

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

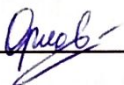
Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра «Общая биология и
биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
на тему
«СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ
МЕТОДОВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ И ИХ ВЛИЯНИЯ НА СВОЙСТВА
БИОМАТЕРИАЛА»

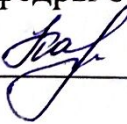
Студент  Орлова Ирина Витальевна

Научный руководитель  Венедиктов А.А.

Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Рецензент  Сорокина Л.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 04.06.18 № 13)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 25.06.18 № 7)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Биоматериалы.....	6
1.1.1 Применение биоматериалов в медицине.....	7
1.1.2 Виды биоматериалов.....	8
1.1.3 Общие требования, предъявляемые к биоматериалам.....	8
1.2 Классификация биоматериала по происхождению. Их преимущества и недостатки.....	10
1.2.1 Ксеноперикард.....	12
1.2.2 Подслизистая основа тонкой кишки.....	13
1.3 Децеллюляризация.....	17
1.4 Способы децеллюляризации.....	18
1.4.1 Физические факторы.....	19
1.4.2 Химические агенты.....	20
1.4.3 Биологические агенты.....	22
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	24
2.1 Получение внеклеточного коллагенового матрикса.....	24
2.2 Гистологический контроль обработки.....	27
2.3 Измерение физико-механических параметров.....	29
2.4 Исследование скорости резорбции in vitro.....	31
2.5 Методы статистической обработки данных.....	32
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Результаты получения внеклеточного коллагенового матрикса.....	33
3.2 Результаты гистологического контроля обработки.....	38
3.3 Результаты измерения физико-механических параметров материалов.....	41
3.4 Результаты исследования скорости резорбции материалов in vitro.....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	52
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	53

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	54
--------------------------------	-----------

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Болезни сердца и сосудов являются одной из основных причин смертности и инвалидизации населения. Поэтому особое внимание уделяется проблемам профилактики, диагностики на ранних стадиях и лечения данных заболеваний.

В настоящее время материалы природного и искусственного происхождения применяют при оперативном лечении различных заболеваний сердечно-сосудистой системы. Большое внимание уделяется ксеноматериалам, которые изготавливают из сырья животного происхождения [1].

Получаемые биоматериалы должны обладать высокой биосовместимостью с тканями реципиента, не должны приводить к развитию воспалительной реакции, отторгаться организмом, кальцифицироваться. В качестве источника для получения подобного материала выступают ткани ксеногенного происхождения, обработка которых проводится с целью удаления клеток и снижения видоспецифичности [27].

Известно, что децеллюляризация – это процесс, целью которого является разрушение клеточных структур с одновременным сохранением компонентов внеклеточного коллагенового матрикса (ВКМ) [40,81]. Выбор адекватного времени экспозиции, способа децеллюляризации ткани обусловлен ее анатомо-гистологическими особенностями. Неправильно подобранный режим обработки может вызвать разрушение структуры матрикса, что неизбежно приводит к потере биологических и физико-механических свойств материала.

Тканевые конструкторы могут вызывать усиление процессов ремоделирования тканей в зоне оперативного вмешательства за счет наличия в своем составе биологически активных компонентов, усиливающих миграцию, адгезию и пролиферацию клеток. Наличие разрушенных клеточных компонентов, остатков химических реагентов может приводить к

развитию воспалительной реакции и клеточной гибели, что будет свидетельствовать о низкой биосовместимости полученного материала [39,72].

Таким образом, становится ясно, что на конечные свойства биоматериала будут влиять такие параметры как сырье для его получения и способ обработки. Свойства материала определяют дальнейшие перспективы его использования. В связи с этим очень важным этапом разработки нового материала является выбор режима обработки биологического сырья. Ключевым моментом является оптимизация способа разрушения клеток и удаления их компонентов, при котором повреждение структуры матрикса сводится к минимуму [8].

Целью данной работы является оценка влияния различных способов децеллюляризации на свойства биоматериала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить внеклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи с применением разных способов удаления клеток.
2. Провести гистологический контроль для оценки эффективности обработок.
3. Изучить влияние способа удаления клеток на физико-механические свойства материалов.
4. Изучить влияние способа удаления клеток на скорость резорбции материалов *in vitro*.

Магистерская работа написана на 65 листах, содержит 13 рисунков, 6 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 108 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биоматериалы

В настоящее время широкое применение в реконструктивной медицине находят различные биоматериалы для замены или восстановления функций тканей и органов, пораженных в результате травм и патологических процессов [32]. Биоматериал представляет собой вещество или комбинацию синтетических или естественных по происхождению веществ, которые разрабатываются для взаимодействия с биологическими системами для диагностики или терапии заболеваний [102].

Медицинские имплантаты появились в 1960-х и 1970-х гг. Имплантатом называется искусственный материал или устройство, вставленное или вложенное хирургически в организм [29]. В процессе изготовления данных биоматериалов главной задачей являлось поддержание баланса между соответствующими физико-механическими свойствами и низкой токсичностью для организма [57]. Биоматериалы должны были обладать механической прочностью, низкой токсичностью и отсутствием канцерогенности, устойчивостью к коррозии в водной среде.

На их смену пришли биологически активные и биodeградируемые материалы: керамику, биоактивные стекла, стеклокерамику, композиты и полимеры [43,57]. В настоящее время проводятся разработки технологии создания биоматериалов, способны производить стимуляцию специфической ответной реакции клетки [62].

Особое внимание исследователей уделяется разработке искусственных тканей со схожей с естественными аналогами архитектоникой. На практике данную идею осуществляют путем использования различных биоматериалов, содержащих факторы роста и других биологически активные молекулы в качестве матриц для роста клеточных культур. Материалами для матриц могут служить резорбируемые полимеры природного или синтетического

происхождения, гидрогели, керамика, биоактивные стекла [57]. Для восстановления тканей полученный конструктор имплантируют в организм как единую структуру.

Разработка и изучение сферы применения новых биоматериалов является перспективным направлением развития медицины. [43].

1.1.1 Применение биоматериалов в медицине

На сегодняшний день в практической медицине активно применяются биоматериалы. Одной из ключевых сфер применения биоматериалов является ортопедия. Все чаще возникает необходимость замены мышц, суставов, сухожилий, а также лечения дефектов костной ткани [100]. Для создания ортопедических имплантатов используются различные полимеры, металлы и керамика [77,84]. В сердечно-сосудистой системе с помощью имплантатов на основе биodeградируемых природных и синтетических полимеров решаются проблемы связанные с клапанами сердца и реконструкцией сосудов [61]. Патологически измененные участки сосудов заменяют искусственными кровеносными сосудами [89,107] .

Биополимеры в офтальмологии находят применение при замене частей роговицы, при изготовлении глазных протезов, контактных линз, искусственных хрусталиков [36,98,106]. В стоматологии различные биоматериалы находят применение для восстановления или замены тканей зубов [75]. Для лечения ожогов, повреждений, травм используют шовный материал, искусственную кожу, ранозаживляющие покрытия [49,92,101]. Контролируемая адресная доставка лекарственных средств является одной из быстро растущих областей применения биоматериалов [47,71]. В отдельную группу выделяют барьерные биоматериалы, используемые при хирургических вмешательствах для предотвращения образования спаек [70,103].

1.1.2 Виды биоматериалов

В зависимости от отклика организма на имплантацию биоматериалы могут быть биотолерантными, биоинертными и биоактивными [16].

Отделение биотолерантных материалов (керамика, золото) от внутренней среды организма осуществляется за счет формирования фиброзного слоя [79,88].

Биоинертные материалы (металлокерамика из ванадия, оксида титана, алюминия, циркония) практически не взаимодействуют с прилежащими к имплантату тканями, не вызывая тем самым формирования фиброзной ткани. Наличие защитного слоя на поверхности биоинертных материалов предотвращает выход из имплантата и проникновение в него агрессивных молекул из окружающей среды [35,82].

В качестве биоактивных материалов используют: стекло, стеклокерамику, кальций-фосфатную керамику, биоактивные полимеры, композиты, биоактивные гели [104]. Механические свойства замещаемых тканей соответствуют биомеханическим свойствам данных биоматериалов.

1.1.3 Общие требования, предъявляемые к биоматериалам

Выбор сырья, применяемого для изготовления биоматериала, будет зависеть от дальнейшей области использования: кровеносные сосуды, костная ткань, мышечная ткань, кожные покровы, нервные волокна. Биоматериал должен соответствовать определенным требованиям, предъявляемым к его механическим, химическим и биологическим свойствам [30,52]. Механические свойства биологического материала должны соответствовать замещаемой ткани [105]. Биоматериал должен обладать высокой прочностью, для возможности осуществления хирургических манипуляций. К химическим свойствам относят:

контролируемое время деградации в организме [52], отсутствие химических реакций с межтканевыми жидкостями и тканями организма [96].

Биосовместимость материала с организмом является одним из главных требований, предъявляемых к биологическим свойствам [85]. Под биосовместимостью понимают способность материала к биоинтеграции без возникновения побочных симптомов и индукции клеточного или тканевого ответа, необходимого для достижения оптимального терапевтического эффекта [102]. По характеру взаимодействия имплантируемого материала с внутренней средой организма человека, выделяют следующие свойства биосовместимых материалов:

- 1) отсутствие локальной воспалительной реакции;
- 2) отсутствие аллергического и токсического действия на организм;
- 3) предотвращение проникновения инфекции в рану;
- 4) отсутствие канцерогенных свойств;
- 5) сохранение функциональных свойств во время срока эксплуатации [5].

