

Винахід належить до галузі медицини і стосується способів виготовлення тканинних імплантатів для регенеративно-відновної хірургії, а також для створення аутологічної тканини як тканинного матриксу для тканинної інженерії.

Відомий спосіб отримання тканинних імплантатів на основі модифікованої підслизової оболонки тонкої кишки тварин [1]. Згідно зі способом відрізок тонкої кишки витримують в гіпертонічних розчинах хлориду натрію з одночасним УЗ-впливом, після чого проводять ферментативну обробку і послідовне відмивання в розчинах оцтової кислоти і бікарбонату натрію. Весь процес обробки тканини повторюють, після чого тканину витримують в антимікробному розчині і в розчинах глутарового альдегіду зростаючих концентрацій.

Відомий спосіб отримання тканинних імплантатів для серцево-судинної хірургії з ксеноперикарда, гліссонової капсули печінки теляти або свині, свинячого аортального або легеневого комплексу [2]. Спосіб включає хімічну стабілізацію біотканини консервуючим розчином - 0,625 % водним розчином глутарового альдегіду та подальшу обробку поверхнево-активною речовиною з 4-кратною зміною робочого розчину. Перед імплантацією відмивають стерильним фізіологічним розчином з 6-кратною його зміною і обробляють 0,05 і 5 % водним розчином N-сульфосукцинат хітозану з молекулярною масою 50-150 кД, при інтенсивному перемішуванні протягом 0,5-2 години при температурі 22 °С. Далі фіксують в стерильному абсолютному етанолі і зберігають при температурі 6-8 °С у стерильному фізіологічному розчині.

Відомий спосіб отримання тканинних імплантатів з внутрішніх грудних артерій і перикарда великої рогатої худоби [3]. Спосіб полягає в тому, що біотканини обробляють базовим консервуючим розчином епоксисполук (рН 3,0-11,0) при температурі 4-45 °С протягом 2-21 діб, після чого промивають і обробляють розчином хлоргексидину з концентрацією не менше 1 % при рН 3,0-8,0 і температурі 15-45 °С протягом 2-16 годин, потім знову промивають і повторно обробляють консервуючим розчином протягом 1-3 діб.

Загальним недоліком зазначених способів є обробка донорської тканини хімічними реагентами, які здатні викликати негативні ефекти і призводити до порушення цілісності структурних білків імплантатів, спричиняють пошкодження та розволокнення еластичних волокон як наслідок, до розривів тканини і осадження кальцію на пошкоджених ділянках, провокуючи утворення центрів дистрофічної кальцифікації. Біотканина, яка була позбавлена клітин, протеогліканів і глікопротеїнів, являє собою досить рихлу і пористу структуру з колагенових волокон, які мають кальційзв'язуючу здатність. В ході хімічної обробки некротичних загиблі клітини та їх фрагменти також є ядрами кальцифікації. Консервуючи розчини значно погіршують фізико-механічні властивості імплантатів, в результаті чого вони набувають підвищеної жорсткості і втрачають пластичні властивості і запас міцності. Крім того, хімічна модифікація біотканини може привести до додаткової мінералізації, при цьому поверхня тканинних імплантатів екранується, що, в свою чергу, обмежує і уповільнює процеси заселення клітинами реципієнта та процеси біоінтеграції. Імплантати, отримані зазначеними способами, після трансплантації можуть спричиняти ускладнення, які пов'язані з токсичним впливом на організм реципієнта. Стабілізація біотканини глутаровим альдегідом призводить до утворення значної кількості вільних альдегідних груп, які можуть в процесі репопуляції провокувати загибель клітин з відкладанням на імплантаті клітинних фрагментів. Навіть тривале і послідовне відмивання від консервантів не гарантує відсутності токсичного ефекту в імплантаті, оскільки складно контролювати ступінь і повноту відмивання. Все це погіршує якість імплантатів, підвищує ризик ускладнень після імплантації і скорочує терміни їх функціонування що приводить до необхідності реоперацій.

Найбільш близьким до заявленого способу за сукупністю ознак і технічним результатом є спосіб отримання судинних імплантатів з артерій свині [4]. Відповідно до способу нативні внутрішньогрудні артерії свині тричі промивають охолодженим до 4 °С стерильним фізіологічним розчином з додаванням антибіотика, поміщають в стерильні контейнери і заморожують в парах рідкого азоту. Відігрівання здійснюють на водяній бані при 37 °С. Після відігрівання опромінюють потоком електронів. Режим опромінення здійснюють в діапазоні доз поглинання 25кГр÷50кГр при 25 °С, розподіливши дискретно в часі. Після чого повторно заморожують і зберігають в рідкому азоті.

Недоліком способу є те, що в ньому використовуються такі режими обробки біотканини, які призводять до порушень цілісності структурних матричних білків, їх просторової орієнтації, взаємозв'язків і значної втрати внутрішнього мікросередовища. У результаті знижується якість тканинних імплантатів, а саме - знижується ступінь спорідненості з тканинами реципієнта, що уповільнює запуск процесів заселення і морфогенезу, підвищується ризик розвитку дистрофічної кальцифікації, яка призводить до патологічної мінералізації та структурної деградації імплантатів, погіршуються фізико-механічні властивості (модуль пружності, межа міцності, запас деформаційної здібності), через що призводить до посилення жорсткості імплантатів, зниження запасу рівномірного відносного подовження і часткової втрати працездатності при динамічних навантаженнях в процесі ремоделювання та скорочення терміну їх функціонування.

В основу винаходу поставлена задача удосконалити відомий спосіб отримання тканинних

імплантатів шляхом зміни режимів обробки біотканини, що дозволить зменшити ступінь ушкодження цілісності структурних матричних білків, порушення їх просторової орієнтації та взаємозв'язків, знизити втрати внутрішнього мікросередовища і за рахунок цього підвищити якість тканинних імплантатів: збільшити ступінь спорідненості з тканинами реципієнта, знизити ризик розвитку дистрофічної кальцифікації, поліпшити фізико-механічні властивості і збільшити терміни їх функціонування.

Ця задача вирішується тим, що у відомому способі отримання тканинних імплантатів, який включає трикратне промивання тканини охолодженим до 4 °С стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком, поміщення в контейнери, заморожування в парах рідкого азоту, відігрівання, опромінення потоком електронів при температурі 25 °С, повторне заморожування і зберігання, відповідно до винаходу, відігрівання біотканини проводять спонтанно при температурі навколишнього середовища 20-23 °С, опромінення потоком електронів здійснюють в діапазоні доз поглинання 15÷20 кГр, причому час від початку відігрівання до закінчення опромінення становить 3,5-4 години, а повторне заморожування і зберігання здійснюють при -150...-170 °С у парах рідкого азоту.

Спонтанний відігрів біотканини при 20-23 °С, на відміну від відігрівання біотканини на водяній бані, дозволяє уповільнити гетерогенну нуклеацію кристалів льоду в процесі рекристалізації і, тим самим, зменшити кріоушкодження, що виникають внаслідок термомеханічних напруг в сполучній тканині при заморожуванні. Це дозволяє знизити ушкоджувальний ефект низькотемпературного впливу на структурні білки імплантатів та уникнути утворення тріщин і порожнин (пористості, велико- і дрібнопористих ділянок) в стромі тканини, що виникають після заморожування.

Зниження дози опромінення до 15÷20кГр дозволяє знизити ступінь негативного впливу іонізуючого випромінювання на біотканини. Такі дози опромінення, з одного боку, забезпечують програмовану клітинну загибель клітин (апоптоз), а з іншого - зниження шкідливої дії на сполучнотканинний каркас тканини. При цьому, основна структурна диференціація і фіброархітектоніка тканини зберігаються, знижується ступінь утворення поперечних між білкових зшивок в тканинних імплантатах, що дозволяє знизити ступінь ущільнення і зближення всередині колагеновоеластичних прошарків, та зменшити ступінь дисоціації білково-полісахаридних комплексів, які забезпечують їх взаємодію і взаємозв'язки. У свою чергу, це дає можливість збільшити простір між пучками волокон і відновити їх структурну організацію, і таким шляхом упорядкувати взаєморозташування і просторову орієнтацію матричних білків, а також запобігти утворенню пористості в стромі тканинних імплантатів. Крім того, зменшення кількості поперечних зшивок дозволяє зменшити механічне напруження в біотканині, уникнути затвердіння стінок імплантатів і знизити тим самим надлишкову жорсткість, яка погіршує їх фізико-механічні властивості, і дає змогу збільшити стійкість пластичної деформації і поліпшити фізико-механічні властивості.

