных белков в крови при использовании внеклеточного матрикса ксенобрюшины и материала сравнения «Permasol».

Результаты исследования показателей гистоноподобных белков в плазме крови представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Показатели гистоноподобных белков в плазме крови у крыс после имплантации

Группа	Срок	Н1		p1	z	Н2А,Н3,Н4		p1	z	Н2В		p1	z
		усл.ед/мл				усл.ед/мл				усл.ед/мл			
		Me	IQR			Me	IQR			Me	IQR		
Контроль	-	0,82	0,21	-	-	0,56	0,12	-	-	0,48	0,46	-	-
Permasol	7 дней	1,16	0,24	0,03	0,24	1,21	0,14	0,01	2,54	1,57	0,04	0,02	0,23
	14 дней	1,29	0,21	0,02	0,17	1,26	0,22	0,01	2,37	1,38	0,02	0,03	1,01
	21 дней	1,0	0,48	0,04	0,35	1,44	1,10	0,02	2,2	0,86	0,01	0,04	0,03
	30 дней	0,82	0,07	0,06	2,71	0,55	0,34	0,06	2,71	0,51	0,06	0,06	2,71
	90 дней	0,81	0,15	0,06	2,71	0,41	0,21	0,06	2,71	0,50	0,07	0,06	2,71
Ксенобрюшина	7 дней	1,31	0,20	0,03	-0,84	1,14	0,06	0,01	2,37	1,43	0,07	0,04	1,36
	14 дней	1,32	0,34	0,02	-1,52	1,31	0,21	0,01	2,37	1,31	1	0,01	0
	21 дней	1,24	0,19	0,04	-1,35	1,35	0,08	0,01	2,52	0,88	0,02	0,04	-0,17
	30 дней	0,87	0,28	0,06	-2,77	1,12	0,12	0,01	2,71	0,55	0,05	0,49	0,67
	90 дней	0,79	0,11	0,06	2,71	0,58	0,30	0,05	2,71	0,52	0,06	0,01	2,71
p2	7 дней	0,05		-	1,89	0,17		-	-1,36	0,75		-	-0,31
	14 дней	0,08		-	1,15	0,91		-	0,10	0,91		-	0,10
	21 дней	0,01		-	2,41	0,83		-	0,21	0,98		-	2,62
	30 дней	0,05		-	3,36	0,01		-	3,36	0,97		-	3,36
	90 дней	0,06		-	-0,57	0,34		-	-0,94	0,91		-	0,10

Примечания: Me- медиана значений; IQR- межквартильный интервал; z- значение критерия Манна- Уитни; p1 - показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с контролем; p2 - показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с группой сравнения.

Полученные данные о содержании гистоноподобных белков в крови после имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины, свидетельствуют о повышенном содержании фракции Н1 в обеих группах с пиковым значениями к 14 суткам наблюдения в обеих группах, превышающего данный показатель контрольной группы в 1,6 и в 1,4 раз соответственно. Тренд снижения в группе исследуемого препарата более пологий, однако, тенденции на границе статистической значимости – различия между группами достигаются только однажды на сроке 21 день.

Аналогичные тенденции получены для фракции Н2А-Н3-Н4 полученных данных показал статистически значимое повышение гистоноподобных белков в сравниваемых группах уже на 7 сутки эксперимента, с последующим увеличением концентрации и достижением пиковых значений – 1,35 и 1,44 усл.ед/мл на 21 сутки после имплантации. Несмотря на это нормализация данной фракции белков происходит так же к конечным срокам эксперимента, однако в группе сравнения это происходит раньше – к 30 суткам, но и здесь в группе с имплантом ксенобрюшины есть различия с контрольными значениями, но различия между группами не достигают статистических различий.

При изучении фракции Н2В белков определяется схожая картина статистически значимых отличий от группы сравнения в обеих группах исследования с пиковым значением показателей к 14 суткам, однако на завершающем этапе эксперимента уровень показателей не достиг уровня контрольной группы, но статистически значимых отличий от группы сравнения при этом не выявлено ни на одном сроке.

Таким образом, нами была зарегистрирована схожая динамика всех изучаемых показателей гистоноподобных белков в плазме крови экспериментальных животных после применения исследуемых имплантатов.

Результаты исследования внеклеточных нуклеиновых кислот представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Показатели внеклеточных нуклеиновых кислот и плазме крови у крыс после имплантации

Группа	Срок	КРФ		p1	z	вкРНК		p1	z	вкДНК		p1	z
		усл.ед/мл				усл.ед/мл				усл.ед/мл			
		Me	IQR			Me	IQR			Me	IQR		
Контроль	-	0,38	0,04	-	-	0,31	0,13	-	-	0,28	0,03	-	-
Ретмасол	7 дней	0,23	0,29	0,49	0,67	0,31	0,22	0,86	0,17	0,37	0,02	0,04	-2,03
	14 дней	0,29	0,37	0,86	0,17	0,45	0,57	0,01	-1,01	0,37	0,03	0,04	-2,72
	21 дней	0,27	0,11	0,1	-1,61	0,28	0,17	0,73	-0,34	0,43	0,15	0,03	-1,78
	30 дней	0,19	0,24	0,49	0,67	0,34	0,09	0,6	-0,51	0,40	0,07	0,03	-2,54
	90 дней	0,23	0,07	0,006	2,71	0,45	0,03	0,01	-2,54	0,43	0,06	0,03	-2,71
Ксенобрюшина	7 дней	0,29	0,16	0,01	2,37	0,22	0,11	0,73	0,34	0,29	0,09	0,44	-0,76
	14 дней	0,35	0,16	0,73	0,34	0,20	0,12	0,30	1,01	0,35	0,07	0,12	-1,52
	21 дней	0,25	0,17	0,06	1,86	0,26	0,12	0,73	0,34	0,30	0,26	1,0	0,0
	30 дней	0,35	0,21	1,0	0,0	0,23	0,08	0,39	0,84	0,32	0,18	0,61	-0,51
	90 дней	0,21	0,08	0,04	-2,03	0,37	0,14	0,01	2,71	0,37	0,06	0,01	2,71
p2	7 дней	0,75		-	-0,31	0,83		-	-0,210	0,20		-	-1,26
	14 дней	0,91		-	-0,10	0,14		-	-1,47	0,52		-	-0,63
	21 дней	0,01		-	-2,49	0,83		-	-0,21	0,07		-	-1,78
	30 дней	0,20		-	0,84	0,02		-	-2,26	0,01		-	-2,41
	90 дней	0,09		-	1,68	0,20		-	-1,26	0,04		-	-1,99

Примечания: Me- медиана значений; IQR- межквартильный интервал; z- значение критерия Манна- Уитни; p1 - показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с контролем; p2 - показатель статистической значимости различий ($p \leq 0,05$) с группой сравнения.

В плазме животных из опытной группы не зафиксировано значимых различий в содержании КРФ, РНК и ДНК на ранних сроках эксперимента по отношению к группе сравнения и по отношению к контролю. Но в обеих группах есть увеличение содержания и вкРНК и вкДНК на 90 сутки после операции, при этом в группе с ксенобрюшиной несколько ниже, КРФ при этом в этот же срок снижается, вероятно, за счет расхода.

Таким образом, отмечается схожая динамика уровней внеклеточных нуклеиновых кислот и КРФ в плазме крови экспериментальных животных после использования исследуемых имплантатов в обеих группах, что может отражать нарушение целостности клеточных структур в ответ на послеоперационную травму с тенденцией к нормализации показателей за счет снижения кислоторастворимой фракции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие биотехнологий открывает новую эру медицины. Биопротезирование позволяет обходить множество ограничений и предоставляет новые возможности в восстановлении структуры и функций органов, но одновременно ставит и новые проблемы. Это и этические проблемы, технологические, проблема (био)безопасности и толерантности биоматериалов. Общая хирургия также нуждается в новых разработках и одна из насущных проблем — это материалы для пластики грыж брюшной стенки, так как грыжесечение занимают до трети среди операций плановой хирургии. Особенное внимание в этом плане привлекают рецидивирующие грыжи и сложные и комбинированные дефекты с низкой эффективностью традиционных техник герниопластик.

В хирургической практике активно применяются синтетические эндопротезы для протезирования дефектов брюшной стенки. Однако они имеют ряд осложнений: физический дискомфорт, физическое изменение свойств в отдаленные периоды после операции, недостаточная прочность или наоборот эластичность. И несмотря на свою теоретическую биоинертность — инициируют асептическое хроническое воспаление по типу «реакция на инородное тело» и связанные с этим осложнения, включая спаечный процесс, формирование рубцов и гранулем и хроническую боль [174].