В природе не существует абсолютной биосовместимости. Это свойство материала, применяемого при конкретных условиях, поскольку изменение свойств материала может привести к изменению реакции организма на материал [52]. Кроме того очень часто биоматериалы подвержены биодеградации, то есть способны к частичному или полному растворению в организме за счет метаболизации стандартными биохимическими путями, макрофагальной резорбции и замены вновь образованной тканью. Под биодеградацией подразумевают процесс разложения биоматериалов при контакте с клетками, живыми тканями и биологическими жидкостями.

Противоположным свойством биодеградации является биоустойчивость. Биоустойчивость – это процесс, который характеризуется способностью материала противостоять внутреннему воздействию среды в течение конкретного промежутка времени с сохранением биологических, механических и функциональных свойств [16]. От материала требуется либо

биоустойчивость, либо биodeградация в течение определенного периода времени в зависимости от назначения и места имплантации.

1.2 Классификация биоматериала по происхождению. Их преимущества и недостатки

В зависимости от вида сырья для получения различают 1) аутогенный (ткань, взятая от одного организма); 2) аллогенный (ткань, взятая от другого организма одного вида); 3) ксеногенный (ткань, взятая от организма другого вида); 4) синтетический.

Развитие производства синтетических материалов послужило толчком к появлению новых возможностей в пластической хирургии. Впервые синтетический материал был имплантирован человеку З.С. Мироновой (Москва). С 1961 г. лавсан использовался для восстановления связочного аппарата коленного сустава у 262 пациентов, у 91% пациентов были достигнуты хорошие и удовлетворительные результаты [74]. Повышение интереса хирургов к синтетическим материалам наблюдалось с середины 70-х годов. В этот период орган надзора США за веществами и наркотиками допустил использование таких материалов при определенных условиях (т.н. Salvage Cases). С 1973 г. в медицине начинает использоваться пропласт (Proplast®, Vitek-Incorp), а с 1975 г. – полифлекс (Polyflex®, Richards Manufacturing Comp.) [67]. Применение синтетических материалов не дало положительный клинический результат, поскольку основная часть реконструированных связок приводила к состоянию раздражения коленного сустава, подвергалась разрывам. Отмечена механическая дефектность синтетических материалов [60]. Особого успеха не наблюдалось при использовании в технике хирургического шва рассасывающихся синтетических материалов [66,86] из-за короткого периода полурассасывания и быстрой потери прочности [91,94].

В настоящее время большинство синтетических материалов пропадают с рынка медицинских изделий [6,7], используются для обеспечения в каркасной функций: армирование, защита шва и др. [10,11].

В 70-е годы XX были проведены эксперименты по аутотрансплантации, показавшие хорошие результаты [12,14].

Основными недостатками аутопластики являются дополнительная травматизация, увеличение длительности хирургической операции и времени послеоперационной реабилитации пациента.

В реконструктивной хирургии широко применение в пластических целях нашли алломатериалы. К преимуществам можно отнести отсутствие необходимости дополнительного травмирования пациента. В качестве материала использовали твердую мозговую оболочку, аллобрюшину, ткань мениска и другие [9]. Использование аллогенных тканей повышает риск заражения вирусными инфекциями, является недостаточно доступным, связано с трудностями забора и реализации.

Использование материалов ксеногенного происхождения позволило решить ряд проблем и является более перспективным по сравнению с другими биологическими материалами [6,33]. С каждым годом усиливается интерес к природным биополимерам, таким как коллагены, альгинаты, хитозан, желатин, фиброины шелка, полиэфиры бактериального происхождения – полигидроксibuтираты и их сополимеры. Биологические полимеры являются эффективными биостимуляторами с высокой степенью биосовместимости с организмом [25,26].

Промежуточные продукты биodeградации материалов являются нетоксичными метаболитами клеток или веществами, не метаболизируемыми клетками и тканями. При этом концентрация продуктов распада в крови не должна превышать предельно допустимый уровень. Продуктами полной деструкции биополимеров является углекислый газ и вода.

1.2.1 Ксеноперикард

Окружено сердце участком вторичной полости тела (целома), именуемом перикардиальной полостью (*cavitas pericardialis*) и заключенном между двумя листками околосердечной сумки, или перикарда (*pericardium*).

По форме перикард напоминает конус; основание этого конуса направлено книзу и сращено с сухожильным центром диафрагмы; верхушка же охватывает начальные участки отходящих от сердца вен и артерий. Слева и справа перикард срастается с плеврой; между ними проходят диафрагмальный нерв и перикардиодиафрагмальные сосуды.

В строении перикарда выделяют два слоя – наружный и внутренний. Наружный слой именуется фиброзным перикардом (*pericardium fibrosum*) и образован плотной волокнистой соединительной тканью с большим содержанием коллагеновых волокон; возле основания крупных сосудов, отходящих от сердца, фиброзный перикард переходит в наружную оболочку указанных сосудов [22]. Внутренний слой называется серозным перикардом (*pericardium serosum*) и представляет собой тонкую пластинку из плотной волокнистой соединительной ткани, богатой эластическими волокнами, которая со стороны перикардиальной полости выстлана плоскими эпителиальными клетками, лежащими на базальной мембране – мезотелием. В соответствии с положением в серозном перикарде выделяют два листка, или пластинки – париетальную (*lamina parietalis*), или наружную, соединенную с фиброзным перикардом; и висцеральную (*lamina visceralis*), или внутреннюю, окружающую сердце. Между этими двумя пластинками и располагается перикардиальная полость, заполненная некоторым количеством жидкости – эта жидкость смачивает поверхность серозного перикарда и обеспечивает скольжение его листов друг о друга во время сердечных сокращений во избежание трения [13].

КП применяют при укреплении связочного аппарата суставов и протезировании сухожилий. Возможно использование КП при следующих

операциях: укрепление мышц тазового дна, пластика мочевыводящих путей, гинекологические слинги, урослинги, закрытие культи почки [31].

Изделия из КП находят применение в хирургии сердца и сосудов для создания искусственных клапанов сердца, протезирования сосудов, для закрытия дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородок, для профилактики спаечных процессов в средостении, биопротезирования и пластики магистральных сосудов [28].

За рубежом изделия, изготавливаемые из КП, пользуются высоким спросом. В России же данное производство развито слабо. На сегодняшний день известно три крупных производителя КП: научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева (г. Москва), компания «НеоКор» (г. Кемерово) и компания «Кардиоплант» (г. Пенза). Представленные производители имеют разные технологии обработки и консервация биоматериала. Московские и кемеровские производители КП имеют узкую направленность, в основном их деятельность связана с развитием кардиохирургии. Компания «Кардиоплант» успешно вытесняет аналоги с рынка кардиохирургии, а также выпускает целую серию медицинских изделий из ксеноматериалов для тканевой регенерации в области травматологии, стоматологии, имплантологии, которые доказывают высокое качество и эффективность.

1.2.2 Подслизистая основа тонкой кишки

Подслизистая основа (*tela submucosa*) расположена между слизистым и мышечным слоями тонкой кишки. Подслизистая основа почти на всем протяжении тонкой кишки рыхлая, весьма подвижная. Она включает в себя концевые отделы кишечных желез, сосудистые сплетения, Мейснерово сплетение – нервное сплетение парасимпатических узлов, находящееся в подслизистом слое [4], а также в ней встречается скопление лимфатической ткани в виде фолликулов [18].

Субсерозная поверхность образована коллагеновыми и ретикулярными фибриллами, нитями эластина различного диаметра, в то время как субмукозная поверхность является более гладкой.

Толщина ПТК варьируется от 0,05 до 0,22 мм. Пористая структура материала способствует диффузии кислорода, которая необходима для поддержания жизнеспособности и пролиферации клеток. Коэффициент диффузии кислорода составляет $7 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$ [93].

Пространственная архитектура биоматериала определяется содержанием нерастворимых фибриллярных белков с высокой молекулярной массой: коллагены, эластин, ламинины, фибронектины. Они обеспечивают механические свойства ткани [39,46]. Основу составляют коллагены типа I, в меньшем количестве коллагены типов III, IV, VI и эластин. Коллагены типов I и III собираются в фибриллы (до 500 нм в диаметре), которые могут сливаться с образованием более крупных волокон коллагена. Размер и диаметр коллагеновых волокон регулируются протеогликанами [46].

Данный биоматериал получен путем химико-биологической обработки ткани ксеногенного происхождения, обладает прекрасной биосовместимостью, высокой скоростью биоинтеграции и способностью замещаться на собственные здоровые ткани без образования рубцов, а также механической прочностью. Установлена хорошая адгезия и высокий уровень роста клеточных культур на нем.

ПТК находит все большее применение в таких областях медицины, как кардиохирургия, нейрохирургия, герниопластика и многие другие.

В герниопластике используют протез матрикса паховой грыжи Surgisis, который представляет собой бесклеточный, стерильный биоматериал, полученный из тонкой кишки свиньи. Он является внеклеточным матриксом и состоит из четырех слоев ПТК [64]. Эта комплексная матрица выполняет функцию естественной подложки для ремоделирования ткани хозяина, до

того момента пока она не будет полностью замещена зрелой, вновь образованной тканью [37].

Такая биологическая подложка имеет ряд преимуществ по сравнению с искусственной: полная всасываемость и хорошая тканевая совместимость. Кроме того, ПТК выступает в качестве биологической подложки для реконструкции и роста клеток [97]. Современные исследования показали, что ПТК может быть применена для лечения паховой грыжи с хорошими послеоперационными результатами [69].

В нейрохирургии применение ПТК было обнаружено в двух случаях. Во-первых, это регенерация периферических нервов [95], а во-вторых, его применяют при деформации дурального мешка [41]. ПТК обладает рядом преимуществ: с ней легко работать, она недорогая, имеет минимальную степень иммунологичности и источник ее получения распространен [34]. Этот материал также имеет ряд стимулирующих факторов роста, и легко интегрируется в организм реципиента, оставляя за собой восстановленную нативную ткань [73]. Трансплантат на основе ПТК действует как естественный канал между проксимальными и дистальными нервами, обеспечивает благоприятные условия роста и не проявляет антигенности [38].