Чітке дотримання часу (3,5-4 години) від початку відігрівання до закінчення опромінення, здійснення заморожування і зберігання контейнерів з біоматеріалом в парах рідкого азоту (-150...-170 °С) дозволяє максимально зберегти повноцінну цілісність тканинних імплантатів і забезпечити найменші структурні пошкодження. Дотримання вказаних умов під час дії фізичних факторів є важливим, тому що, у протилежному разі, можливий розвиток процесів денатурації структурних білків, порушення мікросередовища матриксу, виникнення небажаних мікробіологічних і хімічних реакцій та втрата якості тканинних імплантатів.

Морфологічна структура тканинних імплантатів зберігається на рівні, близькому до нативної тканини. Структурні матричні білки (колагенові і еластичні фібрили) характеризуються неперервністю, з правильною поздовжньою, паралельною один до одного орієнтацією, менше вираженою звитістю і ритмічністю, з вузькими між пучковими просторами. Зберігаються білково-полісахаридні комплекси. У сполучнотканинному матриксі відсутні крупні порожнини структур пористості.

При цьому добре зберігається тонка організація структур пористості взаємозв'язків між матричними білками, а також зв'язок з макромолекулами позаклітинного матриксу, що дає можливість знизити втрати внутрішнього мікросередовища і підвищити ступінь спорідненості тканинного імплантату з тканинами реципієнта, що є важливим для запуску процесів заселення і морфогенезу.

Збереження структурної цілісності матричних білків і відсутність дефектів у вигляді пористих утворень дозволяють знизити ризик розвитку дистрофічної кальцифікації, оскільки зменшується число центрів нуклеації кальцинозу і кількість місць для проникнення поліпотентних клітин-попередників, які здатні до фенотипічної проостеогенної трансформації, і можуть призводити до патологічної мінералізації та структурної деградації тканинних імплантатів.

Поліпшення структурної організації тканинних імплантатів, отриманих заявленим способом, дозволяє якісно поліпшити їх фізико-механічні властивості: зменшити модуль пружності, але зберегти високу стійкість до біодеградації, зберегти запас міцності та збільшити стійкість до пластичної деформації. Це дозволяє тканинним імплантатам тривалий час перебувати в умовах організму реципієнта: зберігати свою структурну цілісність до завершення процесів морфогенезу і формування нової повноцінної структури протеза; зберігати здатність до основних видів деформації (розтяжність,

стійкість до зламу і скручування), протистояти фізіологічним навантаженням в процесі ремоделювання і, відповідно, збільшити терміни їх функціонування. При цьому забезпечується зниження імуногенності тканинних імплантатів, зберігається потенціал до ендогенної репопуляції *in vivo*, підтримується міграція, проліферація і життєздатність клітин, що забезпечує швидку васкуляризацію і селективний ріст тканини в зоні заміщення дефекту.

Приклад 1

Сировиною для отримання тканинних імплантатів були внутрішньо грудні артерії свині 6-8-місячних без порідних свиней. Судини виділяли через 30 хв., після забою при дотриманні правил асептики. Потім їх препарували, видаляли жирові привіски та надлишки сполучної тканини і отримували судини довжиною 5-10 см, внутрішнім діаметром 2,5-5 мм. Судини трикратно промивали охолодженим до 4 °С стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком та поміщали в стерильні контейнери, не допускаючи деформування. Контейнери занурювали в пари рідкого азоту на рівні 30 см над поверхнею дзеркала рідкої фази та зберігали при температурі -150...-170 °С. Відігрівання контейнерів здійснювали при кімнатній температурі 20-23 °С. Термін спонтанного відігрівання становив 90-110 хв. Після відігрівання проводили опромінення потоком електронів на лінійному прискорювачі електронів (ЛПЕ-10) з дозою поглинання 15÷20 кГр. З метою попередження теплової денатурації структурних матричних білків процес опромінення здійснювали дискретно при 25 °С. Час від початку відігрівання, до закінчення процесу опромінення не перевищувало 3,5-4 години. Після завершення режиму опромінення стерильні контейнери з тканинними імплантатами судин занурювали в пари рідкого азоту і заморожували до температури -150...-170 °С та зберігали в умовах низькотемпературного банку протягом місяця до моменту використання. Паралельно здійснювали спосіб за прототипом.

Морфологічну структуру тканинних імплантатів досліджували методом світлової та електронної мікроскопії [5].

Результати порівняльного аналізу показано на Фіг. 1-8. На Фіг. 1 (забарвлення за ГЕ, x200) видно, що інтима імплантатів судин, отриманих заявленим способом, має добре збережену внутрішню еластичну мембрану з повною втратою поверхневої ендотеліальної вистілки, контури її гладкі, чіткі, порушення безперервності не встановлені. На Фіг. 2 (забарвлення за Ван-Гізон-Вергоффом, x200) показано інтиму судин, отриманих за прототипом, з повністю десквамованими ендотеліальними і подендотеліальними шарами. Підендотеліальний шар був представлений рихлою сполучною тканиною, що містить розволоченні колагенові волокна. Для всіх видів обробки в імплантатах розвивалися тяжкі ушкодження клітин, що проявлялося, перш за все, некробіозом і некрозом фібробластів та ендотеліоцитів з тотальною десквамацією ендотеліальних клітин. Як видно на Фіг. 1 (забарвлення за ГЕ, x200), архітектоніка тканини імплантату судин, отриманих заявленим способом, зберігає свою просторову орієнтацію та структурну цілісність, і найбільш наближена до нативної тканини. Структурні матричні білки (колагенові і еластичні волокна) імплантату забезпечували функції каркаса тканини, при цьому ділянки розволочення колагенових волокон були відсутні. На Фіг. 2 (забарвлення за Ван-Гізон-Вергоффом, x200) показано, що фібрили всієї товщі імплантату були з менш вираженою звитістю та ритмічністю, мали паралельне розташування відносно одне до одного з вузькими міжпучковими просторами і не виявляли великі пористості в порожнині тканини. Однак, як видно на Фіг. 3 (забарвлення за ГЕ, x200), еластичні волокна артерій за прототипом характеризувалися більш вираженим зниженням звитості та більш компактным розташуванням волокон. Така упорядкованість упаковки волокон в імплантаті обумовлена більш високими дозами опромінення, які підвищують здатність до зшивання еластичних волокон та стимулюють утворення додаткових зшивок в матричних білках, що і призводить до зближення волокон. Внаслідок цього, як видно на Фіг. 4 (забарвлення за Ван-Пзон-Вергоффом, x200), в сполучнотканинній мідії формуються великі порожнинні структури пористості, походження яких також зв'язано і з процесами дегідратації тканини під впливом іонізуючого випромінювання. На Фіг. 5 показана ультраструктура волокнистих компонентів імплантатів, отриманих заявленим способом, яка характеризується збереженням архітектоніки фібрил. Колагенові волокна (КВ), що розташовуються між еластичними мембранами (ЕМ) і гладко м'язовими клітинами (ГМК), не зазнавали суттєвих змін, зберігали цілісність, безперервність і своє просторове розташування, проте між пучками також спостерігалися електронно-світлі порожнини. Для ГМК була характерна зміна форми ядер, що виявляється у вигляді відсутності інвагінацій каріолеми і розпушення гетерохроматину. В цих клітинах зберігалася цілісність цитолемми, а їх базальні мембрани були фрагментовані. У середині колагенових пучків і колагеново-еластичних прошарків зберігалися білково-полісахаридні елементи (БПК) з'єднання фібрил. На Фіг. 6 показана висока ступінь збереження зв'язків між матричними білками і макромолекулами позаклітинного матриксу (БПК) - ділянки з'єднання колагенових волокон (КФ) до еластинових волокон (ЕВ) практично не пошкоджені. Обробка за прототипом мала відмінні ознаки в ультраструктурі еластичних мембран в імплантаті. На Фіг. 7 показано, що в зоні руйнування клітинних елементів відбувалося утворення великих електронно-світлих порожнин, що містять клітинний детрит. Саме в цих місцях

максимального руйнування клітин спостерігалися осередки лізису і дисоціації колагенових волокон (KB) та відзначалися ділянки набухання і розпушення еластичних волокон (EB). На Фіг 8. показана часткова дисоціація білково-полісахаридних комплексів (значок) та порушення зв'язків з усередині позаклітинного матриксу безпосередньо в зоні з'єднання колагенових (KB) і еластинових (EB) волокон.