Биологические импланты начали применять в хирургии в конце 50х годов. Прогресс технологий консервации и стерилизации делал эндопротезы биологического происхождения более безопасными, удобными и прочными. Примерами являются разработанные импортные материала такие как Surgisis(США), Alloderm(США), Permacol Biological Implant (США), Veritas Collagen Matrix(США), Peri-Guard, FortaGen, FlexHD, Allomax, Tutopatch, SurgiMend [175]. Основными источниками является свиной, бычий и трупный человеческий материал. Каждый вид материала характеризуется своими особенностями - прочностью, реактогенностью, устойчивостью к бактериальной контаминации и связанными с этим клиническими исходами - частотой рецидивов, ранних, поздних отдаленных послеоперационных осложнений и применимостью к разным видам оперативных вмешательств [176]. Ни один из них на данный момент не признан золотым стандартом, поиски новых препаратов продолжаются.

Все больше внимания стали уделять этическим вопросам и предпочтениям пациента. Использование при пластике брюшной стенки материалов трупного происхождения может вызывать дискомфорт у ряда пациентов, а использование эндопротезов свиного происхождения может быть признано пациентом недопустимым по религиозным соображениям. Несмотря на отсутствие медицинских обоснований тому, в том числе психологический комфорт пациента может оказывать влияние на комплаентность и оценку самочувствия и исхода.

Учитывая вышеописанные проблемы, научный коллектив Национального центра биотехнологий (г.Астана, Казахстан) совместно с

коллегами из Медицинского университета Караганды (Караганда, Казахстан) разработали метод изготовления внеклеточного матрикса бычьей брюшины и провели физико-химические и доклинические испытания ее применения, которые показали ее преимущества перед аналогами [177]. Она показала себя как прочный и эластичный материал, пригодный для решения широкого круга задач эндопротезирования. При этом механически она не нарушает естественной структуры брюшной стенки за счет своей малой толщины, что является преимуществом перед материалами дермального происхождения. Были изучены локальные репаративные и воспалительные процессы на месте имплантации и клинические исходы [178], которые показали 96% эффективность протезирования и минимальный риск отдаленных осложнений.

Обязательной частью доклинического исследования биоматериалов является оценка иммуногенности и аллергенности, а в общем смысле биосовместимости. Формирование состояния гиперчувствительности к испытываемому материалу может быть за счет белковых примесей и высокомолекулярных соединений биологического происхождения, так и оставшиеся компоненты вследствие технологии приготовления, очистки, дезинфекции. Сравнительная комплексная оценка биосовместимости децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины отечественного производства по сравнению с одобренным биопрепаратом и стало целью настоящей работы.

Тип гиперчувствительности зависит от природы антигенов, дозы, путей введения и индивидуальных особенностей. При подборе методов определения развития сенсибилизации мы использовали сочетание тестов, которые могут выявить разные типы гиперчувствительности согласно официальным рекомендациям. Исходя из этого задачами диссертационного исследования стали:

1. Исследовать и сравнить антигенные свойства децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального колагена у крыс.
2. Исследовать и сравнить динамику системного воспалительного ответа по уровню ИЛ-2, С-реактивного белка и ФНО- α у крыс после эндопротезирования децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального колагена.
3. Исследовать и сравнить уровень внеклеточных нуклеиновых кислот и гистонподобных белков для определения возможного повреждения тканей в ответ на децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины в сравнении с ацеллюлярным дермальным коллагеном у крыс после эндопротезирования.

Дизайн предполагал экспериментальное сравнительное исследование на лабораторных крысах. Материалом сравнения был выбран (Covidien, USA), который имеет регистрационное удостоверение для использования в клинической медицинской практике. Были выбраны сроки оценки в период

от 7 до 90 дней, в зависимости выбранных тестов, которые отражают процесс развития сенсибилизации в ранние и поздние сроки после имплантации.

В качестве первичной сенсибилизации было произведено непосредственное вживление имплантата в брюшную стенку. В связи с особенностями препарата и хронического (пожизненного) его наличия в организме после введения, тесты сенсибилизации с одной стороны ограничены, морфологическая оценка, которая была проведена ранее, также является тестом на иммунологическую совместимость, поэтому для данного исследования были выбраны тесты эпикутанной сенсибилизации для оценки в первую очередь цитотоксических реакций, конъюнктивальная проба для оценки гиперчувствительности немедленного типа и реакция на гиперчувствительность замедленного типа, которые при данном типе препарата будут одновременно выявлять замедленный и иммунокомплексный тип реакции. Лимитирующим моментом в пробах мог стать факт, что мишенью иммунного ответа мог стать первоначальный имплантат в брюшине, но в рамках более ранних экспериментов было проведено морфологическое исследование [179] и которое показало не выраженную локальную клеточную реакцию в области трансплантата в разные сроки после операции.

Результаты первого этапа сравнительного экспериментального исследования показали, что при оценке эпикутанной сенсибилизации, после серии накожных аппликаций внеклеточным матриксом ксенобрюшины, отсутствовали признаки развития аллергической реакции – «0» баллов согласно шкале оценки кожных проб. В группе сравнения, с использованием ацеллюлярного дермального коллагена «Permacol», эквивалентное значение – «0» баллов. Статистически значимых межгрупповых различий не выявлено ($P > 0,05$). Оценка аллергической реакции немедленного типа методом конъюнктивальной пробы показала, что в исследуемой группе с применением диспергированного раствора внеклеточного матрикса ксенобрюшины ни в одном случае не было отмечено каких-либо проявлений со стороны слизистой оболочки глаз, равно как и в группе сравнения с ацеллюлярным дермальным коллагеном «Permacol». Согласно шкале оценки конъюнктивальной пробы в обеих группах 0 баллов ($P = 1,0$). При оценке реакции гиперчувствительности «замедленного» типа, в исследуемой группе после 48 часов наблюдения, отсутствовали изменения в месте введения диспергированного имплантата. Аналогичная картина была зафиксирована в группе сравнения. Согласно шкале оценки иммунокомплексной реакции у всех животных в обеих группах «0» баллов – изменения отсутствуют.

Это свидетельствует об отсутствии аллергенных и иммуногенных компонентов в обоих исследуемых препаратах и эквивалентный профиль безопасности при оценке алергизирующих свойств.

Для оценки иммунокомплексных реакций было проведено исследование циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови экспериментальных животных в разные сроки после имплантации. После

имплантации в группе сравнения с применением ацеллюлярного дермального коллагена «Permatocol» отмечается стремительное увеличение содержания ЦИК всех фракций, с пиковыми значениями к 30 суткам: ВМ – 82,3 усл.ед., СМ – 69,25 усл.ед., НМ – 113,2 усл.ед., превышая контрольные показатели в 10 раз и более ($P < 0,05$) (ВМ – 6,0 усл.ед., СМ – 5,6 усл.ед., НМ – 3,0 усл.ед. соответственно). В группе с использованием внеклеточного матрикса ксенобрюшины пиковые значения приходятся на 21 сутки ($P < 0,05$): ВМ – 21,5 усл.ед., СМ – 39,5 усл.ед., НМ – 76,5 усл.ед, с последующей стойкой тенденцией к снижению до практически контрольного уровня к 90 суткам. Процесс образования ЦИК в данном случае имеет вдвое меньшую интенсивность чем в группе сравнения.

Образование иммунных комплексов отражает в данном случае физиологический процесс реакции организма на операционную травму, противомикробную защиту в районе операционной травмы и, возможно, скрытую сенсibilизацию, которая полностью благополучно завершается, возвращаясь к исходным, дооперационным значениям. Показатели внеклеточного матрикса ксенобрюшины при этом говорят о меньшем уровне воспалительной реакции любого генеза.

Биологический имплантат является по сути аллогенным трансплантатом и кроме оценки алергизации, были проведены иммунологические тесты, отражающие системную иммуногенность. Не существует специфических сывороточных маркеров отторжения, золотым стандартом является биопсия (в общем случае-гистологическое исследование трансплантата в процессе функционирования) [180], что было проведено ранее и не вошло в данную работу. Поэтому для оценки системной реакции были выбраны классические тесты СРБ – неспецифический маркер воспаления, ИЛ-2 – маркер Th1 клеток - клеточного ответа [181] и ФНО - который в данном случае не просто самый мощный провоспалительный цитокин, но промотор TNF-индуцированной клеточной цитотоксичности, которая регулирует иммунную природу процесса регуляции выживания-апоптоз-некроз клеток трансплантата [182].

Несмотря на неспецифичность маркеров в условиях контролируемого эксперимента мы можем делать выводы о развитии системного воспаления, связанного с применением изучаемой технологии.

При оценке иммунологических реакций отторжения имплантата динамика концентраций иммунологических маркеров в обеих группах на протяжении 90 суток наблюдения была схожа, отражала физиологическое течение послеоперационного периода, реакцию организма на операционную травму. Кривая динамики уровня СРБ в сыворотке крови обеих групп была схожа, максимальные значения зафиксированы на 5 сутки после имплантации. В группе с внеклеточным матриксом ксенобрюшины статистически значимо возросла концентрация СРБ по отношению к исходным значениям – 813,66 мкг/мл против 214,66 мкг/мл ($P < 0,05$). После имплантации Permatocol уровень СРБ к 5 суткам возрос до 904,66 мкг/мл, без

статистически значимых межгрупповых различий. При этом нормализация ($p > 0,05$ с контрольными значениями) произошла к 14 дню в группе испытуемого имплантата и к 30 дню в группе имплантата сравнения.

После имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины пиковые значения ФНО и ИЛ-2 зафиксированы к 14 суткам: 4,78 пг/мл и 14,21 пг/мл соответственно, что превышало исходные значения почти в 4 раза ($P < 0,05$) (1,64 пг/мл и 4,87 пг/мл). Схожая динамика показателей ФНО и ИЛ-2 наблюдалась и в группе сравнения после имплантации Permacol: на 14 сутки ФНО – 9,46 пг/мл, ИЛ-2 – 16,85 пг/мл, что превышало исходные концентрации более чем в 4 раза ($P < 0,05$), с последующим снижением и нормализацией достижения контрольных значений к 30 суткам наблюдения.

Данные свидетельствуют о том, что испытуемый препарат показывает в целом не худшие, а по ряду показателей (динамика нормализации) лучшие показатели по маркерам системного воспаления и может быть признан эквивалентным.

Основными источниками внеклеточных нуклеиновых кислот является процесс некроза, апоптотические тельца продукты некроза. Описан процесс выделения ДНК при иммунном ответе из лимфоцитов [183]. Пути секреции во внеклеточный матрикс РНК могут быть дополнительно путем внеклеточных везикул и экзосом, которые транспортируют микро РНК.

Для того чтобы оценить влияние системного иммунного ответа на состояние тканевого метаболизма были выбраны тесты по оценке внеклеточных ДНК, РНК и гистонподобных белков, которые могли бы дать оценку базовым процессам деления, некроза и репарации в тканях.

вкНК присутствуют в кровеносном русле в различных конфигурациях: свободной, везикулярной и сорбированными на клеточных элементах крови. Появление данных показателей в крови возможно при различных физиологических процессах таких как эритропоэз, тромбопоэз, запрограммированная элиминация клеток (апоптоз), некроз, что возможно при разных процессах в норме и патологии, а также выраженной травме и некрозе [184]. При этом большая заинтересованность уделяется не единовременному значению уровня вкНК, а изменению в динамике, что может быть использовано в оценке эффективности оперативного лечения или терапии [185].

Гистонподобные белки являются белками, составляющими доминирующую часть хроматина, и играют структурную роль в его организации. Повышение ядерного материала клеток, представителями которого являются гистонподобные белки, могут возникать при деструктивных процессах в клетках и распаде нуклеосом в результате нарушения механизмов передачи сигналов как из-за апоптотических процессов, так и в результате агрессивных воспалительных повреждений тканей организма вызванных различными патологическими состояниями, включая некроз, а так же при их активном синтезе и делении клеток.

Гистоноподобные белки всех фракций возрастают в ранние сроки эксперимента с максимальными значениями между 14 и 21 сутками, и нормализуются к концу периода наблюдения. Динамика снижения у животных с препаратом сравнения более быстрая, но при этом статистические различия между группами с разным препаратом не фиксируются.

Колебания концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот выражены мало, однако интересным является факт, что оба вида НК значительно повышаются в отдаленный период (90 дней) после эксперимента, одновременно снижается их предшественник-кислоторастворимая фракция, что скорее всего говорит о заключительном этапе ремоделирования тканей.

Подходя комплексно к полученным данным, мы можем заметить, что уровни СРБ и ФНО ярко и синхронно отражают острый ответ на асептическое воспаление и имеют схожий профиль изменений, и в группе сравнения асептическое воспаление имеет более затяжной характер, но благополучно завершается к установленным срокам.

Динамика ИЛ-2 точно повторяет профиль гистоноподобных белков H2B и H1, что скорее всего свидетельствует, что механизм изменения гистоноподобных белков в данном эксперименте это иммуногенез в первую очередь и не связано с повреждением тканей-мишеней, а больше с процессами контроля репарации и пролиферации.

В целом мы можем говорить, о том, что исследуемый препарат – ксенобрюшина отечественного производства показала хороший профиль безопасности в эксперименте, не проявила иммуногенных или аллергенных свойств, не зафиксировано иммунологических сдвигов, которые можно трактовать как недостаточную биосовместимость или угрозу неблагоприятной реакции иммунной системы в поздние сроки эксперимента на клеточном уровне. По сравнению с препаратом сравнения (дерма Permacol) он ни в одном из тестов не показал большую реактивность, а по общему воспалительному профилю у ксенобрюшины отечественного производства серологически меньшая выраженность и меньшая длительность неспецифической асептической реакции.

Все это подтверждается более ранними исследованиями, где приведена оценка клинических и морфологических данных [186, 187], но иммунологический профиль является обязательным для оценки нового биопрепарата, и наше исследование доказало отсутствие патологических изменений на имплантацию биопрепарата и на клеточном уровне.

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

1. Внеклеточный матрикс ксенобрюшины не вызывает гиперчувствительности «немедленного» и «замедленного» типа при в аллергенных пробах *in vivo* и идентичен по профилю безопасности с препаратом сравнения.

2. Сравнительный анализ динамики системного воспалительного ответа в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена показал статистически значимые отличия уровней ФНО- α и ИЛ-2 в группе с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины с группой контроля до 21 суток в 2,24 раз ($p=0,03$) и 1,88 раз ($0,03$) соответственно, СРБ до 7 суток в 3,79 раз ($p=0,02$).

В уровнях всех фракций ЦИК статистически значимое повышение сохраняется до 30 суток в группе с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины: ВМ ЦИК в 7,25 раз ($p=0,01$), СМ ЦИК в 4,41 раз ($0,03$), НМ ЦИК в 18,43 раз ($0,01$); и в группе с использованием ацеллюлярного дермального коллагена: ВМ ЦИК в 13,72 раз ($p=0,01$), СМ ЦИК в 12,36 раз ($0,01$), НМ ЦИК в 26,87 раз ($0,01$).

К 90 суткам наблюдения статистически значимых отличий в обеих группах исследования от контрольной группы не наблюдаются (в группе с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины $p=0,98$ для ИЛ-2, $p=0,6$ для СРБ, $p=0,3$ для ФНО- α , $p=0,12$ для ВМ ЦИК, $p=0,06$ для СМ ЦИК, $p=0,07$ НМ ЦИК; в группе с использованием ацеллюлярного дермального коллагена $p=0,07$ для ИЛ-2, $p=0,69$ для СРБ, $p=0,3$ для ФНО- α , $p=0,11$ для ВМ ЦИК, $p=0,06$ для СМ ЦИК, $p=0,08$ НМ ЦИК), что отражает физиологическое течение послеоперационного периода в группе исследования и группе сравнения и свидетельствует об отсутствии признаков хронизации воспалительного процесса.

3. При оценке уровней внеклеточных нуклеиновых кислот и фракций Н1, Н2А, Н3, Н4, Н2В гистоноподобных белков не выявлено значимых различий между группами, однако уровень внеклеточных нуклеиновых кислот повышается в период 90 дней (вкРНК в исследуемой группе на 20% ($0,37$ усл.ед/мл), $p=0,01$, в группе сравнения на 45% ($0,45$ усл.ед/мл), $p=0,01$; вкДНК соответственно на 32% ($0,37$ усл.ед/мл), $p=0,01$ и на 57% ($0,44$ усл.ед/мл), $p=0,006$) с одновременным снижением КРФ и уровней фракций Н1, Н2А, Н3, Н4, Н2В гистоноподобных белков с отсутствием статистически значимых различий ($p\leq 0,05$), что можно рассматривать как завершающие метаболические этапы стадии пролиферативного процесса и ремоделирования тканей.

На основании результатов диссертационной работы можно сформулировать следующие практические рекомендации:

1. Проведенные в диссертационной работе исследования расширяют имеющиеся представления об использовании биологических материалов для пластики дефектов передней брюшной стенки, а именно изучены иммунологические и сенсibiliзирующие свойства внеклеточного матрикса ксенобрюшины.

2. Полученные в ходе настоящей работы результаты дополняют имеющуюся научную базу экспериментального изучения внеклеточного

матрикса ксенобрюшины в рамках доклинической оценки безопасности имплантата.