Биоматериал, на основе ПТК отличается простотой использования, безопасностью и эффективностью. Его эффективность по предотвращению утечки спинно-мозговой жидкости, ограничению частоты инфекций и менингита после имплантации, оценили и сравнили с литературными данными. Все эти показатели сопоставимы с нормой [55].

Во время клинической проверки данных, не было найдено рентгенологических или клинических признаков отрицательной реакции на данный биоматериал и не обнаружено ни одного случая, требующего его удаления [41]. Гистопатологический анализ показал, что трансплантат ассоциировался с клетками-хозяевами с образованием плотной соединительной ткани, с минимальным ожидаемым воспалительным

ответом. Все это указывает на отсутствие клинических и гистологических признаков сенсибилизации или отторжения трансплантата. Не смотря на то, что наличие образцов биопсии человека ограничено, показатели гистологии, полученные из проведенных исследований, подтверждают данные доклинической литературы о том, что хроническое воспаление и инкапсуляция отсутствуют, если используется биоматериал на основе подслизистой тонкой кишки [50].

Отсутствие побочных реакций на трансплантат, безопасность и клиническая эффективность – все это указывает на выгодность использования данного материала при деформации дурального мешка [41].

В настоящее время существуют несколько крупных компаний, производящих медицинские изделия внеклеточного коллагенового матрикса на основе ПТК: CorMatrix Cardiovascular, Cook Biotech, DePuy Synthes Joint Reconstruction [65].

Проводилось несколько исследований на животных, для того чтобы выяснить возможность использования подслизистой основы в лечении сердечных заболеваний [69]. Была протестирована эмульсионная форма ПТК на предмет ее эффективности при лечении инфаркта миокарда. Данную эмульсию вводили в пораженное инфарктом сердце животных. В результате чего наблюдали, что ангиогенез был значительно увеличен по сравнению с контрольной группой, в пораженное сердце которых вводили физиологический раствор. Эхокардиография показала улучшение фракции укорочения, фракции выброса и ударного объема [108].

Также подслизистая основа была рассмотрена в качестве каркаса в инженерии сердечной ткани. В одном из исследований, кардиальные клетки неонатальной крысы смешивали с гелевой формой ПТК и осаждали на полимерных подложках. Полученные тканевые конструкции показали значительно более высокие скорости сокращения и большую выраженность тропонина Т, по сравнению с контрольной группой [51]. Комбинация ПТК и стволовых клеток, также была исследована в лечении хронического инфаркта

миокарда. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга были высеяны на участки подслизистой, и эти трансплантаты имплантировали на эпикардальную поверхность миокарда кролика, пораженного инфарктом. Для сравнения также имплантировали одиночные участки подслизистой. В результате имплантации наблюдали, что сократительная функция и размер левого желудочка, плотность капиллярной зоны инфаркта миокарда и патологические изменения были значительно улучшены в обеих группах подслизистой, и с клетками, и без них. Но все же результаты с клетками были несколько лучше [99].

Все эти исследования на животных показывают, что подслизистая основа имеет большой потенциал для использования в лечении инфаркта миокарда, а также для доставки клеток с целью регенерации поврежденных участков сердца [69]. И, наконец, в клиническом исследовании пациентов, перенесших первичное изолированное аортокоронарное шунтирование, статистически значимое снижение скорости послеоперационной фибрилляции предсердий наблюдалось у лиц, которые подвергались реконструкции перикарда с использованием подслизистой основы [45].

На сегодняшний день в медицинской практике широко развито применение ксеноматериалов [3]. Поэтому к данному материалу предъявляются следующие требования, такие, как высокая степень биосовместимости с тканями и органами, низкие антигенные свойства. Биоматериал животного происхождения не должен вызывать реакций отторжения и воспаления.

Качество полученного конечного продукта зависит от обработки биоматериала. Обработка ксеноматериала включает в себя децеллюляризацию (удаление клеточных элементов), стабилизацию (улучшение механических характеристик) и стерилизацию образцов. Неполное удаление клеточных элементов или недостаточная стерилизация образцов, приводит к отторжению материала и серьезным осложнениям для самого пациента.

1.3 Децеллюляризация

Соединительная ткань состоит из волокон и межклеточного вещества, образованного деятельностью клеток. Строение и компонентный состав разных типов соединительной ткани уникальный, во многом определяют ее функциональные свойства [42]. Считается, что внутриклеточные и мембранные компоненты являются антигенами, инициирующими иммунное отторжение при трансплантации. Поэтому под децеллюляризацией понимают метод удаления клеточных элементов с сохранением компонентов матрикса без каких-либо потерь, разрушений или повреждений. Однако это является маловозможным, так как использование любой обработки материала приводит к разрушению клеток и изменению структуры ВКМ.

Существуют несколько критериев эффективности децеллюляризации тканей.

1. отсутствие клеточных элементов при окрашивании гематоксилином и эозином, флуорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI;
 2. количественное содержание ДНК менее 50 нг/мг в сухой ткани;
 3. содержание фрагментов ДНК размером не более 200 п.н. [68].
- Данные критерии используют количество ДНК для определения концентрации других мембранных или внутриклеточных молекул [56].

Изготовленный ацеллюлярный матрикс может формировать участок соответствующей ткани в зоне оперативного вмешательства и способствовать конструктивному ремоделированию ткани взамен рубцовой ткани [39]. После имплантации матриксы быстро резорбируются, а продукты, выделяющиеся при деградации, являются биологически активными.

1.4 Способы децеллюляризации

Децеллюляризацию можно проводить физическими (ультразвуковая обработка, механическое воздействие, замораживание с последующим

оттаиванием) и химическими способами (использование веществ для солюбилизации мембраны) [54].

После проведения децеллюляризации определяют остаточное содержание химических агентов. При задержке химических реагентов на поверхности они определяют ответные реакции организма после имплантации.

Таким образом, после децеллюляризации необходимо определить эффективность удаления клеток, воздействие детергентов на матричные белки. На сегодняшний день представлено очень мало исследований, в которых сравнивались бы несколько протоколов децеллюляризации. Определение влияния каждого реагента является весьма затруднительной задачей. Поэтому необходимо контролировать исследования для разных типов тканей с целью улучшения понимания процесса децеллюляризации [56].

1.4.1 Физические факторы

Одним из способов разрушения клеток в тканях является цикл особого температурного режима, который включает в себя поочередное замораживание и оттаивание ткани. Данный способ негативно влияет на структуру ткани, однако при этом не наблюдается потери белков [83].

Нетермическая необратимая электропорация (NTIRE) – это способ удаления клеток под воздействием электрических импульсов микросекундной продолжительности. В результате действия таких импульсов в клеточных мембранах появляются поры. В исследованиях на сонной артерии крысы и печени показано вымывание клеточных остатков в течение нескольких дней, постоянная перфузия органа улучшает результат, но не позволяет добиться равномерного эффекта [90].

1.4.2 Химические агенты

В качестве агентов для удаления клеток применяют вещества, вызывающие разрушение биологических молекул. Надуксусная кислота используется для удаления остатков нуклеиновых кислот без сильного влияния на компоненты матрикса. Уксусная кислота не влияет на сульфатированные гликозаминогликаны, но вызывает повреждение коллагена, что приводит к снижению прочности материала.

К основаниям, используемым для децеллюляризации относят гидроксид натрия, гидроксид кальция, и др. Щелочи, по сравнению с другими химическими агентами, способны полностью удалять с тканей факторы роста, при этом значительно снижаются механические свойства матрикса. Так, обработка гидроксидом натрия уменьшает прочность материала за счет разрушения коллагена и поперечных связей между волокнами [58].

Гипо- и гипертонические растворы вызывают диссоциацию комплексов ДНК-белок, разрушение клеток происходит за счет осмотического шока, в результате общее строение внеклеточного матрикса меняется незначительно. Часто, ткань поочередно промывают в гипо- и гипертонических растворах, тем самым увеличивая проявление осмотического эффекта. С помощью данного метода удаляют фрагменты клеток, которые остались после лизиса.

Применение ионных, неионных и цвиттерионных детергентов основано на солюбилизации мембраны и удаления ее компонентов. Однако детергенты повреждают белки внеклеточного матрикса и степень вымывания увеличивается по мере возрастания времени выдержки образцов в растворе. Комбинации детергентов вызывают более сильные повреждения структуры [87].

Наибольшую эффективность по удалению клеток показывает додецилсульфат натрия (SDS). Однако установлено его дестабилизирующее воздействие на компоненты матрикса. Согласно исследованиям Samouillan V.

et al., SDS оказывает влияние на тройные спирали коллагена и приводит к набуханию эластина. В некоторых работах изучалось изменение биофизических свойств клапанов после обработки SDS: увеличивалась растяжимость в тесте растяжение-сдавление, наблюдалась гибель клеток при попытке культивирования человеческих клеток эндотелия и миофибробластов на поверхности створок клапанов. По результатам многих исследований, при использовании SDS для производства бесклеточных матриц сосудов наблюдаются хорошие результаты по децеллюляризации с сохранением структуры материала [68].

Неионный детергент тритон X-100 (октилфенилполиоксиэтилен) используется в биохимических реакциях как вещество для солюбилизации мембран. Структура тритона X-100 имеет схожую структуру с IGEPAL CA630. Однако молекула тритона X-100 обладает более гидрофильными свойствами, чем IGEPAL CA630. Triton X-100 способен мягко солюбилизовать мембраны клеток без денатурации. Для децеллюляризации используется 0,5% или 1% раствор [48].