У всіх випадках обробки найбільш слабкою ланкою в ультраструктурі імплантатів були клітинні елементи і безпосередньо контактуючі з ними зони колагенових волокон. Встановлено, що в імплантатах судин, отриманих заявленим способом, каркасні структури (еластичні мембрани та пов'язані з ними пучки колагенових волокон) більш стійкі до використовуваних впливів і менш схильні до структурної деградації.

Морфологічні дослідження демонструють, що заявлений спосіб отримання імплантатів забезпечує повну децелюляризацію імплантатів зі збереженням еластичних мембран і пучків колагенових волокон, при цьому забезпечується збереженість білково-полісахаридних комплексів, відповідальних за взаємодію, а також їх просторову орієнтацію, взаємне розташування і просторові взаємозв'язки, які характеризують високий рівень збереження внутрішнього мікросередовища в тканинних імплантатах.

Проводили порівняльний аналіз морфометричних показників стінки тканинних імплантатів судин в залежності від способу отримання. Досліджували 3 групи: група 1- підготовку імплантатів судин здійснювали заявленим способом; група 2 - підготовку імплантатів судин здійснювали за прототипом; група 3 - нативні судини (контроль). Морфологічну структуру тканинних імплантатів досліджували методом світлової мікроскопії [5] і проводили морфометричні вимірювання: товщина судинної стінки, внутрішній периметр судини, внутрішній і зовнішній радіуси судинного просвіту. [6]. Результати морфометричних показників стінки імплантатів судин наведені в Таблиці 1.

В Таблиці 1 показано, що всі морфометричні показники імплантатів після обробки зменшувалися в порівнянні з нативними судинами, що пов'язано з повною деендотелізацією, руйнуванням структури м'язових волокон і ГМК, зближенням і скороченням еластичних мембран та частковою дегідратацією судинної стінки. В обох групах діаметр судинного просвіту імплантату не змінюється - значення показників внутрішнього периметра, внутрішнього і зовнішнього радіусів достовірно не відрізняються. Виявлено, що товщина стінки імплантатів судин, отриманих заявленим способом, зменшується в порівнянні з контролем на 21 %, а товщина стінки імплантату, отриманого за прототипом, зменшується на 27 % в порівнянні з контролем та свідчать про статистично значущі відмінності між групами.

Таким чином, потовщення стінок імплантату судин, отриманого заявленим способом, значно більш виражено в порівнянні зі стінками імплантату судин, отриманого за прототипом, та найбільш наближено до товщини нативних судин. Такі відмінності обумовлені змінами у морфологічній структурі тканинних імплантатів та свідчать про більш сильнішу модифікацію нативної тканини, яка залежить від режиму опромінення в процесі обробки. Зі збільшенням дози опромінення в імплантаті збільшується ступінь зшивання і ступінь ущільнення структурних матричних білків в сполучнотканинній основі, що викликає затвердіння та призводить до стоншення стінки імплантату, при цьому, відповідно, посилюється і жорсткість матриксу.

Вивчали фізико-механічні властивості судинних імплантатів в залежності від способу отримання. 1 - група - підготовку судин здійснювали заявленим способом; 2 група - підготовку артерій здійснювали за прототипом; контроль - нативні судини. Для вивчення фізико-механічних властивостей проводили одночасне розтягнення судин на випробувальній деформаційній машині. Отримані деформаційні криві обробляли і розраховували основні фізико-механічні показники [7]. Результати випробувань наведені в Таблиці 2.

З Таблиці 2 видно, що в порівнянні з нативними судинами в судинних імплантатах значуще зростають модуль пружності, межа міцності і деформаційна здатність, що підтверджує утворення між білкових зшивок і характеризує стабілізацію біотканини в процесі обробки. З Таблиці 2 видно, що модуль пружності Е судин, отриманих за прототипом, достовірно збільшувався в 2,5 рази, а модуль пружності Е судин, отриманих заявленим способом, збільшувався в 1,5 рази відносно контролю, та мав статистично значущі відмінності між групами. При цьому межа міцності λ імплантатів зберігалася на одному рівні. Виявлено значуще збільшення (на 12 %) запасу деформаційної здібності у імплантатів, отриманих заявленим способом, в порівнянні з деформативністю імплантатів судин, отриманих за прототипом. Відомо, що модуль пружності визначається тільки пружними властивостями матеріалу і відповідає за твердість (жорсткість) тканини, яка прямо пропорційна модулю пружності. В той же час, можна відзначити, що значне додаткове зміцнення волокон може призводити до їхньої крихкості. Отже, в імплантатах судин, отриманих заявленим способом, зменшується жорсткість матриксу, що дозволяє збільшити їх здатність до розтягування при гемодинамічних навантаженнях в процесі ремоделювання.

Таким чином, заявлений спосіб підготовки судинних імплантатів дозволяє зменшити пружні властивості імплантатів, але при цьому зберегти високу стійкість до біодеградації, зберегти високий запас міцності і збільшити деформаційні властивості імплантатів. Імплантати мають високу стійкість до біодеградації та можуть тривалий строк існувати в організмі реципієнта до завершення процесу

ремоделювання стінки судини, при цьому, зберігають запас міцності до динамічних навантажень та здатність до рівномірного відносного подовження в зоні пружних деформацій, а також стійкість до зламу і скручуванню.

Якість судинних імплантатів свині досліджували після протезування черевної аорти кроля. Вивчали процеси заселення, морфогенезу і функціональні властивості на різних строках після ксенотрансплантації. Контейнери з імплантатами вилучали з парів рідкого азоту, після спонтанного відігрівання відмивали стерильним фізіологічним розчином з додаванням антибіотиків. Потім імплантували як судинні протези для заміщення ділянки черевної аорти кроля. Тканинну реакцію реципієнта на імплантацію, процес ремоделювання стінки аорти і стан структури імплантату після протезування вивчали методом світлової мікроскопії. Тривалість спостереження після трансплантації (без застосування імуносупресивних препаратів) становила 4,5 року.