3. Объединение и дополнение полученных ранее результатов позволяют проведение следующего этапа исследований – клинических испытаний по оценке безопасности и эффективности внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургической коррекции дефектов передней брюшной стенки.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Flum D.R., Horvath K., Koepsell T. Have outcomes of incisional hernia repair improved with time? A population-based analysis. // *Ann. Surg.* – 2003. – №237. – P. 129–135.
2. Dietz, U. A., Menzel, S., Lock, J., & Wiegering. The Treatment of Incisional Hernia // *Deutsches Arzteblatt international.* – 2018. - № 115. - P.31–37.
3. Dunne J.R., Malone D.L., Tracy J.K., Napolitano L.M. Abdominal wall hernias: risk factors for infection and resource utilization // *J. Surg. Res.* – 2003. – №111. – P. 78–84.
4. Максяткина Л.В., Абатов Н.Т., Ахмалтдинова Л.Л., Бадыров Р.М., Трошин В.В. Применение биоимплантов при пластике дефектов брюшной стенки (литературный обзор) // *Вестник КазНМУ.* – 2019. - №1. – С. 307-312.
5. Lo´pez-Cano M, Armengol-Carrasco M. Biological scaffolds in reparative surgery for abdominal wall hernias // *Am. J. Surg.* – 2012. – № 203. – 555 p.
6. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view // *Dev Biol.* – 2010. – №341. – P. 126–140.
7. Brown B., Lindberg K., Reing J., Stolz D.B., Badylak S.F. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix // *Tissue Eng.* – 2006. – №12. – P. 519–526.
8. S. F. Badylak. The extracellular matrix as a biologic scaffold material // *Biomaterials.* – 2007. – V.28. – №25. – P. 3587–3593.
9. Gu, L., Shan, T., Ma, Y. X., Tay, F. R., & Niu, L. Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen // *Trends in biotechnology.* – 2019. -№ 37. – P. 464–491.
10. Junge K., Binnebösel M., von Trotha K.T., Rosch, R., Klinge U., Neumann U.P., Jansen P.L. Mesh biocompatibility: Effects of cellular inflammation and tissue remodeling // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2012. – № 397. – P.255–270.
11. Keating J.H., Melidone R., Garcia-Polite F., Preclinical Evaluation of Mesh Implants: The Pathologist’s Perspective // *Toxicol. Pathol.* – 2019. – V.3. – №47. – P.379-389.
12. Brown B.N., Badylak S.F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction // *Transl. Res.* – 2014. – №163. – P. 268–285.
13. Balaýssac, D., Poinas, A. C., Pereira, B., & Pezet, D., Use of permacol in parietal and general surgery: a bibliographic review // *Surgical innovation.* – 2013. – V. 20. – №2. – P.176–182.
14. Smart, N. J., Marshall, M., & Daniels, I. R. Biological meshes: a review of their use in abdominal wall hernia repairs // *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland.* – 2012. – V.10.- №3. – P.159–171.
15. Dirani, M., Chahine, E., D'Alessandro, A., Chouillard, M. A., Gumbs, A. A., & Chouillard, E. The use of Permacol biological mesh for complex abdominal wall repair // *Minerva surgery.* – 2022. – V.77. – №1. – P.41–49.

16. Doussot, A., Abo-Alhassan, F., Derbal, S., Fournel, I., Kasereka-Kisenge, F., Codjia, T., Khalil, H., Dubuisson, V., Najah, H., Laurent, A., Romain, B., Barrat, C., Trésallet, C., Mathonnet, M., & Ortega-Deballon, P. Indications and Outcomes of a Cross-Linked Porcine Dermal Collagen Mesh (Permacol) for Complex Abdominal Wall Reconstruction: A Multicenter Audit // *World journal of surgery*. – 2019. – V.43. №3. – P.791–797.
17. Russello, D., Sofia, M., Conti, P., Latteri, S., Pesce, A., Scaravilli, F., Vasta, F., Trombatore, G., Randazzo, V., Schembari, E., Barchitta, M., Agodi, A., & La Greca, G. A retrospective, Italian multicenter study of complex abdominal wall defect repair with a Permacol biological mesh // *Scientific reports*. – 2020. – V.10. №1. – P.3367.
18. Fatkhudinov, T., Tsedik, L., Arutyunyan, I., Lokhonina, A., Makarov, A., Korshunov, A., Elchaninov, A., Kananykhina, E., Vasyukova, O., Usman, N., Uvarova, E., Chuprynin, V., Eremina, I., Degtyarev, D., & Sukhikh, G. Evaluation of resorbable polydioxanone and polyglycolic acid meshes in a rat model of ventral hernia repair // *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. – 2019. – V.107. №3. – P.652–663.
19. Ball CG, Kirkpatrick AW, Stuleanu T, Rosen MJ, Eberle TL. Is the type of biomesh relevant in the prevention of recurrence following abdominal wall reconstruction? A randomized controlled trial // *Can J Surg*. – 2022. – V.65. №4. - P.541-549.
20. Разработка и применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки: отчет о НИР (промежуточ.) / Караг. гос. мед. унив-т; рук. Абатов Н.Т.; исполн.: Бадыров Р.М. [и др.]. – К., 2015. – 67 с. – № ГР 0115РК00305. – Инв. № 0215РК02890
21. Faylona J. M. Evolution of ventral hernia repair // *Asian journal of endoscopic surgery*. – 2017. - №10. – P.252–258.
22. Gerber, J. L., Lavanchy, J. L., & Beldi, G. Folgezustände nach Hernienchirurgie: Was ist zu beachten? // *Therapeutische Umschau. Revue therapeutique*. – 2019. – №76. – P.579–584.
23. Фёдоров И.В., Чугунов А.Н. Протезы в хирургии грыж: столетняя эволюция // *Герниология*. – 2004. – №2. – С. 45-53
24. Cumberland V.H. A preliminary report on the use of a prefabricated nylon weave in the repair of ventral hernia // *Med. J. Aust*. – 1952. – №1. – P.143–144.
25. Hamer-Hodges D.W., Scott N.B. Surgeon's workshop. Replacement of an abdominal wall defect using expanded PTFE sheet (Gore-tex) // *J. R. Surg. Edinb*. – 1985. – №30. – P.65–67.
26. Shankaran V., Weber D.J., Reed R.L., Luchette F.A. A review of available prosthetics for ventral hernia repair // *Ann. Surg*. – 2011. – №253. – P.16–26
27. Donati, M., Brancato, G., Grosso, G., Li Volti, G., La Camera, G., Cardì, F., Basile, F., & Donati, A. Immunological reaction and oxidative stress after light or heavy polypropylene mesh implantation in inguinal hernioplasty: A CONSORT-prospective, randomized, clinical trial // *Medicine*. – 2016. - № 95. – P.3791.

28. Bringman S., Conze J., Cuccurullo D., Deprest J. et al. Hernia repair: the search for ideal meshes // *Hernia*. – 2010. – №14. – P.81–87.
29. Zhong C, Wu B, Yang Z, Deng X, Kang J, Guo B, Fan Y. A meta-analysis comparing lightweight meshes with heavyweight meshes in Lichtenstein inguinal hernia repair // *Surg Innov*. – 2013. - №20. – P.24-31.
30. Mietański M., Bury K., Smietańska I.A., Owczuk R., Paradowski T. Five-year results of a randomised controlled multi-centre study comparing heavy-weight knitted versus low-weight, non-woven polypropylene implants in Lichtenstein hernioplasty // *Hernia*. – 2011. – №15. – P.495–501
31. Chui L.B., Ng W.T., Sze Y.S., Yuen K.S. et al. Prospective, randomized, controlled trial comparing lightweight versus heavyweight mesh in chronic pain incidence after TEP repair of bilateral inguinal hernia // *Surg. Endosc*. – 2010. – №24. – P.2735–2738
32. Peeters E., Spiessens C., Oyen R., De Wever L. et al. Laparoscopic inguinal hernia repair in men with lightweight meshes may significantly impair sperm motility: a randomized controlled trial // *Ann. Surg.* . – 2010. – №252. – P.240–246
33. Cozad M.J., Grant D.A., Bachman S.L., Grant D.N. et al. Materials characterization of explanted polypropylene, polyethylene terephthalate, and expanded polytetrafluoroethylene composites: spectral and thermal analysis // *J. Biomed. Mater. Res*. – 2010. – №94. – P.455–462
34. Burger J.W., Halm J.A., Wijsmuller A.R., Jeekel J. Evaluation of new prosthetic meshes for ventral hernia repair // *Surg. Endosc*. – 2006. – №20. – P.1320–1325
35. Totten C, Becker P, Lourd M, Roth JS. Polyester vs polypropylene, do mesh materials matter? A meta-analysis and systematic review // *Med Devices*. - 2019. - №12. – P.369-378.
36. Voskerician G., Rodriguez A., Gingras P.H. Macroporous condensed polytetra fluoro-ethylene. In vivo effect on adhesion formation and tissue integration // *J. Biomed. Mater. Res*. – 2007. – №82. – P.426–435
37. Orenstein S.B., Saberski E.R., Kreutzer D.L., Novitsky Y.W. Comparative analysis of histopathologic effects of synthetic meshes based on material, weight, and pore size in mice // *J. Surg. Res*. – 2012. – №176. – P.423–429
38. Alarcón I, Balla A, Soler Frías JR, Barranco A, Bellido Luque J, Morales-Conde S. Polytetrafluoroethylene versus polypropylene mesh during laparoscopic totally extraperitoneal (TEP) repair of inguinal hernia: short- and long-term results of a double-blind clinical randomized controlled trial // *Hernia*. – 2020. - №24. – P.1011-1018.
39. McGinty J.J., Hogle N.J., McCarthy H., Fowler D.L. A comparative study of adhesion formation and abdominal wall ingrowth after laparoscopic ventral hernia repair in a porcine model using multiple types of mesh // *Surg. Endosc*. – 2005. – №19. – P.786–790.
40. Sriussadaporn S., Sriussadaporn S., Pak-art R., Krittayakirana K., Prichayuhd S. Planned ventral hernia with absorbable mesh: a life-saving method

in relaparotomy for septic abdomen // J. Med. Assoc. Thai. – 2010. – №93. – P.449–456.