Многочисленные исследования были направлены на изучение влияния тритона X-100 на структуру и свойства матрикса. Полученные результаты были во многом противоречивы. Китайские коллеги сообщают, что при использовании данного детергента происходит полная децеллюляризация, однако механические свойства матрикса сильно изменяются по сравнению с необработанными клапанами и даже по сравнению с обработанными трипсином. Действие тритона X-100 приводит к обеднению губчатого слоя створок клапана, что вызывает биodeградацию клапана, повреждение складчатой структуры коллагена и повышение его пористости [48].

В экспериментах *in vivo* наблюдалось полное удаление клеточного дебриса, антигенов главного комплекса гистосовместимости. В результате было выявлено снижение иммуногенности обработанных данным детергентом тканей [87].

К цвиттерионным детергентам относят 3-[(3-холамидопропил)диметриламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS). Данный детергент используют для децеллюляризации тонких тканей, например, легочной; в отношении толстых тканей такой химический агент неэффективен.

Спирты используют для удаления воды из тканей и разрушения клеток. Глицерол используется для удаления фосфолипидов из клапанных кондуитов, которые способствуют усилению кальцификации протеза. Метанол, этанол и изопропанол более эффективны для удаления жиров. Время выдержки и концентрация раствора должно быть четко контролируемым, так как спирты могут приводить к осаждению белков, их фиксации и повреждению ультраструктуры ткани.

Растворители ацетон, трибутил фосфат повреждают структуру компонентов матрикса, вызывают фиксацию, что способствует увеличению механической прочности. Трибутил фосфат в отношении сухожилий представляется более эффективным, по сравнению с ионными и неионными детергентами [53].

1.4.3 Биологические агенты

Для удаления клеток используют протеолитические ферменты трипсин, нуклеазы, липазы, коллагеназы, диспазу, термолизин и α -галактозидазу. Очень важным является полная инактивация фермента и его удаление из материала, поскольку активные ферменты нарушают децеллюляризации.

Эндонуклеазы фрагментируют ДНК, что способствует ее удалению. Коллагеназы применяют редко и только в тех случаях, когда сохранение микроструктуры ткани и механических свойств не требуется. Липазы используют в составе с другими реагентами, так как самостоятельно они не способны удалить все жиры. Диспаза (нейтральная протеаза) эффективнее удаляет клеточные элементы из ткани, по сравнению с трипсином, но при этом наблюдается сильное разрушение матрикса [83].

Трипсин является наиболее распространенный агентом для обработки тканей. Данный фермент сильнее снижает механическую прочность ткани, чем децеллюляризация детергентами. Однако он значительно меньше влияет на гликозаминогликаны. Также трипсин используют для первичного разрушения ткани. В результате облегчается проникновение внутрь других децеллюляризирующих агентов, а это, в свою очередь, приводит к улучшению обработки. В качестве дополнения к детергентам при децеллюляризации сложных тканей большой толщины, например дермы, применяют трипсин и диспазу. Термолизин используют крайне редко, так как с его помощью удаляются клетки только с поверхности ткани. α -галактозидазу используют для децеллюляризации ксеноткани; данный агент отвечает за удаление эпитопа α -Gal [63].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Получение внеклеточного коллагенового матрикса

Процесс изготовления внеклеточного коллагенового матрикса включает в себя следующие стадии (табл.1):

Таблица 1 – Технологическая схема производства внеклеточного коллагенового матрикса

Этап процесса	Основная задача этапа
Механическая чистка	Предварительная очистка сырья ксеногенного происхождения
Удаление клеток	Этап необходим для повышения биосовместимости материала за счет снижения его видоспецифичности. Происходит разрушение и удаление клеток и их компонентов – основных факторов иммуногенности
Обработка сшивающим агентом	Придание готовому биоматериалу необходимых физико-механических и прочностных характеристик, а также создание конструкторов необходимой толщины
Лиофильная сушка	Консервация биоматериала

Второй этап позволяет получить биоматериал с низкой иммуногенностью за счет удаления клеток, что способствует снижению видоспецифичности материала. Поскольку децеллюляризация является сложным физико-биологическим процессом, осуществить её можно

несколькими способами, а именно применяя в качестве агентов для удаления клеточных элементов растворы щелочи, детергента, протеолитического фермента, солей.

В ходе проведения эксперимента были подготовлены образцы 4 групп, отличающиеся между собой способом удаления клеток из нативной ткани:

- I группа – ферментативная обработка;
- II группа – обработка гипертоническими растворами хлорида натрия;
- III группа – обработка додецилсульфатом натрия;
- IV группа – обработка раствором гидроксида натрия.

Ферментативная обработка заключается в выдерживании сырья в гипертонических растворах хлорида натрия с целью повреждения клеток, обработки раствором протеолитического фермента с целью дальнейшего разрушения клеточных элементов, повторном выдерживании в гипертонических растворах хлорида натрия с последующей отмывкой в гипотоническом растворе с целью наиболее полного удаления разрушенных клеток. Для подбора оптимального режима обработки проводили изучение влияния концентрации фермента, время выдержки в растворе фермента и температуры на эффективность удаления клеток. С целью инактивации воздействия протеолитического фермента на нативную ткань изменяли параметры, от которых напрямую зависит активность фермента, а именно температуру буферного раствора, уровень pH. После окончания необходимого времени выдержки образцы многократно промывали в проточной дистиллированной воде. Нейтрализацию оставшейся после промывания кислоты на биоматериале проводили в растворе гидрокарбоната натрия.

Обработка гипертоническими растворами хлорида натрия заключается в выдерживании обрабатываемого материала в гипертоническом растворе соли для его дегидратации с последующим погружением в гипотонический раствор для регидратации материала. Удаление клеток происходит за счет

осмотического шока, для полной децеллюляризации необходима многократная смена растворов. Для подбора оптимального режима обработки проводили изучение влияния кратности и времени выдерживания материала в растворах на эффективность удаления клеток.

Обработка додецилсульфатом натрия заключается в выдерживании обрабатываемого материала в растворе детергента с последующей отмывкой в проточной дистиллированной воде. Для подбора оптимального режима обработки проводили изучение влияния времени, температуры выдерживания материала в растворах и концентрации детергента на эффективность удаления клеток.

Обработка раствором гидроксида натрия заключается в выдерживании обрабатываемого материала в растворе щелочи с последующей нейтрализацией в растворе кислоты и отмывкой в проточной дистиллированной воде. Для подбора оптимального режима обработки проводили изучение влияния времени, температуры выдерживания материала в растворах и концентрации щелочи на эффективность удаления клеток.

Для оценки эффективности удаления клеток из нативной ткани образцы материала погружали в 4% раствор формалина. Для обнаружения клеток и определения целостности коллагеново-эластиновой структуры материала применяли стандартные гистологические техники окраски: окраска гематоксилин-эозином, окраска по Вейгерт- Ван-Гизону.

Обработка материала сшивающим агентом необходима для стабилизации ткани, улучшения физико-механических характеристик. При проведении обработок все образцы выдерживались в течение суток в 0,1 мМ растворе 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида.

Лиофилизация проводилась с помощью лиофильной сушики $VaCO_2$. В ходе процесса образцы замораживались при $-80^{\circ}C$ в течение 24 часов, сушка происходила в вакуумной камере при комнатной температуре в течение 12 часов.

2.2 Гистологический контроль обработки

Целью гистологического исследования является подтверждение отсутствия клеточных элементов и сохранности коллагеновых и эластиновых волокон в полученном материале.

Гистологическое исследование мягких соединительных тканей состоит из следующих этапов:

- Подготовка образцов для гистологического исследования.
- Проводка фрагментов по возрастающим концентрациям спиртов и пропитка парафином с последующим изготовлением парафиновых блоков.
- Изготовление парафиновых срезов.
- Окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином и по методу Вейгер-Ван-Гизона.
- Заключение окрашенных срезов под покровное стекло.
- Изучение срезов под микроскопом в проходящем свете.

После проведения химико-ферментативной обработки образец биоматериала помещали в 4% раствор нейтрального формалина не менее, чем на 24 ч, после чего помещали в емкость с подведенной к ней холодной водопроводной водой, не менее чем на 6 ч. После этого приступали к изготовлению парафиновых блоков. При этом извлеченные из воды фрагменты погружали в емкость с 50% раствором этилового спирта на 4-6 ч, далее в емкость с 60% раствором этилового спирта на 4-6 ч, далее в емкость с 70% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 80% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 90% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 96% раствором этилового спирта на 12-24 ч. После этого помещали образцы в хлороформ на 1,5 часа. После извлечения фрагментов из хлороформа помещали их в смесь хлороформа с парафином в термостат при температуре 37°C на 3-6 ч (соотношение 1:1). Далее пропитывали фрагменты на водяной бане парафином при температуре 57°C

на протяжении 1,5 ч. Залитые фрагменты приклеивали к деревянным колодкам.

Для изготовления парафиновых срезов парафиновый блок зажимали в держателе микротоме, устанавливали на микротом нож и выставляли толщину среза на 5-7 мкм. Полученный срез переносили при помощи колющих игл в чашку Петри с теплой водой (38 ± 2)°С, далее на предметное стекло, предварительно обработанное смесью белка куриного яйца с глицерином. Высушивали стекло в термостате при температуре (38 ± 2)°С.

Перед проведением окрашивания проводили депарафинизацию срезов в орто-ксилоле, после чего выдерживали в спиртах с нисходящими концентрациями и доводили до воды (две порции ксилола – 3-5 минут, 96° этанол – 3 минуты, 80° этанол – 3 минуты, 70° этанол – 3 минуты, дистиллированная вода – 5 минут) [17].