Випадків відторгнення судинних імплантатів і ускладнень в післяопераційному періоді не виявлено. Як видно на Фіг. 9 (забарвлення за ГЕ, x400), вже через 7 діб після трансплантації власні клітинні фрагменти в сполучнотканинній структурі протеза були відсутні - повністю лізовані макрофагами. В той же час на люмінальній поверхні судинного протеза з боку зони анастомоза були відзначені процеси формування неоінтими. Через 15 діб, як показано на Фіг. 10 (імпрегація міжклітинних границь сріблом, x200) неоендотеліальний шар повністю покривав внутрішню поверхню протеза - веретеновидні ендотеліоцити орієнтувалися по току крові, рівномірно розташовувалися і формували вистілку інтими. Клітинна реакція була практично відсутня, реакції імуногенного запалення і відторгнення трансплантату не спостерігалися, що свідчило про формування неоінтими, запуск механізмів клітинної адгезії і високий ступінь спорідненості імплантату судини свині з тканинами кроля. Вивчення мікропрепаратів судинного протеза досліджуваних тварин показало, що через 6 місяців після трансплантації внутрішня оболонка протеза була потовщена за рахунок фіброзної гіперплазії і покрита численними групами ендотеліоцитів, проте в центральному відділі протеза процеси репопуляції ще не були закінчені. У середній і зовнішній оболонках відзначалося посилення колагеноутворення, фібробласти і гладком'язові клітини зберігали синтетичну активність, відновлювалася капілярна сітка (*vasa vasorum*). На Фіг. 11 (забарвлення за ГЕ, x200) показано ділянку новоствореної стінки судини через 6 місяців після трансплантації - наявність повністю сформованої неоінтими протеза з чітким диференціюванням ендотеліальної вистилки, підендотеліальним шаром і внутрішньою еластичною мембраною. Сполучнотканинні волокна судинного протеза (знизу) повністю зберігали структурну організацію, при цьому зазначалося заселення внутрішнього шару протеза власними ГМК реципієнта. Слід також відзначити наявність поодиноких макрофагів в товщі судинної стінки, що свідчить про активний процес ремоделювання біопротеза. Адвентиціальний шар був представлений рихлою сполучною тканиною і одиничними капілярами мережі. Реакції запалення і відторгнення були відсутні на всьому протязі біопротеза, включаючи зони анастомозу. Максимальне заселення стінки протеза клітинами реципієнта було виявлено в період 9-12 міс. після трансплантації: відзначалося значне збільшення кількості фібробластів в судинній медії. Через 1 рік після протезування наново сформована стінка імплантату, як і русло аорти, складалася з 3-х оболонок: внутрішньої, середньої і зовнішньої. На Фіг. 12 (забарвлення за ГЕ, x200) показана будова новоствореної стінки протеза в області анастомозу (видно слід від шовного матеріалу) через 1 рік. Сформовані всі шари судинної стінки: інтима, медія, адвентиція. Внутрішня оболонка протеза покрита безперервним шаром ендотелію. Внутрішня еластична мембрана і еластичні мембрани медії протеза нерівномірно звиті, безперервні в області анастомозу. У внутрішній оболонці сформований м'язово-еластичний шар з достатньою метаболічною і проліферативною активністю гладко м'язових клітин і фібробластів. Між сполучнотканинними волокнами розташовуються клітини гладких м'язів і фібробласти. По всій довжині судинного протеза, який зберігає свою структурну цілісність, розвинений периваскулярний шар фіброзної тканини, сформовані мікрокапіляри. Реакції імуногенного запалення і відторгнення трансплантату не спостерігалося. Після вивчення зразків аорти кролів, які прожили після протезування 3,9-4,5 роки показав, що реакція стінки на імплантат є мінімальною: повна відсутність грубих рубців і зрощень, відсутність клітинних інфільтратів. На Фіг. 13 (забарвлення ГЕ, x400) показано ділянку ремодельованої стінки аорти кроля через 4,5 роки після трансплантації. Сформована потовщена неоінтима з поздовжньо орієнтованими міоцитами (фігурна дужка), внутрішня еластична мембрана (товста стрілка), ендотелій вистилає внутрішню поверхню аорти. На Фіг. 14 (забарвлення за Вейгертом, x250) показано, що колагенові і еластичні волокна в середній оболонці медії протеза аорти відповідають опису до повноцінної будови нативної аорти.

Результати експериментального ксенопротезування показали, що судинні імплантати свині, отримані заявленим способом, тривалий час існували в організмі реципієнта, підтримували міграцію, проліферацію і життєздатність клітин, служили каркасом для формування повноцінної судинної стінки, витримували тривалі гемодинамічні навантаження. Просвіти в судинах у всіх випадках були прохідні і вистелені інтимою з новоствореним ендотелієм. Середня оболонка мала добре розвинений еластичний каркас, наближений за будовою до нативного. Адвентиціальна оболонка мала нормальну будову з добре сформованою мережею мікрокапілярів, яка забезпечувала повноцінне живлення

судинної стінки.

Структурні матричні білки тканинного імплантату тривалий час зберігали цілісність і впорядкованість. Морфологічна структура імплантату мала відповідну тривимірну архітектуру і внутрішнє мікросередовище, які необхідні для запуску механізмів клітинної адгезії, заселення власними клітинами реципієнта і репопуляції та забезпечення конструктивного ремоделювання.

Отримані результати свідчать про високий ступінь спорідненості тканинних імплантатів, отриманих заявленим способом, їх повноцінної інтеграції в організм реципієнта, гемо- та біосумісності, а також стійкості до структурної та кальцієвої дегенерації.

Приклад 2

Сировиною для отримання тканинних імплантатів служив перикард 6-8-місячних безпорідних свиней. Перикард свині виділяли з перикардіального мішка серця, відокремлювали серозний шар, з фіброзного шару видаляли жирові привіски й надлишки сполучної тканини, розрізали на клапти різних типорозмірів та піддавали обробці, як описано в Прикладі 1.

Морфологічну структуру тканинних імплантатів досліджували методом світлової та електронної мікроскопії [5].

Мікроскопічна будова імплантатів перикарду відповідала структурі щільної волокнистої сполучної тканини і найбільш нагадувала нативну тканину, морфоструктура якої показана на Фіг. 15 (Забарвлення ГЕ, $\times 400$). На Фіг. 16 (забарвлення ГЕ, $\times 400$) показано, що структурні матричні білки (колагенові і еластичні фібрили) перикарду зберігають правильну поздовжню і паралельну один до одного орієнтацію. Спостерігається ущільнення пучків колагенових волокон - пучки щільно наближають один до одного, утворюючи досить товсті тяжі, між якими локально видно вузькі пучкові простори. Ступінь звивистості колагенових волокон місцями згладжується і практично зникає, а на деяких ділянках, навпаки, відбувається збільшення амплітуди згинання волокон. Ультраструктурні зміни перикарду характеризуються вираженими деструктивними змінами клітинних елементів і втратою поверхневої вистилки (мезотелія). На Фіг. 17 показана ультраструктура волокнистих компонентів тканини перикарда, яка відображає збереження архітекτονіки фібрил. Колагенові волокна (KB), що розташовуються між еластичними мембранами (ЕМ) і гладком'язовими клітинами, не зазнавали суттєвих змін. Структурні порушення клітин характеризувалися гетерохроматизацією ядер (Я), утворенням великих пазирів в клітинній мембрані, деструкцією мітохондрій. На Фіг. 18 видно, що колагенові (KB) і еластичні волокна (EB) зберігали цілісність, безперервність і просторову орієнтацію. Як видно на Фіг. 19, після обробки в імплантатах зберігається тонка організація колагенових фібрил (KF) - всередині зберігаються білково-полісахаридні елементи (БПК) з'єднання фібрил, що зміцнюють і впорядковують матрикс та характеризують збереження внутрішнього мікросередовища в імплантатах.

Морфологічні дослідження доводять, що в тканинних імплантатах забезпечується повна деструкція клітинних елементів і збереження сполучнотканинної основи. Структурні матричні білки зберігають архітекτονіку, просторове розташування та взаємозв'язки. Збереження щільного розташування, цілісності колагенових пучків і тривимірної мережі еластичних фібрил забезпечує каркасні функції тканинних імплантатів та визначає їх фізико-механічні властивості і стійкість до механічної напруги.

Для вивчення фізико-механічних властивостей імплантатів перикарду, отриманих заявленим способом, проводили одночасне розтягнення тканини в двох напрямках з урахуванням анізотропії на випробувальній деформаційній машині. Отримані деформаційні криві обробляли і розраховували основні фізико-механічні показники [7]. Результати випробувань наведені в Таблиці 3.