41. Prichayudh S., Sriussadaporn S., Samorn P., Pak-Art R. et al. Management of open abdomen with an absorbable mesh closure // Surg. Today. – 2011. – №41. – P.72–78.

42. Sikkink C.J., Vries de Reilingh T.S., Malyar A.W., Jansen J.A. et al. Adhesion formation and reherniation differ between meshes used for abdominal wall reconstruction // Hernia. – 2006. – №10. – P.218–222.

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

44. Ansaloni L., Catena F., Gagliardi S. et al. Hernia repair with porcine small-intestinal submucosa // Hernia. – 2007. – № 11. – P.321.

45. Petter-Puchner A.H., Fortelny R.H., Mittermayr R. et al. Adverse effects of porcine small intestine submucosa implants in experimental ventral hernia repair // Surg. Endosc. – 2006. – №20. – P.942.

46. Poulou B.K., Scholz S., Moore D.E. et al. Physiologic properties of small intestine submucosa // J. Surg. Res. – 2005. – №123. – P.262.

47. Catena F., Ansaloni L., D'Alessandro L. et al. Adverse effects of porcine small intestine submucosa (SIS) implants in experimental ventral hernia repair. Surg. Endosc. – 2007. – № 21. –P. 690.

48. Franklin M.E. Jr, Gonzalez J.J. Jr, Michaelson R.P. et al. Preliminary experience with new bioactive prosthetic material for repair of hernias in infected fields // Hernia. – 2002. – № 6(4). – P.171-174.

49. Franklin M.E. Jr, Trevino J.M., Portillo G. et al. The use of porcine small intestinal submucosa as a prosthetic material for laparoscopic hernia repair in infected and potentially contaminated fields: long-term follow-up // Surg. Endosc. – 2008. – № 22(9). – P.1941-1946

50. Ueno T., Pickett L.C., De la Fuente S.G. Clinical application of porcine small intestinal submucosa in the management of infected or potentially contaminated abdominal defects // J. Gastrointest. Surg. – 2004. – № 8(1). – P.109-112

51. Helton W.S., Fisichella P.M., Berger R. et al. Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia // Arch. Surg. – 2005. – № 140(6). – P.549–560

52. Baoshan Li et al. Lichtenstein inguinal hernia repairs with porcine small intestine submucosa: a 5- year follow-up. a prospective randomized controlled study // Regenerative Biomaterials. – 2021. – №1. – P. 1–5.

53. Ravo B, Falasco G. Pure tissue inguinal hernia repair with the use of biological mesh: a 10-year follows up. A prospective study // Hernia. – 2020. – №24. – P.121–126.

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

55. Liyanage S.H., Purohit G.S., Frye J.N., Giordano Liyanage P. Anterior abdominal wall reconstruction with a Permacol implant // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* – 2006. – № 59(5). – P. 553-555.
56. Hsu P.W., Salgado C.J., Kent K et al. Evaluation of porcine dermal collagen (Permacol) used in abdominal wall reconstruction // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* – 2009. – № 62(11). – P. 1484-1489
57. Connolly P.T., Teubner A., Lees N.P. et al. Outcome of reconstructive surgery for intestinal fistula in the open abdomen // *Ann. Surg.* – 2008. – № 247(3). – P. 440-444
58. Armellino M., De Stefano G., Scardi F. Use of Permacol in complicated incisional hernia // *Chir. Ital.* – 2006. – №58(5). – P.627-630
59. Limpert J.N., Desai A.R., Kumpf A.L. Repair of abdominal wall defects with bovine pericardium // *Am. J. Surg.* – 2009. – № 198(5). – P.60–65.
60. Gore D.C. Utility of acellular allograft dermis in the care of elderly burn patients // *J. Surg. Res.* – 2005. – №125. – P. 37-41.
61. Gupta A., Zahriya K., Mullens P. Ventral herniorrhaphy: Experience with two different biosynthetic mesh materials, Surgisis and Alloderm // *Hernia.* – 2006. – №10(5). – P. 419-425.
62. Diaz J., Guy J., Berkes M. Acellular dermal allograft for ventral hernia repair in the compromised surgical field // *Am. Surg.* – 2006. – №72. – P. 1181-1188.
63. Kim H., Bruen K., Vargo D. Acellular dermal matrix in the management of high-risk abdominal wall defects // *Am. J. Surg.* – 2006. – №192(6). – P. 705-709.
64. Espinosa-de-los-Monteros A., De la Torre J., Marrero I. Utilization of human cadaveric acellular dermis for abdominal hernia reconstruction // *Ann. Plast. Surg.* – 2007. – №58. – P. 264-267.
65. Breuing K., Colwell A. Inferolateral AlloDerm hammock for implant coverage in breast reconstruction // *Ann. Plast. Surg.* – 2007. – №59. – P. 250-255.
66. Preminger B.A., McCarthy C.M., Hu Q.Y. The influence of AlloDerm on expander dynamics and complications in the setting of immediate tissue expander/implant reconstruction: A matched-cohort study // *Ann. Plast. Surg.* – 2008. – №60(5). – P. 510-513.
67. Efsandiari S., Dendukuri N., McGregor M. Clinical efficacy and cost of Allogenic Acellular Dermal Matrix (AADM) in implant-based breast reconstruction of post mastectomy cancer patients // Report Montreal, QC: Technology Assessment Unit of the McGill University Health Centre (MUHC). - 2009. – 40 p.
68. Hiles M., Ritchie R., Altizer A. Are biologic grafts effective for hernia repair? A systematic review of the literature // *Surg. Innov.* – 2009. – №16(1). – P. 26-37.
69. Kissane N.A., Itani K.M. A decade of ventral incisional hernia repairs with biologic acellular dermal matrix: What have we learned? // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2012. – № 130(5 Suppl 2). – P. 194-202.

70. Holton L.H., Kim D., Silverman R.P., Rodriguez E.D., Singh N. and Goldberg, N.H. Human acellular dermal matrix for repair of abdominal wall defects: review of clinical experience and experimental data // *J. LongTerm Eff. Med. Implants.* – 2005. – №15. – 547p.
71. Butler C.E., Langstein H.N., Kronowitz S.J. Pelvic, abdominal, and chest wall reconstruction with AlloDerm in patients at increased risk for mesh-related complications // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2005. – №116. – P.1263.
72. Butler. C.E. The role of bioprosthesis in abdominal wall reconstruction // *Clin. Plast. Surg.* – 2006. – №33. – 199 p.
73. Sailes F.C., Walls J., Guelig D. et al. Synthetic and biological mesh in component separation: a 10-year single institution review // *Ann. Plast. Surg.* – 2010. – № 64(5). – P.696–698
74. Шустеров А.И. Оперативное лечение больших косых и рецидивных паховых грыж с применением консервированной брюшины (экспериментально-клиническое исследование): дисс. ... канд.мед.наук. — Караганда: Карагандинский государственный медицинский университет, 1966. – 232 с.
75. Патент №30382 РК. Биологическое покрытие для лечения ожогов и ран / Абугалиев К.Р., Огай В.Б., Данлыбаева Г.А. – 2014. – 5 с
76. Патент №33801 РК. Способ получения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики грыж передней брюшной стенки / Абатов Н.Т., Абугалиев К.Р., Бадыров Р.М., Огай В.Б., Абатова А.Н., Асамиданов Е.М. – 2019.
77. Разработка и применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки: отчет о НИР (итог.) / Караг. гос. мед. унив-т; рук. Абатов Н.Т.; исполн.: Бадыров Р.М. [и др.]. – К., 2017. – 111 с. – № ГР 0115РК00305. – Инв. № 0215РК02890
78. Butler C.E. The role of bioprosthesis in abdominal wall reconstruction // *Clin. Plast. Surg.* – 2006. – №33. – P. 199-211.
79. Rosen M.J. Biologic mesh for abdominal wall reconstruction: a critical appraisal // *Am. Surg.* – 2010. – №76. – P. 1-6.
80. Ceci F, Gossetti F, Grimaldi MR, D'Amore L, Negro P. Key Factors for Successful Outcomes of Abdominal Wall Reconstruction with Biologic Implant // *J Am Coll Surg.* – 2017. - №224. – P.373-374.
81. Pickett L.C. Mesh use in complex hernias and open abdomen: types, benefits, and limitations // *Surg. News.* – 2009. – №9. – P. 3-5.
82. Bellows C.F., Alder A., Helton W.S. Abdominal wall reconstruction using biological tissue grafts: present status and future opportunities // *Expert Rev. Med. Devices.* – 2006. – №3. – P. 657-675.
83. Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering // *Bioact Mater.* – 2021. - № 23. – P.15-31.