Окраска гематоксилин-эозином. Окрашивали срезы гематоксилином 7-10 минут, после чего промывали в дистиллированной воде 5 минут. Выдерживали в 1% растворе соляной кислоты на 70% этаноле до побурения срезов. Далее промывали дистиллированной водой, а затем слабым (0,5 %) раствором аммиака до посинения срезов. После этого окрашивали водным раствором эозина в течение 1 минуты. Далее образцы трехкратно промывали в дистиллированной воде для удаления избытка эозина, однократно в 70 % растворе этанола, двухкратно в 96% этаноле для удаления воды из срезов. Экспозиция в каждой порции спирта – 2 минуты. Для просветления дважды промывали срезы в смеси расплавленного фенола и ксилола в соотношении 1:4 в течение 1 минуты. Окончательное обезвоживание срезов проводили промыванием ксилолом в течение 2 минут [17].

Окраска по методу Вейгерт-Ван-Гизона. Наносили на срез 10 капель раствора йодной кислоты на 5 мин. Промывали срезы в дистиллированной воде, после чего помещали срезы в раствор Вейгерта и инкубировали 12 часов. После промывания в дистиллированной воде наносили на срез 10 капель дифференцирующего кислотного буфера на 10 минут, промывали

дистиллированной водой, наносили 10 капель железного гематоксилина Вейгерта 1 и добавляли 5 капель железного гематоксилина Вейгерта 2, оставляли на 10 минут. В течение 10 минут промывали образцы в проточной воде, далее наносили на срезы 10 капель пикрофуксина по Ван-Гизону, оставляли на 7 минут. Промывали срезы в дистиллированной воде. После погружали препараты в 70% раствор этилового спирта на 10 секунд, далее в 96% раствор этилового спирта на 2 мин. Далее препараты погружали в ксилол. После их извлечения помещали на предметное стекло, наносили на окрашенный срез 2 капли пихтового бальзама с последующим укрыванием его покровным стеклом.

Полученные гистологические стекла изучали с помощью микроскопа в проходящем свете [17].

2.3 Измерение физико-механических параметров

Одним из главных этапов оценки биологической безопасности и клинической эффективности изделия является изучение физико-механических характеристик материалов. Установление связи физико-механических характеристик материалов, используемых в клинической практике, с их биосовместимостью и клинической эффективностью является все еще развивающейся областью исследований.

Для получения более полной информации о структуре и свойствах биоматериала на основе ПТК необходимо исследование их физико-механические параметры. Основными параметрами в биомеханике являются относительное (процентное) удлинение, модуль упругости, максимальное напряжение до разрушения, максимальная нагрузка.

Когда к любому твёрдому телу прикладываются силы, происходит деформация объекта относительно своих исходных размеров. В это время внутри объекта возникают внутренние силы (напряжения). Полное удлинение зависит от исходной длины, а также от площади поперечного

сечения образца. Относительная деформация – это безразмерная величина, которая определяет отношение удлинения к исходной длине образца.

Модуль упругости – отношение напряжения к соответствующей относительной деформации ниже предела пропорциональности. Если испытание производится при растяжении или сжатии, отношение напряжение/ относительная деформация определяется как модуль Юнга.

Предел прочности σ – это максимальное напряжение, которое приводит к разрушению. Нагрузка, при которой происходит разрушение, называется максимальной нагрузкой (единицы МПа).

Изучение физико-механических характеристик образцов внеклеточного коллагенового матрикса проводилось на испытательной установке INSTRON-5944 BIO PULS. Биоматериал оценивали по трем параметрам: модуль упругости, максимальная нагрузка и напряжение при растяжении при максимальной нагрузке.

Измерения проводили на 20 образцах каждой группы, для этого вырезали полоски размером 5x30 мм, толщину определяли с помощью измерительной головки Mitutoyo Absolute с точностью до 0,01 мм не менее чем в 5 точках. Физико-механические свойства биоматериалов напрямую зависят от компонентного состава нативной ткани, используемой в качестве сырья для его получения, сохранности волокон, толщины образцов.

В эксперименте участвовали следующие группы образцов: внеклеточный коллагеновый матрикс толщиной 0,22-0,25 мм с разными видами обработок, в качестве группы сравнения – ксеноперикард (КП), являющийся одним из наиболее известных и широко используемых биоматериалов для регенерации мягких тканей. Толщина ксеноперикарда 0,3-0,4 мм.

При проведении измерений на испытательной установке INSTRON-5944 BIO PULS образцы закрепляли с помощью пневматических зажимов, погружали в физиологический раствор (рис.1). Расчет параметров производился автоматически.



Рисунок 1. Испытательная установка INSTRON-5944 BIO PULS

2.4 Исследование скорости резорбции in vitro

Исследование скорости резорбции материалов проводят при моделировании окислительной деструкции in vitro. В качестве модельных сред, рекомендуемых международными стандартами серии ИСО, выбраны:

- дистиллированная вода;
- фосфатный буфер (pH =7,4);
- реактив Фентона — раствор сильно разбавленной перекиси водорода (H_2O_2) и соли двухвалентного железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) в соотношении 100 мкМ Fe^{2+} на 1мМ H_2O_2 , моделирующий условия воспалительного процесса при контакте материала с кровью.

Из каждой группы материалов вырезали образцы, размером 2×2 см, взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г и помещали в модельные среды по 5 образцов из каждой группы. Далее образцы

инкубировали при температуре 37°C в течение 4 недель. Смена раствора производилась каждые 2 дня.

После извлечения из растворов модельных сред образцы высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу и взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г. Интенсивность деградации оценивали по потере массы образцов.

2.5 Методы статистической обработки данных

При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. А для обнаружения промахов использовался 3s-критерий. Сравнение значений каждой из подгрупп дисперсионного комплекса проводили по методике Ньюмена-Кейлса. Различия считались статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$ [20].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты получения внеклеточного коллагенового матрикса

В качестве сырья для получения внеклеточного коллагенового матрикса использовали подслизистую тонкой кишки свиньи. Забор осуществлялся у здоровых животных с ОАО «Черкизовский мясоперерабатывающий завод» в соответствии с требованиями международных стандартов серии ISO 9001 и ISO 22442, доставка в лабораторию (ООО «Кардиоплант») происходила в течение не более 3 часов в изотермических контейнерах («Campingaz» вертикальный 30 л.) в физиологической изотонической среде. После механической чистки и отмывки сырья проводилось удаление клеточных элементов из ткани.

В ходе выполнения работы осуществлялся подбор оптимального режима обработки, для этого изучалось влияние различных параметров обработки на эффективность удаления клеток и сохранность волокон.

При проведении ферментативной обработки исследовали влияние концентрации фермента, времени выдержки в растворе фермента и температуры на ее эффективность. Результаты исследования показали, что использование раствора протеолитического фермента менее 0,1 ПЕ не является эффективной для удаления клеток (в результате гистологического исследования обнаружено более 15 клеток в поле зрения), использование раствора протеолитического фермента более 10 ПЕ вызывает повреждение 35% коллагеновых волокон, что будет приводить к уменьшению упруго-прочностных характеристик биоматериала. Оптимальным для использования был выбран раствор фермента 10 ПЕ, применение которого приводит к удалению клеток без повреждения коллагеновых волокон. Анализ влияния времени и температуры обработки показал, что оптимальным является обработка в течение 40-45 минут при температуре 37°C. Увеличение времени экспозиции приводило к частичному разрушению коллагеновых волокон, а

уменьшение времени экспозиции, уменьшение или увеличение температуры обработки не позволяло добиться полного удаления клеток из ткани.

При проведении обработки гипертоническими растворами хлорида натрия исследовали влияние кратности смены растворов и времени выдерживания материала в растворах на эффективность обработки. Результаты исследования показали, что на эффективность обработки сильно влияет кратность смены гипертонического и гипотонического растворов. При однократной смене растворов в поле зрения было обнаружено более 25 клеток, многократная смена раствора приводила к полному удалению клеточных элементов без видимых повреждений коллагеновых волокон. Исследования показали, что оптимальное время выдерживания материалов в растворе должно быть не менее 15 минут, увеличение времени не приводит к повышению эффективности обработки, а уменьшение приводит к снижению эффективности.

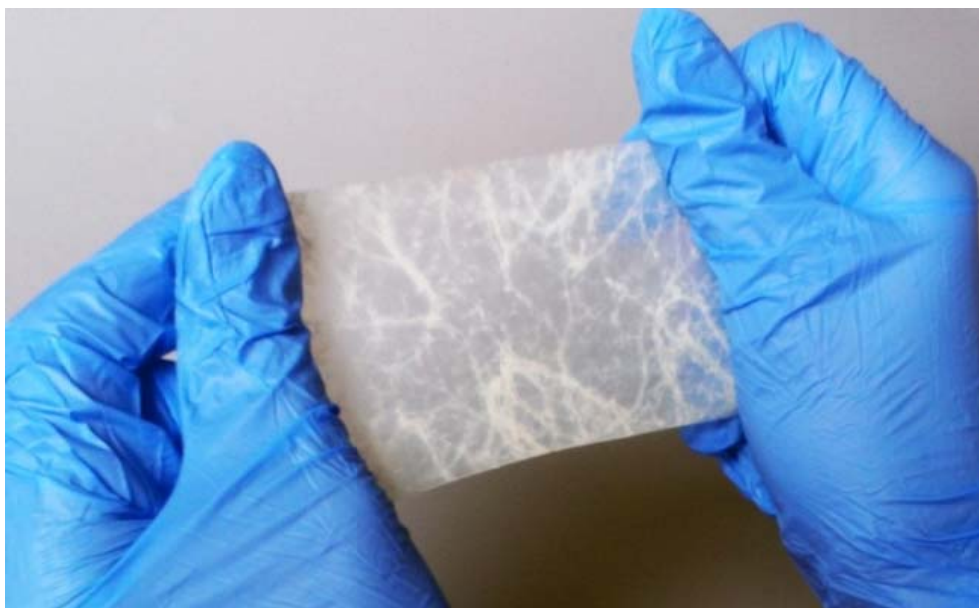
При проведении обработки раствором додецилсульфата натрия исследовали влияние времени выдерживания материала в растворе, температуры и концентрации детергента на эффективность обработки. Результаты исследования показали, что для эффективного удаления клеток достаточным будет использование 1% раствора детергента, повышение концентрации вызывает видимое повреждение коллагеновых волокон, а понижение приводит к снижению эффективности удаления клеток из материала. Оптимальное время обработки составило 1 час, увеличение времени выдержки в растворе приводит к повреждению коллагена, уменьшение сказывается на эффективности удаления клеток. Оптимальная температура обработки – 20°C, повышение температуры приводит к интенсификации воздействия детергента на ткань и вызывает более серьезное повреждение коллагеново-эластиновой структуры.