З Таблиці 3 видно, що модуль пружності E перикарду збільшувався в 2,5 рази в поздовжньому напрямку навантаження і в 1,86 рази в радіальному напрямку. Межа міцності λ зберігалася на рівні контрольної групи при поздовжньої деформації і значуще знижувалася на 42 % під час радіальної. Запас деформаційної здібності δ достовірно зменшувався на 28 % і на 33 %, відповідно, в порівнянні з контролем.

Таким чином, імплантат перикарда має високу стійкість до біодеградації, може тривалий строк існувати в організмі реципієнта, зберігає запас міцності до динамічних навантажень та здатність до розтягування в поздовжньому і в поперечному напрямках, а також стійкість до зламу і скручування.

Якість тканинних імплантатів свині досліджували після протезування дефекту стінки сечового міхура у кроля і вивчали процеси заселення, морфогенезу і функціональні властивості на різних термінах після ксенопротезування. Контейнери з імплантатами після спонтанного відігрівання відмивали стерильним фізіологічним розчином з додаванням антибіотиків. Формували область дефекту на стінці сечового міхура у кроля та імплантували. Тканинну реакцію, змінення структури імплантату після протезування вивчали методом світлової мікроскопії [5]. Строки спостереження становили від 3 міс. до 3 років.

Дослідження показало, що ніяких виражених реакцій, що свідчать про активні процеси відторгнення з боку тканин сечового міхура, і ускладнень в післяопераційному періоді не було. Клітинна реакція була практично відсутня, що свідчило про високий ступінь спорідненості імплантатів перикарду свині з тканинами кроля. Через 3 місяці після трансплантації імплантат перикарда

визначався як ділянка пухкої неоформленої сполучної тканини, в якій складчастість вже сформована і на неї з двох сторін починає наростати вузьким пластом перехідний епітелій. Через 4 місяці після трансплантації відбувалася повна епітелізація імплантату. На Фіг. 20 (забарвлення за Ван-Гізеном, х400) показано, як зі сторони нативної тканини на поверхню імплантату йде проростання міоцитів - вони розташовуються ланцюжками або зовсім невеликими пластами, при цьому, м'язова оболонка тільки починає формуватися. Через 7 місяців після трансплантації в нижніх шарах новоствореної стінки формується майже безперервний м'язовий пласт і практично закінчується васкуляризація імплантату. На Фіг. 21 (забарвлення за Ван-Гізеном, х400) видно сформовану ділянку стінки сечового міхура кроля (в верхніх шарах багато мігруючих міоцитів), і знизу підсаджений імплантат (стрілка), який зберігає свою структурну цілісність і містить функціонуючі судини. На Фіг. 22 (забарвлення за ГЕ, х200) видно, що ніяких реактивних явищ збоку тканин реципієнта через 1,2 року після трансплантації не виявлено. Показана межа між нативною (праворуч) і відновленою (зліва) стінками сечового міхура кроля. Сам протез масивний, пророслий функціонуючими судинами. Результати дослідження свідчать, що протягом тривалого (2-3 роки) строку функціонування в умовах дії агресивного середовища, імплантат є досить інертний, не викликає в оточуючих тканинах реакцій відторгнення та біологічно оптимальний для доброї васкуляризації. Ніяких ознак біодеградації не виявлено, відбувається крайовий лізис імплантату. Епітелій вже відновлено, має типову будову. Формування м'язового шару ще не закінчується і він не є таким же потужним, як нормальна м'язова оболонка сечового міхура. На Фіг. 23 (забарвлення за ГЕ, х200) показано ділянку сформованої стінки сечового міхура кроля через 3 роки після трансплантації. Трансплантат масивний, покритий перехідним епітелієм та добре васкуляризований.

Результати ксенотрансплантації показали, що на всіх строках імплантати перикарда зберігали свою структурну цілісність і служили каркасом для формування повноцінної стінки сечового міхура. Імплантати мали високий ступінь спорідненості з тканинами реципієнта: викликали мінімальну запальну реакцію, мали потенціал до клітинної репопуляції *in vivo*, що проявлявся в активній ендогенній регенерації, стимулювали утворення фіброзної тканини та забезпечували селективний ріст тканини в зоні заміщення дефекту. Імплантати добре інтегрувалися і відновлювали цілісність стінки та функціональні властивості реконструйованого сечового міхура. Імплантати перикарда зберігали високу стійкість до біодеградації, були здатні тривалий час існувати в організмі реципієнта і зазнавати експлуатаційні навантаження в умовах агресивного середовища.

Приклад 3

Сировиною для отримання тканинних імплантатів служили стулки аортального клапана 6-8-місячних безпородних свиней. Ксенотканина - стулки аортального клапана свині відсікали від фіброзного кільця клапана і піддавали обробці, як описано в Прикладі 1.

Морфологічну структуру тканинних імплантатів досліджували методом світлової та електронної мікроскопії [5].

Як видно на Фіг. 24 (забарвлення ГЕ, х400), після обробки в імплантатах стулок аортального клапана зберігалася основна структурна диференціація тканини, яка була схожою на морфоструктуру нативної тканини і показана на Фіг. 25 (забарвлення ГЕ, х400). На поздовжньому розрізі виявлялися фіброзний і шлуночковий шари з радіальною орієнтацією колагенових і еластичних волокон однакової товщини і наявністю незначних між пучкових проміжків, в спонгіозному шарі волокна сполучної тканини мали хаотичну спрямованість. Розвивалися важкі ушкодження клітин, що проявлялися некробіозом і некрозом фіброblastів та ендотеліальних клітин. У порівнянні з нативними волокнами стулок, які показані на Фіг. 25 (забарвлення за ГЕ, х400) видно, що після обробки фібрили були з менш вираженою звитістю і ритмічністю. Ультраструктурні зміни тканини характеризувалися вираженими деструктивними змінами клітинних елементів. Ендотеліальна вистілка стулок клапана цілком була відсутня. На Фіг. 26 показані сполучнотканинні клітини, які характеризуються гетерохроматизацією ядер і вакуолізацією органодів цитоплазми, локальною деструкцією цитолемі фіброblastів, утворенням великих поверхневих бульок, як поблизу до ядерної зони, так і в відростках клітин. Збереженість колагенових і еластичних волокон показано на Фіг. 27 - ультраструктура еластичних і колагенових волокон не зазнала істотних змін, проте між пучками спостерігалися електронно-світлі порожнини. На Фіг. 28 показано, що всередині колагенових пучків і колагеново-еластичних прошарків зберігаються білково-полісахаридні елементи з'єднання фібрил.

Морфологічні дослідження доводять, що в імплантатах стулок аортального клапана, отриманих заявленим способом, забезпечується повна деструкція клітинних елементів і збереження сполучнотканинної основи. Структурні матричні білки зберігають архітекtonіку, просторове розташування та взаємозв'язки, які забезпечують взаємозв'язок між фібрилами та всередині позаклітинного матриксу.

Для вивчення фізико-механічних властивостей імплантатів стулок клапана, отриманих заявленим способом, проводили одночасне розтягнення тканини в двох напрямках, з урахуванням анізотропії, на випробувальній деформаційній машині. Отримані деформаційні криві обробляли і розраховували основні фізико-механічні показники [7]. Результати випробувань наведені в Таблиці 4.

З Таблиці 4 видно, що модуль пружності E в поздовжньому напрямку навантаження стулок збільшувався в 2,5 рази в порівнянні з контролем і зберігався при радіальному напрямку; межа міцності λ , значуще (на 28 %) збільшувалася в поздовжньому напрямку; а запас деформаційної здібності 8 до рівномірного відносного подовження зберігався на рівні нативної тканини.

Таким чином, в імплантатах стулок клапана, отриманих заявленим способом, істотно зростає модуль пружності, що дозволяє імплантату зберігати високу стійкість до біодеградації в процесі функціонування і тривалий час існувати в організмі реципієнта. При цьому імплантат здатний до динамічних та пластичних напружень та до розтягування в поздовжньому та поперечному напрямках.