84. Шумаков В.И., Севастьянов В.И. Биополимерные матрицы для искусственных органов и тканей // *Здравоохранение и медицинская техника*. - 2003. - № 4. - С. 30-32
85. Севастьянов В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2009. – Т.9, № 3. – С. 14-24.
86. Liu C, Pei M, Li Q, Zhang Y. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration // *Front Med*. – 2022. - №16. – P.56-82.
87. J.M. Anderson, A.K. McNally. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions // *Seminars in Immunopathology*. – 2011. – V.33. – №3. – P.221-233.
88. Mutsaers S.E., Prêle C.M.A., Pengelly S., Herrick S.E. Mesothelial cells and peritoneal homeostasis // *Fertil. Steril*. – 2016. – №106. – P.1018-1024.
89. Junge K., Binnebösel M., von Trotha K.T., Rosch R., Klinge U., Neumann U.P., Jansen P.L. Mesh biocompatibility: Effects of cellular inflammation and tissue remodeling // *Langenbecks Arch. Surg*. – 2012. – №397. – P.255–270.
90. Matthews B.D., Mostafa G., Carbonell A.M., Joels C.S., Kercher K.W., Austin C., Norton H.J., Heniford B.T. Evaluation of adhesion formation and host tissue response to intra-abdominal polytetrafluoroethylene mesh and composite prosthetic mesh // *J. Surg. Res*. – 2005. – №123. – P.227–234.
91. Badylak SF. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response // *Ann Biomed Eng*. – 2014. - №42. – P.1517-27.
92. Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Usón A, Marinaro F, Casado JG. Fibrin glue mesh fixation combined with mesenchymal stem cells or exosomes modulates the inflammatory reaction in a murine model of incisional hernia // *Acta Biomater*. – 2018. - №15. – P.318-329.
93. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview // *J Biomed Mater Res A*. – 2020. - №108. – P.1617-1633.
94. Hou W, Liu Y, Wu S, Zhang H, Guo B, Zhang B, Qin XJ, Li H. Preadsorption of Serum Proteins Regulates Bacterial Infections and Subsequent Macrophage Phagocytosis on Biomaterial Surfaces // *ACS Appl Bio Mater*. – 2019. - №2. – P.5957-5964.
95. Klopffleisch R, Jung F. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials // *J Biomed Mater Res A*. – 2017. - №105. – P.927-940.
96. Wang S, Chen Y, Ling Z, Li J, Hu J, He F, Chen Q. The role of dendritic cells in the immunomodulation to implanted biomaterials // *Int J Oral Sci*. – 2022. - №14. – P.52.
97. Nilsson B., Korsgren O., Lambris J.D., Ekdahl K.N. Can cells and biomaterials in therapeutic medicine be shielded from innate immune recognition? // *Trends Immunol*. – 2010. - №31(1). – P.32-38.
98. Banerjee D, Nayakawde NB, Antony D, Deshmukh M, Ghosh S, Sihlbom C, Berger E, Ul Haq U, Olausson M. Characterization of Decellularized Implants

for Extracellular Matrix Integrity and Immune Response Elicitation // *Tissue Eng Part A*. – 2022. - №28. -P.621-639.

99. Chakraborty J, Roy S, Ghosh S. Regulation of decellularized matrix mediated immune response // *Biomater Sci*. – 2020. - №8. – P.1194-1215.

100. Witherel CE, Abebayehu D, Barker TH, Spiller KL. Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis // *Adv Healthc Mater*. – 2019. - №8. – P.1801451.

101. Krishnan A., Cha P., Liu Y.H. et al. Interfacial energetics of blood plasma and serum adsorption to a hydrophobic self-assembled monolayer surface // *Biomaterials*. – 2006. – №27(17). – P.3187-3194.

102. Sadtler K, Wolf MT, Ganguly S, Moad CA, Chung L, Majumdar S, Housseau F, Pardoll DM, Elisseeff JH. Divergent immune responses to synthetic and biological scaffolds // *Biomaterials*. – 2019. - №192. – P.405-415.

103. Chung L, Maestas DR Jr, Housseau F, Elisseeff JH. Key players in the immune response to biomaterial scaffolds for regenerative medicine // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2017. - №15. – P.184-192.

104. Sheikh Z, Brooks PJ, Barzilay O, Fine N, Glogauer M. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials // *Materials (Basel)*. – 2015. - № 28. – P.5671-5701.

105. Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T. Foreign body reaction to biomaterials // *Semin. Immunol*. – 2008. - №20 (2). – P.86-100.

106. Broughton G., Janis J.E., Attinger C.E. The basic science of wound healing // *Plast. Reconstr. Surg*. – 2006. – №117 (7 Suppl). – P.12-34.

107. Charo I.F., Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation // *N. Engl. J. Med*. – 2006. – №354 (6). – P.610-621.

108. Martin KE, García AJ. Macrophage phenotypes in tissue repair and the foreign body response: Implications for biomaterial-based regenerative medicine strategies // *Acta Biomater*. – 2021. - №1. – P.4-16.

109. Jones J.A., Chang D.T., Meyerson H. et al. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2007. – №83 (3). – P.585-596.

110. Esche C., Stellato C., Beck L.A. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity // *J. Invest. Dermatol*. – 2005. – №125(4). – P.615-628.

111. Klopfleisch R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers // *Acta Biomater*. – 2016. - № 1. – P.3-13.

112. Kasravi M, Ahmadi A, Babajani A, Mazloomnejad R, Hatamnejad MR, Shariatzadeh S, Bahrami S, Niknejad H. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine // *Biomater Res*. – 2023. - №9. – P.10.

113. Gallant N.D., Garcia A.J. Model of integrin-mediated cell adhesion strengthening // *J.Biomech*. – 2007. – №40 (6). – P.1301-1309.

114. Helming L., Gordon S. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules // *Eur. J. Immunol.* – 2007. – №37 (1). – P. 33-42.
115. Chu C, Liu L, Rung S, Wang Y, Ma Y, Hu C, Zhao X, Man Y, Qu Y. Modulation of foreign body reaction and macrophage phenotypes concerning microenvironment // *J Biomed Mater Res A.* – 2020. - №108. - P.127-135.
116. Jones J.A., Dadsetan M., Collier T.O. et al. Macrophage behavior on surface-modified polyurethanes // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2004. – №15 (5). – P.567-584.
117. Kyriakides TR, Kim HJ, Zheng C, Harkins L, Tao W, Deschenes E. Foreign body response to synthetic polymer biomaterials and the role of adaptive immunity // *Biomed Mater.* – 2022. - №17. – P.1088.
118. Cozad M.J., Grant D.A., Bachman S.L. et al. Materials characterization of explanted polypropylene, polyethylene terephthalate, and expanded polytetrafluoroethylene composites: spectral and thermal analysis // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* – 2010. – №94(2). – P.455-462.
119. Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T. Foreign body reaction to biomaterials // *Semin. Immunol.* – 2008. – №20 (2). – P.86-100.
120. Martin P., Leibovich S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly // *Trends Cell Biol.* – 2005. – №15 (11). – P.599-607.
121. Li A.G., Quinn M.J., Siddiqui Y. et al. Elevation of transforming growth factor beta (TGFbeta) and its downstream mediators in subcutaneous foreign body capsule tissue // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2007. – №82 (2). – P.498-508.
122. Higgins D.M., Basaraba R.J., Hohnbaum A.C. et al. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials // *Am. J. Pathol.* – 2009. – №175 (1). – P.161-170.
123. Ward L.A., Siddiqui Y., Federiuk I.F., Wang X.J. Increased expression of Interleukin-13 and connective tissue growth factor, and their potential roles during foreign body encapsulation of subcutaneous implants // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2008. – №19. – P.1065–1072.
124. Damanik FF, Rothuizen TC, van Blitterswijk C, Rotmans JI, Moroni L. Towards an in vitro model mimicking the foreign body response: tailoring the surface properties of biomaterials to modulate extracellular matrix // *Sci Rep.* – 2014. - №19. – P.6325.
125. Xue M., Le N.T., Jackson C.J. Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2006. – №10 (1). – P.143-155.
126. Le N.T., Xue M., Castelnoble L.A., Jackson C.J. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation // *Front. Biosci.* – 2007. – №12. – P.1475-1487.
127. Ravi A., Garg P., Sitaraman S.V. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2007. – №13 (1). – P.97-107.