При проведении обработки раствором гидроксида натрия исследовали влияние времени выдерживания материала в растворе, температуры и концентрации щелочи на эффективность обработки. Результаты

исследования показали, что для эффективного удаления клеток достаточным будет использование 0,1M раствора гидроксида натрия, повышение концентрации вызывает видимое повреждение коллагеновых волокон, а понижение приводит к снижению эффективности удаления клеток из материала. Оптимальное время обработки составило 0,5 часа, увеличение времени выдержки в растворе приводит к повреждению коллагена, уменьшение сказывается на эффективности удаления клеток. Оптимальная температура обработки – 20°C, повышение температуры приводит к интенсификации воздействия раствора на ткань и вызывает более серьезное повреждение коллагеново-эластиновой структуры (рис. 2).



А



Б

Рисунок 2. Подслизистая тонкой кишки свиньи до (А) и после (Б) обработки

Подобранные режимы обработок обеспечивают сохранение целостности волокон нативной соединительной ткани, отвечающих за прочностные характеристики биоматериала и за счет удаления клеточных элементов способствует уменьшению выраженности воспалительной реакции, возникающей в ответ на имплантацию материала в организм реципиента. После обработки по удалению клеток материал представляет собой внеклеточный коллагеновый матрикс на основе ПТК, состоящей преимущественно из коллагенов I, IV типов и эластина [93]. Пространственная архитектура биоматериала определяется содержанием в составе ВКМ нерастворимых фибриллярных белков с высокой молекулярной массой (рис. 3): коллагены, эластин, ламинины, фибронектины. Они обеспечивают механические свойства ткани.

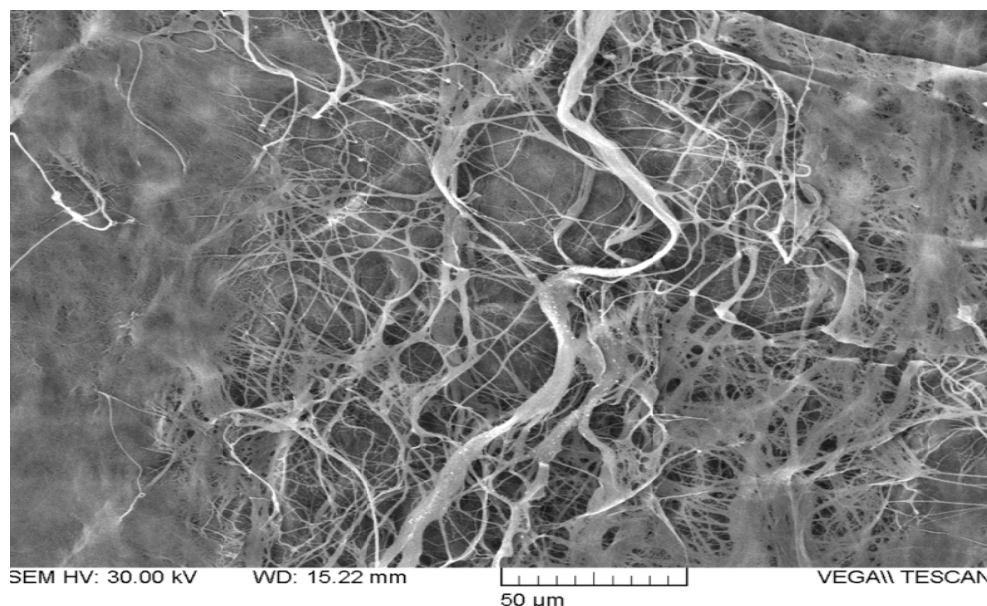


*Рисунок 3. Результаты сканирующей электронной микроскопии
внеклеточного коллагенового матрикса*

Основу составляют коллагены типа I, в меньшем количестве коллагены типов III, IV, VI и эластин. Коллагены типов I и III собираются в фибриллы (до 500 нм в диаметре), которые могут сливаться с образованием более крупных волокон коллагена. Размер и диаметр коллагеновых волокон регулируются протеогликанами.

После удаления клеток проводится стабилизация материала сшивающим агентом. За счет образования дополнительных сшивок между волокнами коллагена в тканях значительно снижается скорость биорезорбции биоткани, что делает её биосовместимой и нетромбогенной при сохранении анатомичной целостности, прочности и гибкости. В результате после удаления клеточных элементов, химической структурной стабилизации и лиофилизации получают биоматериал на основе биополимеров природного происхождения, представляющий собой однослойный или многослойный тканевый конструкт. Фото готового лиофилизированного материала внеклеточного коллагенового матрикса на основе ПТК представлено на рисунке 4.



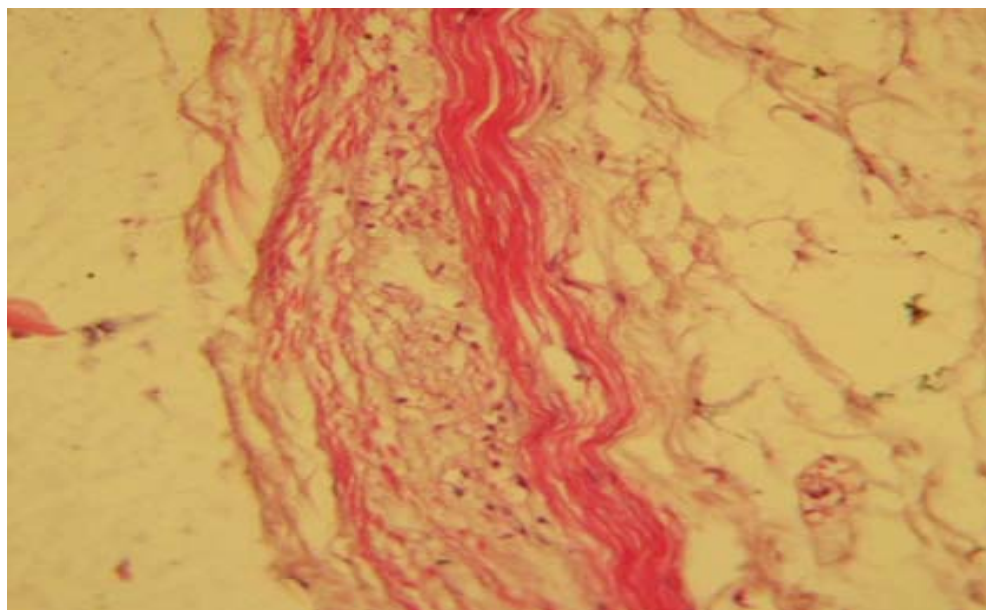
Рисунок 4. Внешний вид готового материала

3.2 Результаты гистологического контроля обработки

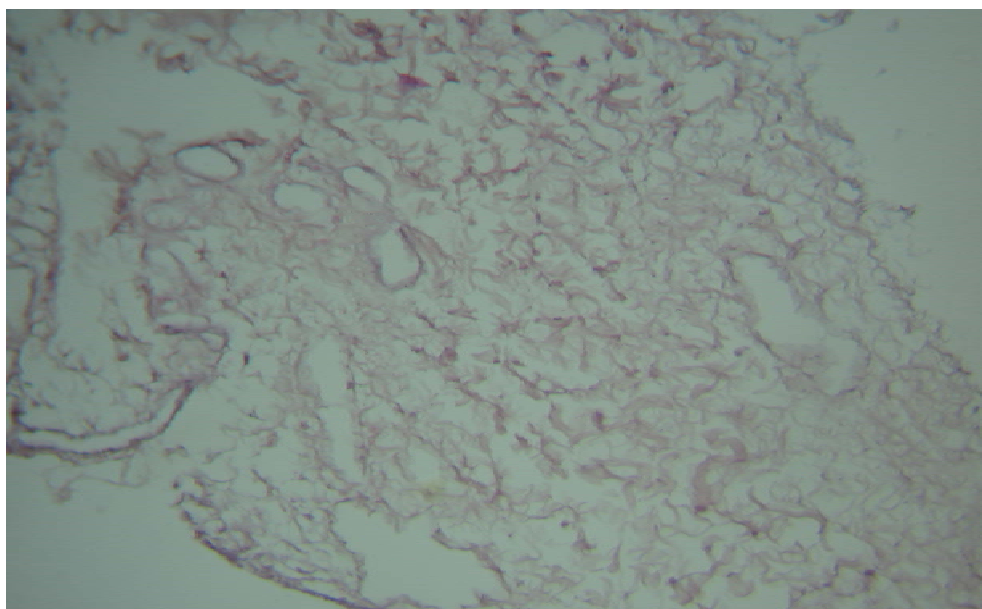
Целью гистологического исследования является подтверждение отсутствия клеточных элементов и сохранности коллагеновых и эластиновых волокон в полученном материале.