Приклад 4

Досліджували вплив режиму відігрівання на морфологічну структуру судин після заморожування в парах рідкого азоту. Судини свині обробляли до етапу відігрівання як в Прикладі 1. Далі частину контейнерів з судинами відігрівали як в прототипі - поміщали безпосередньо в водяну баню (37 °C) і відігрівали 30-45 хвилин, а іншу частину залишали при кімнатній температурі (20-23 °C) для спонтанного відігрівання протягом 90-110 хв. Морфологічну структуру судин досліджували методом світлової мікроскопії [5].

На Фіг. 29 (забарвлення за ГЕ x400) показано, що після відігрівання на водяній бані внутрішня еластична мембрана судин зберігала цілісність і не піддавалася деформації. Відзначалися поодинокі ділянки її розпушення, при цьому безперервність структури не порушувалася. В середній медії судин істотно порушувалася компактність сполучнотканинного пласту тканини - чітко візуалізувалася порозність і пористість структури. На Фіг. 30 (забарвлення за Ван-Гізоном, x400) показано, що пучки колагенових волокон розщеплювалися, утворюючи між собою пустоти різної величини, при цьому волокна втрачали односпрямовану орієнтацію. Середній шар судинної стінки (Фіг. 31, забарвлення за ГЕ, x200) характеризувались деформацією і розволокненням еластичних волокон та численними поздовжньо-орієнтованими мікророзривами м'язових волокон, що було пов'язано з термомеханічними напругами в тканині внаслідок кристалоутворення. На Фіг. 32 (забарвлення за ГЕ, x400) показано, що після спонтанного відігрівання інтима судин мала добре збережену внутрішню еластичну мембрану; структурні матричні білки (колагенові і еластичні фібрили) зберігали правильну поздовжню, паралельну один одному орієнтацію. Спостерігалися ділянки з утворенням просвітлених, оптично порожніх просторів невеликого розміру, які чергувалися з щільними, практично однорідними ділянками. На Фіг. 33 (забарвлення за Ван-Гізоном, x400) показано, що колагенові волокна, розташовані між еластичними мембранами і ГМК, не мали грубих структурних порушень і зберігали цілісність і безперервність. Зміни сполучнотканинної структури укладались в ущільнені та більш компактному розташуванні волокон. На Фіг. 34 (забарвлення за Ван-Гізоном-Вергоффом, x200) показано, що еластичний каркас судинної медії характеризувався чіткими гладкими контурами, проте з вираженим зниженням звивистості.

Результати демонструють, що після спонтанного відігрівання при кімнатній температурі морфологічна структура судинної стінки характеризується найменшими структурними ушкодженнями в середній оболонці судин у порівнянні зі змінами після відігрівання на водяній бані і більш схожа на нативну. Такий режим відігрівання дозволяє знизити ступінь пошкодження структурних матричних білків, зберегти щільність упаковки і взаємне розташування волокон в паралельному напрямку та уникнути утворення тріщин і великих порожнин в стромі тканини, що виникають після заморожування.

Приклад 5.

Вивчали якість судинних імплантатів, отриманих за прототипом, після протезування в черевну частину аорти кроля і оцінювали появу ознак і центрів дистрофічної кальцифікації в процесі ремоделювання та ризику ускладнення на різних строках після ксенопротезування. Грудні артерії свині піддавали обробці за прототипом. Контейнери з судинами вилучали з рідкого азоту, здійснювали відігрівання на водяній бані, відмивали стерильним фізіологічним розчином з додаванням антибіотиків, а потім імплантували в черевну аорту кролика як судинні протези для заміщення ділянки черевної аорти кролика. Морфологічну структуру імплантатів після трансплантації досліджували методом світлової мікроскопії [5].

Дослідження показало, що через 6-12 місяців після операції в судинних імплантатах на всьому протязі у внутрішній оболонці був сформований м'язово-еластичний шар з достатньою метаболічною і проліферативною активністю гладком'язових клітин і фіброblastів. Разом з тим, в окремих випадках виявлялися дистрофічні зміни стінки імплантату у вигляді осередкового або поширеного кальцинозу. На Фіг. 35 (забарвлення за ГЕ, x100) показано ділянку протеза аорти кролика через 10 місяців після протезування. У зоні анастомозу спостерігалися зерна кальцифікатів.

Мінерал відкладався на ранніх термінах у вигляді розсіяних зерен, оточених тканиною, а потім на пізніших термінах ці частинки перетворювалися в більш великі кальциновані тіла. На Фіг. 36 (забарвлення за ГЕ, x200) відображена маса кальциноза та розшарування стінки в центральному відділі протеза через 1,2 роки після імплантації. Відкладання на протезі були твердо мінералізовані. В іншому спостереженні через 6 міс. в центральному відділі стінки імплантату показані дистрофічні і деструктивні зміни, які носять більш поширений характер. Стінка імплантату була розширена подібно

аневризмі, відзначалися ділянки з порушенням цілісності внутрішньої еластичної мембрани і еластичних мембран медії, проникнення крові вглиб стінки та її розшарування. На Фіг. 37 (забарвлення за Вейгертом, Ван-Гізоном, x200) показано замісний фіброз на ділянці деструкції еластичних мембран медії центрального відділу імплантату через 6 міс. після трансплантації. На Фіг. 38 (забарвлення за Маллорі, x100) показана деструкція еластичних мембран і розшарування кров'ю стінки центрального відділу імплантату як ілюстрація структурної деградації імплантату. В одному спостереженні через 1 рік після імплантації в центральному відділі протеза фіброзний шар був розвинений нерівномірно, зустрічалися ділянки молодшої сполучної тканини з великим вмістом клітинних елементів, переважно фібробластів. Дрібні мікросудини (vasa vasorum) на значному протязі адвентиції не були сформовані. Такі зміни супроводжувалися субтотальною деструкцією внутрішньої еластичної мембрани і еластичних волокон медії та заміщенням їх фіброзною тканиною. Просвіт протеза був звужений за рахунок деформації його стінки, а також за рахунок частково організованих і свіжих тромботичних мас. Структурна деградація і мінералізація протеза через 1 рік після трансплантації показана на Фіг. 39 (забарвлення за ГЕ, x100), де видно зерна кальцифікатів і розшарування аневризми стінки імплантату. Вище ділянки стенозу просвіт протеза було розширено, а стінка з ділянкою руйнації інтими і медії була стоншена. На Фіг. 40 (забарвлення за ГЕ, x100) показано, що на решті периметра протеза, через проникнення крові вглиб стінки між медії та адвентиції, відбулося формування аневризми.

Результати дослідження демонструють, що тканинні імплантати, отримані за прототипом, здатні створювати передумови для утворення попередників кальцієвих відкладень, що в подальшому стимулює появу місць кристалізації та викликає ризик розвитку структурної деградації імплантатів в процесі ремоделювання.

Таблиця 1

Морфометричні показники імплантатів судини свині (n=30)

Спосіб отримання	Показники стінки судини			
	Товщина стінки, мкм	Периметр, мм	Rвн, мм	Rзов, мм
Нативні судини (контроль)	240,69±35,2	10,99±0,29	1,75±0,05	1,99±0,05
Заявлений	189,69±15,8*	10,53±0,36*	1,68±0,06*	1,87±0,05*
Прототип	177,6±15,9*#	10,48±0,13*	1,67±0,02*	1,85±0,02*

Примітка: * - статистично значущі відмінності відносно групи контролю; # - статистично значущі відмінності відносно групи порівняння ($p \leq 0.05$).

Таблиця 2

Фізико-механічні показники судинних імплантатів свині (n=30)

Спосіб отримання	Модуль міцності (λ), МПа	Модуль пружності (E), МПа	Запас деформаційної здібності (δ)
Нативні судини (контроль)	1,3±0,19	3,6±0,52	1,49±0,18
Заявлений	2,59±0,57*	5,24±1,09*#	1,67±0,18*#
За прототипом	5,01±0,4*	8,9±1,3*	1,42±0,12

Примітка: * - статистично значущі відмінності відносно групи контролю; # - статистично значущі відмінності відносно групи порівняння ($p \leq 0.05$).