128. Dias FG, Prudente A, Siniscalchi RT, de Vidal BC, Riccetto CL. Can highly purified collagen coating modulate polypropylene mesh immune-inflammatory and fibroblastic reactions? Immunohistochemical analysis in a rat model // *Int Urogynecol J.* – 2015. - №26. – P.569-76.
129. Jansen P.L., Kever M., Rosch R. et al. Polymeric meshes induce zonal regulation of matrix metalloproteinase-2 gene expression by macrophages and fibroblasts // *FASEB J.* – 2007. – 21 (4). – P.1047-1057.
130. Major MR, Wong VW, Nelson ER, Longaker MT, Gurtner GC. The foreign body response: at the interface of surgery and bioengineering // *Plast Reconstr Surg.* – 2015. - №135. – P.1489-1498.
131. Junge K., Binnebosel M., von Trotha K.T. et al. Mesh biocompatibility: effects of cellular inflammation and tissue remodeling // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2012. – №397 (2). – P.255-270.
132. Lucke S., Hoene A., Walschus U., Kob A., Pissarek J-W., Schlosser M. Acute and Chronic Local Inflammatory Reaction after Implantation of Different Extracellular Porcine Dermis Collagen Matrices in Rats // *BioMed Research International.* – 2015. – Article ID 938059. – 10p.
133. Lucke S, Walschus U, Hoene A, Schnabelrauch M, Nebe JB, Finke B, Schlosser M. The in vivo inflammatory and foreign body giant cell response against different poly(l-lactide-co-d/l-lactide) implants is primarily determined by material morphology rather than surface chemistry // *J Biomed Mater Res A.* – 2018. – №106. – P.2726-2734.
134. Tidball J. G., Villalta S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration // *The American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology.* – 2010. – V.298. - №5. – P.1173-1187.
135. Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy // *Nat Rev Immunol.* – 2018. - №18. – P.648-659.
136. Welsch T. et al. Persisting elevation of C-reactive protein after pancreatic resections can indicate developing inflammatory complications // *Surgery.* – 2008. – №143. – P.20–28.
137. Deitmar S. et al. Are leukocytes and CRP early indicators for anastomotic leakage after esophageal resection? // *Zentralbl Chir.* – 2009. – №134. – P.83-89.
138. Ortega-Deballon, P. et al. C-reactive protein is an early predictor of septic complications after elective colorectal surgery // *World J. Surg.* – 2010. – №34. – P.808-814.
139. Pochhammer J. et al. Serum C-reactive protein level after ventral hernia repair with mesh reinforcement can predict infectious complications: A retrospective cohort study // *Hernia.* – 2020. – №24. – P.41-48.
140. Julien Janet et al. C-reactive protein is a predictive factor for complications after incisional hernia repair using a biological mesh // *Scientific Reports.* – 2021. –№11. – P.4379.

141. Adamina M. et al. Monitoring c-reactive protein after laparoscopic colorectal surgery excludes infectious complications and allows for safe and early discharge // *Surg. Endosc.* – 2014. – №28. – P.2939–2948.
142. Aachoui Y., Ghosh S.K Extracellular Matrix from Porcine Small Intestinal Submucosa (SIS) as Immune Adjuvants // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol.6. - №11. – P.1-9.
143. Buell JF, Helm J, Mckillop IH, Iglesias B, Pashos N, Hooper P. Decellularized biologic muscle-fascia abdominal wall scaffold graft // *Surgery.* – 2021. - №169. – P.595-602.
144. Chauviere MV, Schutter RJ, Steigelman MB, Clark BZ, Grayson JK, Sahar DE. Comparison of AlloDerm and AlloMax tissue incorporation in rats // *Ann Plast Surg.* – 2014. - №73. – P.282-5.
145. Wainwright D.J., Madden M., Luterman A., Hunt J., Monafó W., Heimbach D., Kagan R., Sittig K., Dimick A..Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns // *J. Burn. Care. Rehabil.* – 1996. - V.17. – P.124.
146. Hui Xu, Hua Wan, Maryellen Sandor et al. Host Response to Human Acellular Dermal Matrix Transplantation in a Primate Model of Abdominal Wall Repair // *Tissue Engineering.* – 2008. – V.14. – №12.
147. Козлов В. А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // *Медицинская иммунология.* – 2013. - №. 15. - С. 399-412.
148. Oellerich, M., Budde, K., Osmanodja, B., Bornemann-Kolatzki, K., Beck, J., Schütz, E., & Walson, P. D. Donor-derived cell-free DNA as a diagnostic tool in transplantation // *Frontiers in genetics* – 2022. – V.13. – P.1-8.
149. Yoo, A., Riedel, A., Qian, I., Bartosic, A., Soltani, R., Kibria, G., Haririan, A., Drachenberg, C. B., Abrams, P. L., Odorico, J. S., Cooper, M., Bromberg, J. S., & Scalea, J. R. An Initial Analysis of the Baseline Levels of Dd-cfDNA After Pancreas Transplantation: A Prospective Study From High-volume Centers in the United States // *Transplantation direct.* – 2023. – V. 9, №4. – P.1459.
150. Ventura-Aguiar P, Ramirez-Bajo MJ, Rovira J, Bañón-Maneus E, Hierro N, Lazo M, Cuatrecasas M, Garcia-Criado MA, Liang N, Swenerton RK, Cofan F, Cucchiari D, Esforzado N, Montagud-Marrahi E, Oppenheimer F, Piñeiro G, Revuelta I, Torregrosa V, Ahmed E, Soboleva K, Kaur N, Zimmermann BG, Al Haj Baddar N, Demko ZP, Escrig C, Tabriziani H, Gauthier P, Billings PR, Amor AJ, Ferrer J, Campistol JM, Diekmann F. Donor-derived Cell-free DNA Shows High Sensitivity for the Diagnosis of Pancreas Graft Rejection in Simultaneous Pancreas-kidney Transplantation // *Transplantation.* – 2022. – V.106. – P.1690-1697.
151. Xu-Tao Chen, Jiang Qiu, Zi-Xuan Wu, Hui Zhang, Tong Chen, Shi-Cong Yang, Guo-Dong Zhao, Yu He, Xue Shen, Jin-Quan Luo, Yang Huang, Chang-Xi Wang, Li-Zhong Chen, Cheng-Lin Wu, Gang Huang. Using Both Plasma and Urine Donor-Derived Cell-Free DNA to Identify Various Renal Allograft Injuries // *Clinical Chemistry.* – 2022. – V. 68. - P.814–825.

152. Szilágyi, M., Pös, O., Márton, É., Buglyó, G., Soltész, B., Keserű, J., Penyige, A., Szemes, T., & Nagy, B. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – V.21. – P.6827.
153. Jiang, N., Pan, J., Fang, S., Zhou, C., Han, Y., Chen, J., Meng, X., Jin, X., & Gong, Z. Liquid biopsy: Circulating exosomal long noncoding RNAs in cancer // *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. – 2019. – V.495. – P.331–337.
154. Pös, O., Biró, O., Szemes, T., & Nagy, B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications // *European journal of human genetics : EJHG*. – 2018. – V.26. – P. 937–945.
155. Muluhngwi, P., Valdes, R., Jr, Fernandez-Botran, R., Burton, E., Williams, B., & Linder, M. W. Cell-free DNA diagnostics: current and emerging applications in oncology // *Pharmacogenomics*. – 2019. – V.20. – P.357–380.
156. Ranucci R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. – 2019. – V.1909. – P.3–12.
157. Bloom, R. D., Bromberg, J. S., Poggio, E. D., Bunnapradist, S., Langone, A. J., Sood, P., Matas, A. J., Mehta, S., Mannon, R. B., Sharfuddin, A., Fischbach, B., Narayanan, M., Jordan, S. C., Cohen, D., Weir, M. R., Hiller, D., Prasad, P., Woodward, R. N., Grskovic, M., Sninsky, J. J. Circulating Donor-Derived Cell-Free DNA in Blood for Diagnosing Active Rejection in Kidney Transplant Recipients (DART) Study Investigators. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. – 2017. - V28. – P.2221–2232.
158. Charan J., Biswas T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? // *Indian J. Psychol. Med.* – 2013. – V.35, №2. – P.121-126.
159. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств. – Москва, 2005. - С. 54-69.
160. Колхир П.В. Доказательная аллергология-иммунология, практическое пособие. - *Практическая медицина*, 2010. - 528 с.
161. Aibara N, Ohyama K, Hidaka M, Kishikawa N, Miyata Y, Takatsuki M, Eguchi S, Kuroda N. Immune complexome analysis of antigens in circulating immune complexes from patients with acute cellular rejection after living donor liver transplantation // *Transpl Immunol*. – 2018. - №48. – P.60-64.
162. Алексеев В.В. и др. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. – Изд. 3-е, перер. и доп. – Т. 1. - М.: Гэотар-Медиа, 2012. – 472 с
163. Griesemer A., Yamada K., Sykes M. Xenotransplantation: immunological hurdles and progress toward tolerance // *Immunol. Rev.* – 2014. – №258(1). – P.241-258.
164. Gurlek Demirci B., Sezer S., Colak T., Sayin C.B., Tural E., Haberal M. Post-transplant C-reactive protein predicts arterial stiffness and graft function in renal transplant recipients // *Transplant Proc.* – 2015. – N. 47(4). – P.1174-1177