Для оценки эффективности химико-биологической обработки используют стандартные гистологические техники окрашивания препаратов гематоксилином-эозином (обнаружение клеточных элементов) и по методу Вейгерт-Ван-Гизона (определение сохранности волокон).

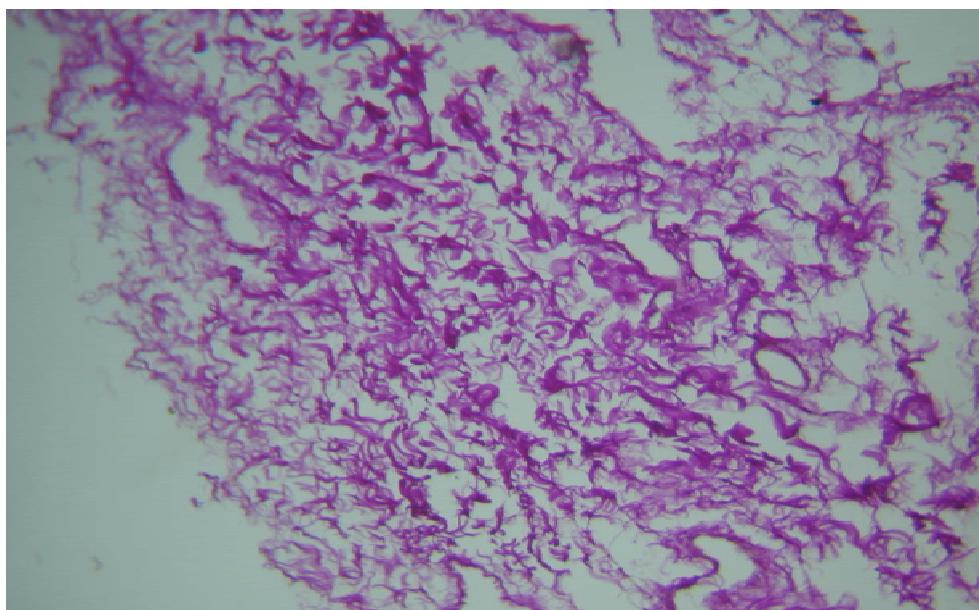
После прохождения второго этапа обработки ПТК децеллюляризируется, а коллагеново-эластическая структура ткани при этом остается сохранной (рис. 5).



А



Б



В

Рисунок 5. Результаты гистологического исследования внеклеточного коллагенового матрикса до (А) и после химико-биологической обработки: окраска гематоксилин-эозин, х200 (Б), окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, х200 (В)

Гистологическое исследование образцов показало, что все четыре протокола обработки ткани позволяют полностью удалить клеточные элементы из ткани и получить во всех случаях ацеллюлярный коллагено-эластический каркас с неповрежденной структурой (табл. 2).

Таблица 2 – Гистологический контроль I - IV обработок ПТК

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)			Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)			Состояние эластиновых волокон (поврежденные волокна, %)		
	0-5	6-15	>15	0-5	6-15	>15	0-5	6-15	>15
I обработка	0			0			0		

Продолжение таблицы 2

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)			Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)			Состояние эластиновых волокон (поврежденные волокна, %)		
	0-5	6-15	>15	0-5	6-15	>15	0-5	6-15	>15
II обработка	0			0			0		
III обработка	0			0			0		
IV обработка	0			0			0		

3.3 Результаты измерения физико-механических параметров материалов

Физико-механические свойства биоматериалов являются его важнейшими характеристиками и определяют область возможного применения. При исследовании физико-механических свойств ткани на основе подслизистой тонкой кишки свиньи определяют следующие основные параметры:

- ✓ максимальное напряжение/прочность на разрыв
- ✓ относительное удлинение
- ✓ модуль упругости (зависимость напряжение – относительное удлинение)

Результаты измерения модуля упругости материалов на основе ПТК представлены на рисунке 6.

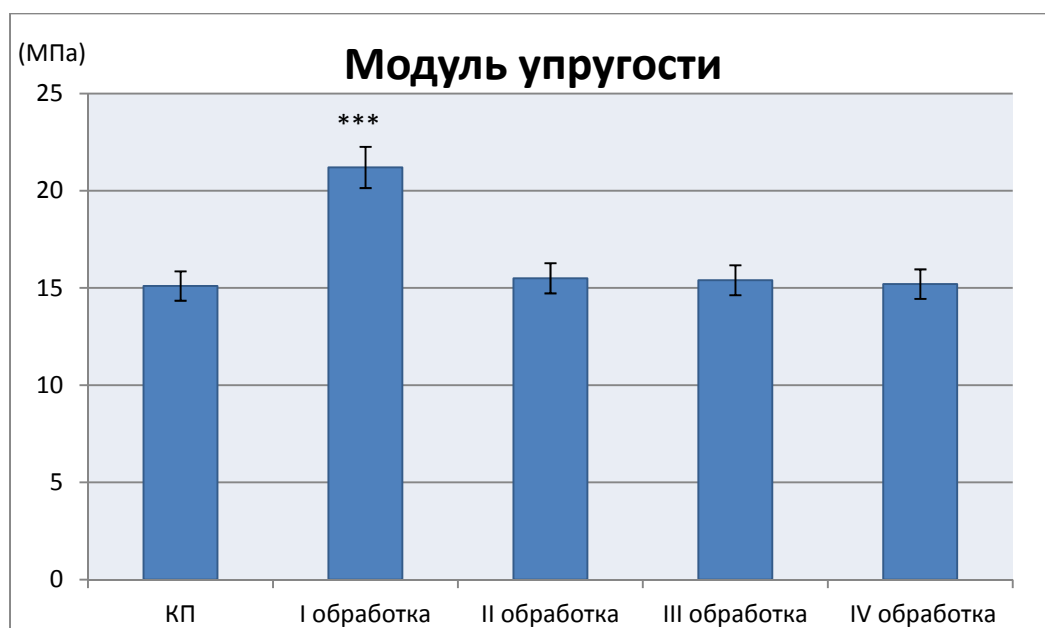


*Рисунок 6. Результаты сравнительного исследования модулей упругости (МПа, $M \pm m$, $n=20$). Здесь:*** $p < 0,001$ относительно ксеноперикарда*

Максимальное значение модуля упругости выявлено у образцов с I обработкой, что на 29% выше, чем у КП. Модули упругости образцов II, III и IV обработки относительно КП достоверно не отличаются.

Упругие характеристики биоматериала обусловлены состоянием коллагеновых и эластиновых волокон. По-видимому, I обработка вызывает наименьшее нарушение свойств фибриллярных белков, что сказывается на упруго-прочностных характеристиках материала. Вероятно, что II обработка, заключающаяся в попеременном выдерживании материала в гипертонических и гипотонических растворах, могла приводить к изменению нативной структуры фибриллярных белков за счет влияния на их гидратную оболочку при многократной дегидратации и регидратации ткани. В III обработке в качестве химического агента для удаления клеток использовали детергент додецилсульфат натрия, в IV обработке – раствор гидроксида натрия. По-видимому, химические реагенты могли приводить к изменению конформации и частичной денатурации фибриллярных белков, что могло привести к увеличению расстояния между волокнами структурных белков, что вызвало снижение упругих свойств биоткани.

Анализ результатов моделей упругости показал, что наиболее «мягким» способом удаления клеток, позволяющим максимально сохранить упругие свойства нативной ткани, является ферментативная обработка.

Напряжение при растяжении при максимальной нагрузке является параметром, отражающим максимальную механическую нагрузку, выдерживаемую биоматериалом до необратимого морфологического разрушения (рис.7).

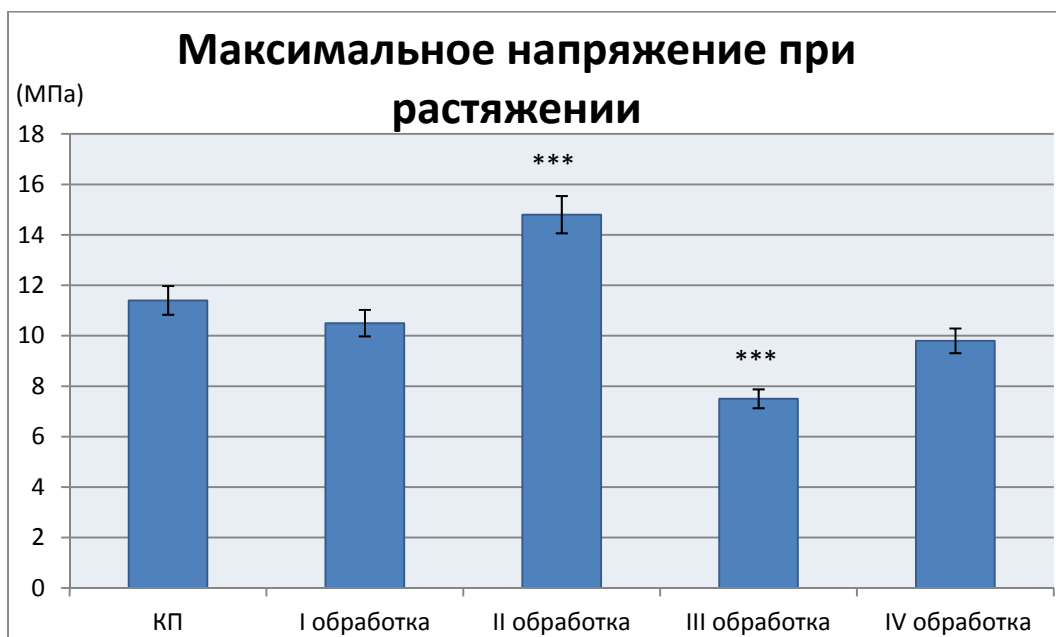


Рисунок 7. Результаты сравнительного исследования выдерживаемого напряжения при растяжении при максимальной нагрузке (МПа, $M \pm m$, $n=20$).