Таблиця 3

Фізико-механічні показники імплантатів г перикарда свині (n=40)

Спосіб отримання	Напрямок навантаження	Модуль міцності (λ), МПа	Модуль пружності (E), МПа	Запас деформаційної здібності (δ)
Нативна тканина (контроль)	Поздовжній	35,19±1,8	67,25±6,1	1,76±0,04
	Поперечний	25,88±2,2	47,08±8,6	1,87±0,25
Заявлений	Поздовжній	29,85±2,94*	172,52±21,3*	1,27±0,02*

	Поперечний	15,49±0,7*	88,01±3,4*	1,25±0,01*
--	------------	------------	------------	------------

Примітка: * - відмінності статистично значущі відносно контролю, $p < 0,05$.

Таблиця 4

Фізико-механічні показники імплантату стулок клапана свині (n=40)

Спосіб отримання	Напрямок навантаження	Модуль міцності (λ), МПа	Модуль пружності (E), МПа	Запас деформаційної здібності (δ)
Нативна тканина (контроль)	Поздовжній	4,82±0,6	72,63±14,5	1,12±0,01
	Поперечний	1,63±0,3	20,26±9,13	1,15±0,03
Заявлений	Поздовжній	6,67±0,37*	111,96±18,54*	1,06±0,005
	Поперечний	1,98±0,16	17,46±2,5	1,15±0,02

Примітка: * - відмінності статистично значущі відносно контролю, $p < 0,05$.

Джерела інформації:

1. Патент РФ № 2542432, МПК A61L 27/36 A61L 2/025 A61L 2/16, публ. 20.02.2015. Способ изготовления пластины на основе модифицированной ксеногенной подслизистой оболочки тонкой кишки.

2. Патент РФ № 2384309, МПК A61F 2/24, A61L 27/3, публ. 30.03.2010. Способ предимплантационной обработки биопротезов.

3. Патент РФ № 2196424, МПК A01N 1/02, публ. 20.01.2003. Способ обработки биоматериалов для сердечно-сосудистой хирургии.

4. Патент України № 68379, МПК A61L 27/00, A01N1/02, публ. 26.03.2012. Спосіб підготовки ксеногенних артерій для судинного протезування (прототип).

5. Волкова О. В., Елецкий Ю. К. Основы гистологии с гистологической техникой. 2-е изд. - М.: Медицина, 1982.- С. 186-188; 203-205; 228-232; 239-245; 247-250; 257-258.

6. Lowe J. Method for the morphometric analysis of arterial structure J. Clin. Pathol, -1984. - Vol. 37, № 12. - P. 1413-1415.

7. Патент РФ № 2430746, МПК A61L 27/38, A61F2/24, публ. 10.10.2011. Биологический материал для протезов.



Fig. 1



Fig. 2

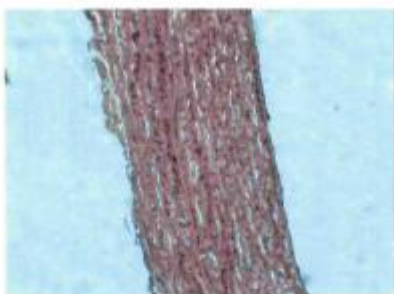


Fig. 3

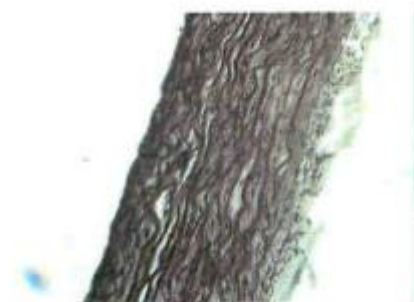


Fig. 4

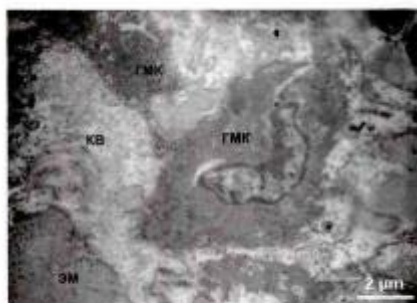


Fig. 5

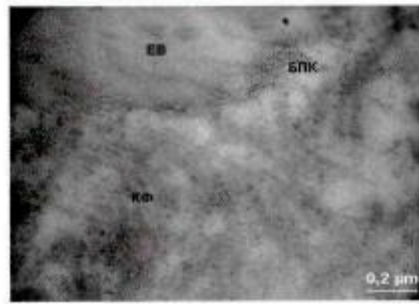


Fig. 6

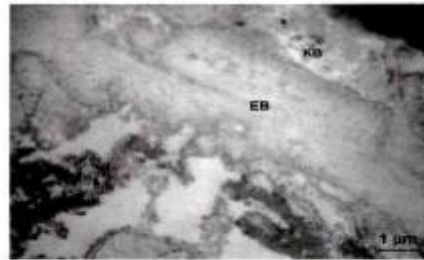


Fig. 7

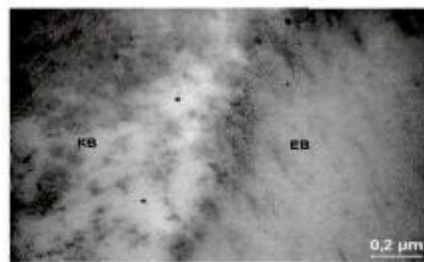


Fig. 8

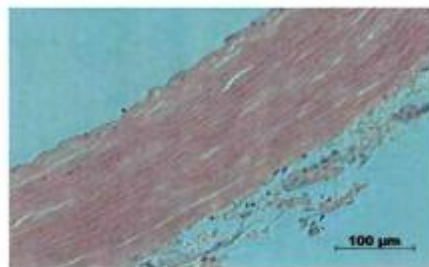


Fig. 9



Fig. 10

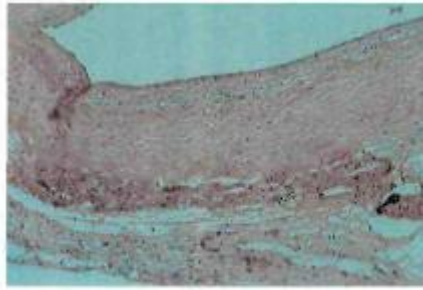


Fig. 11

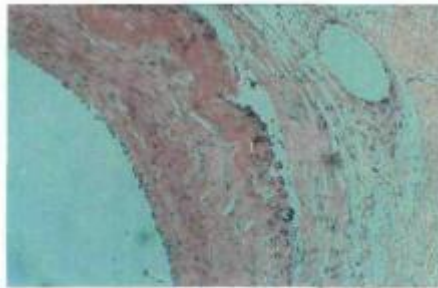


Fig. 12

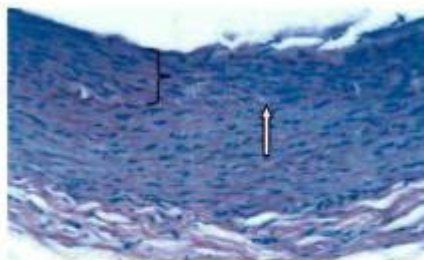


Fig. 13

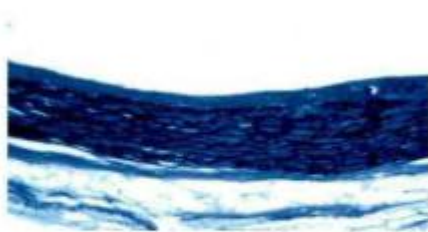
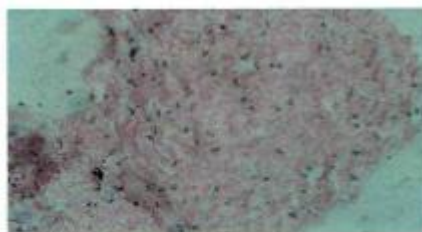
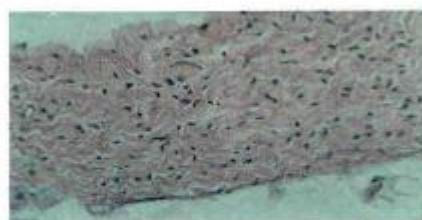