165. Ефимов Д.Ю., Коритко А.А., Янушевская Е.А, Березнева Ю.С., Жук Г.В. и др. Ассоциация уровня растворимых цитокинов с развитием послеоперационных осложнений после трансплантации печени // Новые технологии в медицине. – 2016. – №1. – С. 75-80.
166. Кабулбаев К.А., Абеуова Б.А., Чингаева Г.Н., Шепетов А.М., Нугманова А.М. и др. Клинико-диагностическое значение цитокинов у пациентов после аллотрансплантации почки в отдаленном периоде // Вестник КазНМУ. – 2012. – №2. – С. 191.
167. Pahe A., Budhiraja P., Kaplan B. Polyclonal and monoclonal antibodies in renal transplant: an update // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. – 2015. – N. 24(6). – P.563–569.
168. Hellemans R., Bosmans J.L., Abramowicz D. Induction Therapy for Kidney Transplant Recipients: Do We Still Need Anti-IL2 Receptor Monoclonal Antibodies? // Am. J. Transplant. – 2017. – N. 17(1). – P. 22–27.
169. Fleming J.N., Taber D.J., Pilch N.A., Srinivas T.R., Chavin K.D. Yes, We Still Need IL-2 Receptor Antagonists // Am J Transplant. – 2016. – N. 16. – P. 3308-3309.
170. Маркушева Л.И., Савина М.И., Решина В.М. и др. Ядерные белки хроматина в оценке эффективности лечения больных псориазом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 7. – С. 18-20.
171. Максяткина Л.В., Абатов Н.Т., Ахмалтдинова Л.Н., Бадыров Р.М., Ирисметов А.Ш., Болекбаев Е.Б. Анализ циркулирующих иммунных комплексов у крыс после трансплантации децеллюляризованной ксеногенной брюшины // Вестник КазНМУ. – 2020. - №1. – С.424-426.
172. Максяткина Л.В., Абатов Н.Т., Ахмалтдинова Л.Н., Бадыров Р.М., Аятбек О.А., Жакыпов Д.Б. Сравнительная оценка иммунологических реакций организма в ответ на имплантацию внеклеточного матрикса ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального коллагена Permacol при пластике дефектов передней брюшной стенки в эксперименте // Вестник КазНМУ. – 2020. - №1. – С.301-305.
173. Махыаткина L.V., Badyrov R.M., Abatov N.T., Akhmaltdinova L.L. Extracellular matrix of xenoperitoneum: a comprehensive assessment of a new biological material for plastic surgery of anterior abdominal wall defects in experiment // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2021. - №170. – P.364-367.
174. Parshikov V.V., Mironov A.A., Kazantsev A.A., Alyokhin A.I. Visceral adhesions after tension-free abdominal wall repair with ultra-lightweight synthetic and titanium-containing meshes // Sovremennyye tehnologii v medicine. – 2017. – №9(3). – P. 45-54.
175. Сбродов М.И., Богданов Д.Ю., Кумуков М.Б. Современные имплантационные системы в герниологии // Эндоскопическая хирургия. – 2013. – №19(6). – С.55-63.

176. Протасов А.В., Шухтин Н.Ю., Покручин Н.А. и др. Применение современных материалов в хирургическом лечении паховых грыж // *Клин. практ.* – 2011. – №2. – С.32—36.

177. Бадыров Р.М. Экспериментальное обоснование применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки: дис...PhD. – Караганда: Карагандинский государственный медицинский университет, 2018. – 90 с.

178. Бадыров Р.М., Абатов Н.Т., Тусупбекова М.М., Альбертон И.Н., Матюшко Д.Н. Изучение биомеханических свойств нового биологического имплантата на основе внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки // *Медицина и экология.* – 2018. - №1. – С.123-127.

179. Абатов Н.Т., Тусупбекова М.М., Бадыров Р.М., Аbugалиев К.Р., Огай В.Б. Морфологические аспекты течения репаративного процесса при использовании внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки. // *Материалы международного симпозиума «Астана Биотех 2018»*, июнь 2018 г., Астана, Казахстан. – С.49.

180. Argani H. New Markers for Transplant Rejection // *Exp. Clin. Transplant.* – 2020. – №18 (Suppl 1). – P.1-9.

181. Trailin A.V., Pleten M.V., Ostapenko T.I., Iefimenko N.F., Nykonenko O.S. High urinary interleukin-2 in late post-transplant period portends a risk of decline in kidney allograft function: a preliminary study // *BMC Res. Notes.* – 2017. – №10(1). – P.605.

182. Ang R.L., Ting A.T. Tumor necrosis factor-driven cell death in donor organ as a barrier to immunological tolerance // *Curr. Opin. Organ Transplant.* – 2019. – 24(1). – P.12-19.

183. Rogers J.C. et al. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1972. – №69. – P.1685-1689.

184. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике // *Молекулярная биология.* – 2008. – №42(1). – С. 12-23.

185. Sozzi G., Conte D., Mariani L., et all. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patient // *Cancer Res.* – 2001. – №61. – P.4675-4678.

186. Абатов Н.Т., Альбертон И.Н., Бадыров Р.М., Тусупбекова М.М., Каукуенов Б.Н. Сравнительная морфология тканей передней брюшной стенки при использовании биологических имплантантов на основе децеллюляризированной ксенобрюшины и ацеллюлярного дермального матрикса (Permacol) в эксперименте. *Материалы V Ежегодной Международной Научно-Практической Конференции «Актуальные вопросы медицины»*, апрель, 2016г, Баку, Азербайджан. – С.137.

187. Abatov N, Tussupbekova M, Badyrov R, Abugaliev K, Abatova A. The study of a bovine-derived peritoneum implant biocompatibility for abdominal wall reconstruction // Eur Surg Res. – 2016. – 57 – Suppl 1. – P. 92.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Стандартные операционные процедуры

Стандартная операционная процедура анестезии крыс

1 Материалы

1.1 Диэтиловый эфир;

1.2 Индукционная прозрачная камера (стеклянный колпак с притертой крышкой).

2 Процедуры

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

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

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

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

2.4.1 Восстановление:

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

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

1 Материалы

1.1 Анестетики;

1.2 Анальгетики;

1.3 Стерильные хирургические инструменты (скальпель, зажимы, пинцет);

1.4 Ножницы;

1.5 Марля;

1.6 70% спирт;

1.7 Раствор хлоргексидина 2%;

1.8 Стерильные ватные шарики;

1.9 Шовный материал.

2 Процедуры

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

2.2 Предоперационные мероприятия:

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

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

2.2.3 Подготовленный участок кожи обработать раствором хлоргексидина 2%.

2.2.4 Уложить животное на операционный столик.

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

2.2.6 Подготовка хирурга:

2.2.6.1 Помыть руки.

2.2.6.2 Надеть маску и чистый хирургический костюм.

2.2.6.3 Провести асептическую обработку рук.

2.2.6.4 Надеть стерильные перчатки.

2.2.6.5 Хирург должен избегать контакта с нестерильными поверхностями.

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

2.3 Моделирование раны:

2.3.1 Убедитесь, что все необходимые материалы под рукой.

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

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

Стандартная операционная процедура закрытия биоимплантатом дефекта передней брюшной стенки экспериментального животного

1 Материалы

1.1 Биоимплантат (ВКМ ксенобрюшины или Permacol);

1.2 Иглодержатель;

1.3 Пинцет анатомический;

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

1.5 Марлевые салфетки;

1.6 Стерильный физиологический раствор;

1.7 Бинт;

1.8 Пластырь;

2 Процедуры

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

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

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

2.4 Контроль на гемостаз

2.5 Производится ушивание раны известными способами, асептическая повязка.

Стандартная операционная процедура забора крови у крыс, ее транспортировка и хранение

1 Материалы

1.1 Стерильные шприцы 5,0 мл;

1.2 Ножницы;

1.3 Скальпель;

1.4 Эпандорфы;

1.5 70% спирт;

1.6 Контейнер для транспортировки крови;

1.7 Пробирки.

2 Процедуры

2.1 Согласно СОП анестезии животного, дать крысе эфирный наркоз.

2.2 Наркотизированную крысу зафиксировать к операционному столику на спину.

2.3 Выстричь шерсть в области грудной клетки и обработать спиртом 70%.

2.4 используя скальпель и ножницы, острым путем произвести срединную торакотомию.

2.5 визуализировать верхушку сердца, после чего, параллельно плоскости грудной клетки, вводить иглу в проекцию левого желудочка, одновременно потягивая поршень на себя.

2.6 При появлении крови в шприце остановить продвижение иглы и набрать 3-5 мл крови.

2.7 Перед сливанием крови из шприца в пробирки, необходимо снять иглу со шприца для предотвращения лизиса эритроцитов.

2.8 Эвакуированную кровь переместить в пробирки, уложить их в контейнер для транспортировки и транспортировать в лабораторию для центрифугирования и последующей заморозки сыворотки ($t = -20^{\circ}\text{C}$).

2.9 После отстаивания крови в течение 40 мин, кровь центрифугировать 10-15 мин при 1500 об/мин.

3.0 После центрифугирования произвести забор сыворотки из пробирок и переместить ее в эпендорфы ($V=1.5$ ml), уложить в штатив и поместить в морозильную камеру ($t = -20^{\circ}\text{C}$).