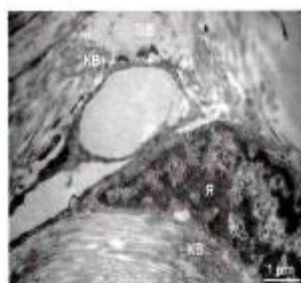
Fig. 14



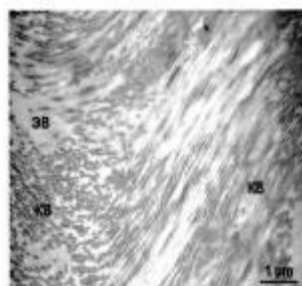
Φir. 15



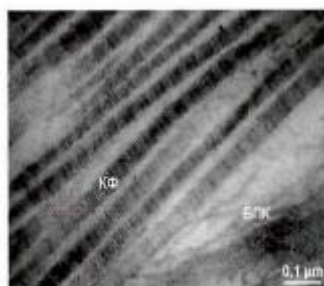
Φir. 16



Φir. 17



Φir. 18



Φir. 19

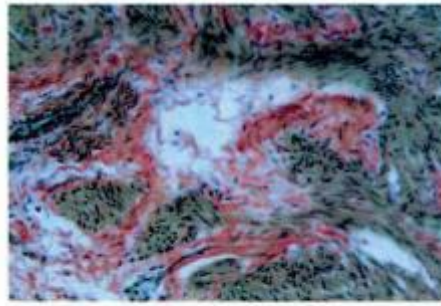


Fig. 20

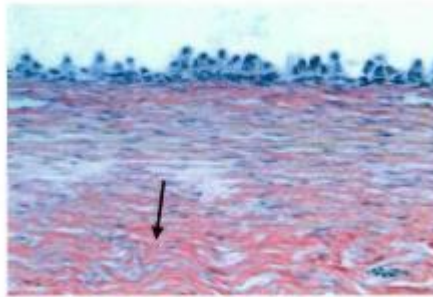


Fig. 21

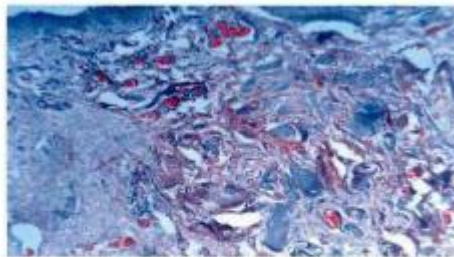


Fig. 22



Fig. 23

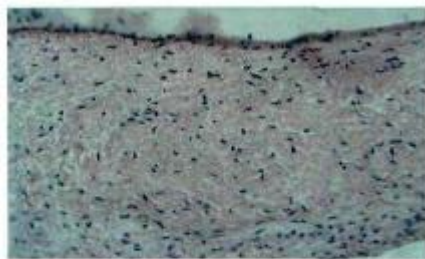


Fig. 24

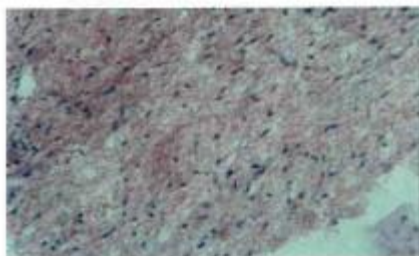


Fig. 25

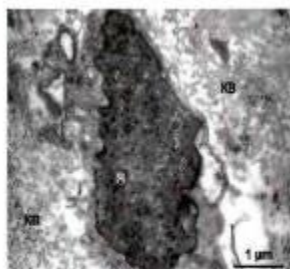


Fig. 26

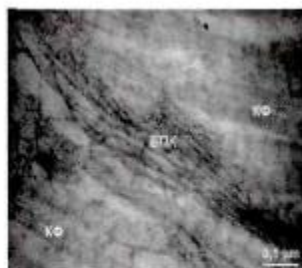


Fig. 27

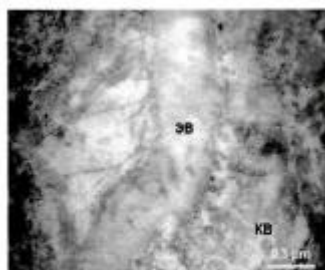


Fig. 28

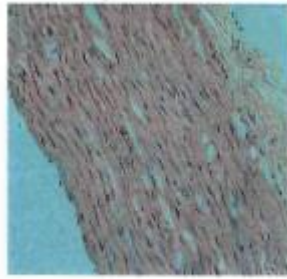


Fig. 29



Fig. 30

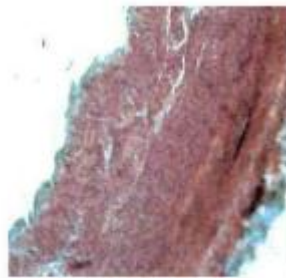


Fig. 31



Fig. 32



Fig. 33



Fig. 34

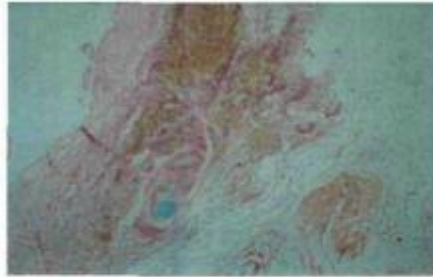


Fig. 35

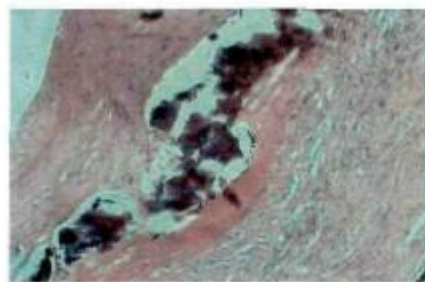


Fig. 36

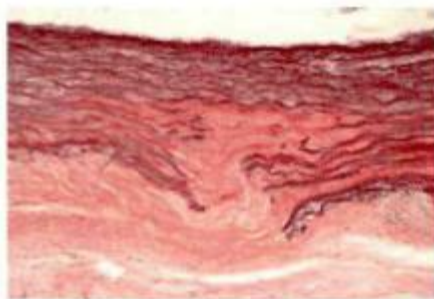


Fig. 37

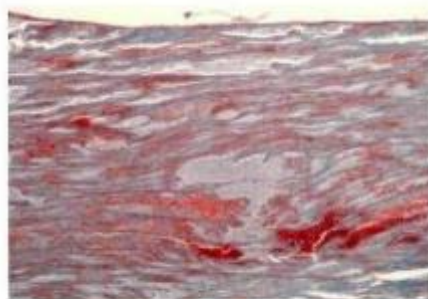


Fig. 38

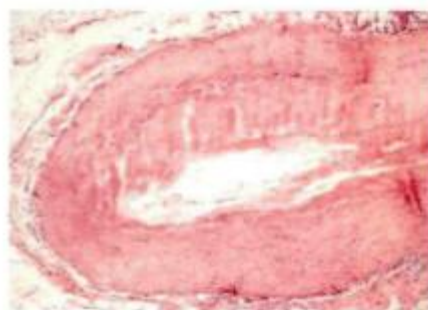


Fig. 39

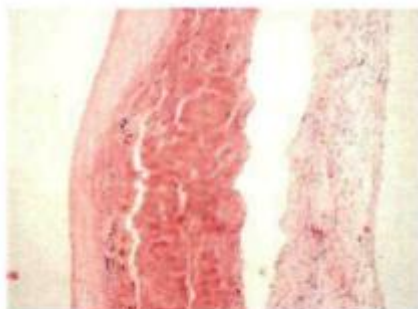


Fig. 40