Здесь: *** $p < 0,001$ относительно ксеноперикарда

У образцов I и IV обработки значение напряжения при растяжении практически не отличается от аналогичных показателей КП. Образцы II обработки выдерживают наибольшее напряжение при растяжении: на 30 % больше по сравнению с КП. Уменьшение величины напряжения при растяжении отмечается у образцов с III обработкой: на 34% меньше по сравнению с КП. По-видимому, это связано с более глубоким изменением нативной структуры биоткани, сопряженной с утратой некоторого количества слабых и прочных молекулярных взаимодействий.

Результаты измерения максимальной нагрузки, выдерживаемой материалами на основе подслизистой тонкой кишки свиньи представлены на рисунке 8.

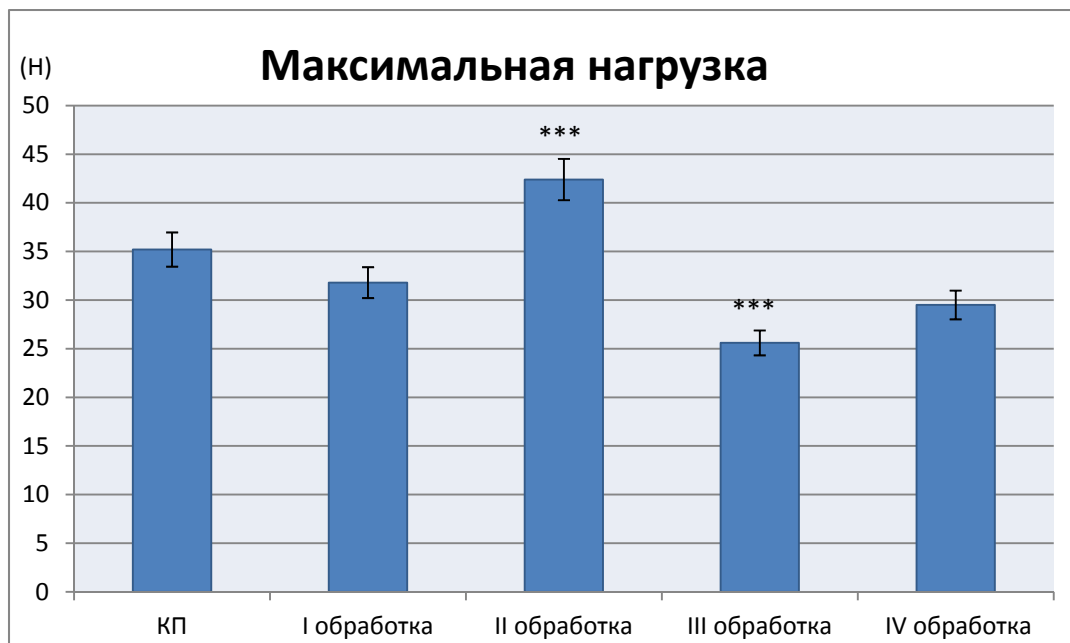


*Рисунок 8. Результаты сравнительного исследования выдерживаемой максимальной нагрузки (H , $M \pm t$, $n=20$). Здесь: *** $p < 0,001$ относительно ксеноперикарда*

Согласно полученным результатам, наибольшую максимальную нагрузку выдерживали образцы после II обработки: что на 17% больше относительно образцов с КП. Это говорит о высоком показателе прочности данных образцов. Наименьшую нагрузку показали образцы с III обработкой: на 27% меньше относительно образцов с КП. В случае I и IV обработок образцы достоверных отличий относительно показателя максимальной нагрузки КП не наблюдается. После изучения физико-механических свойств полученных биоматериалов было выявлено следующее: практически по всем свойствам значения параметров I и IV группы образцов сходны. Это говорит о сходстве в архитектонике матриц биоткани этих групп.

После II обработки был получен материал, который обладает относительно высоким модулем упругости, выдерживает более высокие

нагрузки и меньше деформируется. Это биоматериал с более прочной и менее растяжимой структурой.

Полученный после III обработки материал значительно уступает остальным материалам с позиции показателя максимального напряжения при разрушении при одноосном растяжении и слабо выдерживает сопоставимую с контролем максимальную нагрузку. Он представляет собой более рыхлую и менее зашитую организацию волокон структурных белков.

Полученные значения физико-механических параметров позволяют говорить о приемлемости свойств полученных материалов и их пригодности для нужд заместительной хирургии [47].

3.4 Результаты исследования скорости резорбции материалов *in vitro*

По скорости резорбции материалов в модельных средах можно судить о поведении материала в организме реципиента после имплантации. Высокий процент потери массы образца после инкубации в модельных растворах в течение одного месяца говорит о хорошей биodeградации материала. Полученные значения масс образцов ВКМ на основе ПТК до и после инкубации в различных модельных средах представлены в таблицах 3– 6.

Таблица 3 – Изменение массы образцов I обработки при инкубации в различных модельных средах ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г			
	до	Дистиллированная вода	Раствор фосфатного буфера	Реактив Фентона
1	0,0475	0,0444	0,0404	0,0255
2	0,048	0,0464	0,0395	0,0207
3	0,046	0,0445	0,0419	0,0267

Продолжение таблицы 3

№ образца	Масса образца, г			
	до	Дистиллированная вода	Раствор фосфатного буфера	Реактив Фентона
4	0,0494	0,0469	0,0413	0,0265
5	0,0476	0,0436	0,0403	0,0204
Сред.значение	0,0477	0,0452	0,0407	0,024

Таблица 4 – Изменение массы образцов II обработки при инкубации в различных модельных средах ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г			
	до	Дистиллированная вода	Раствор фосфатного буфера	Реактив Фентона
1	0,046	0,0457	0,0401	0,0314
2	0,0492	0,044	0,043	0,0306
3	0,0475	0,0441	0,0415	0,0292
4	0,049	0,0441	0,0412	0,028
5	0,0465	0,0446	0,0407	0,0316
Сред.значение	0,0476	0,0445	0,0413	0,0302

Таблица 5 – Изменение массы образцов III обработки при инкубации в различных модельных средах ($M \pm t$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г			
	до	Дистиллированная вода	Раствор фосфатного буфера	Реактив Фентона
1	0,0466	0,0455	0,0424	0,0179
2	0,0464	0,0453	0,0425	0,0172
3	0,0484	0,0448	0,0406	0,0182
4	0,0479	0,0453	0,0426	0,0194
5	0,0479	0,044	0,0437	0,0197
Сред.значение	0,0474	0,045	0,0424	0,0185

Таблица 6 – Изменение массы образцов IV обработки при инкубации в различных модельных средах ($M \pm t$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г			
	до	Дистиллированная вода	Раствор фосфатного буфера	Реактив Фентона
1	0,0472	0,0451	0,0423	0,0207
2	0,0495	0,0455	0,0403	0,0202
3	0,0454	0,0444	0,0439	0,02
4	0,0453	0,0447	0,0409	0,0219
5	0,0466	0,0443	0,043	0,0215
Сред.значение	0,0468	0,0448	0,0421	0,0209

Результаты исследования скорости деградации ВКМ после инкубации в течение 1 месяца в различных модельных средах, представлены на рисунках 9–12.

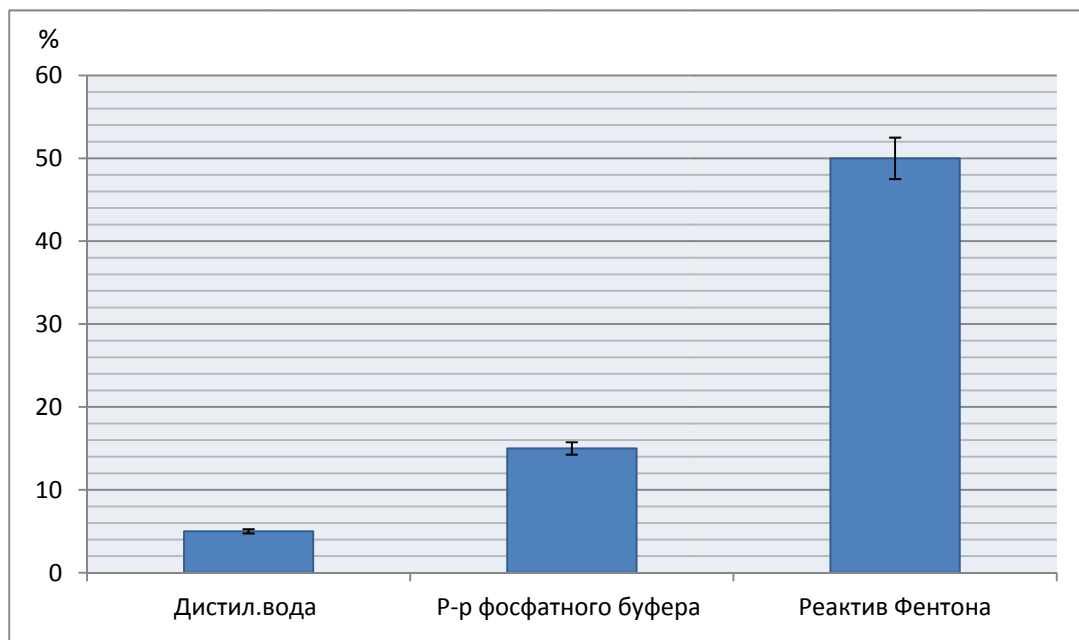


Рисунок 9. Потеря массы образцов I обработки при инкубации в различных модельных средах (% , $M \pm m$, $n=5$)

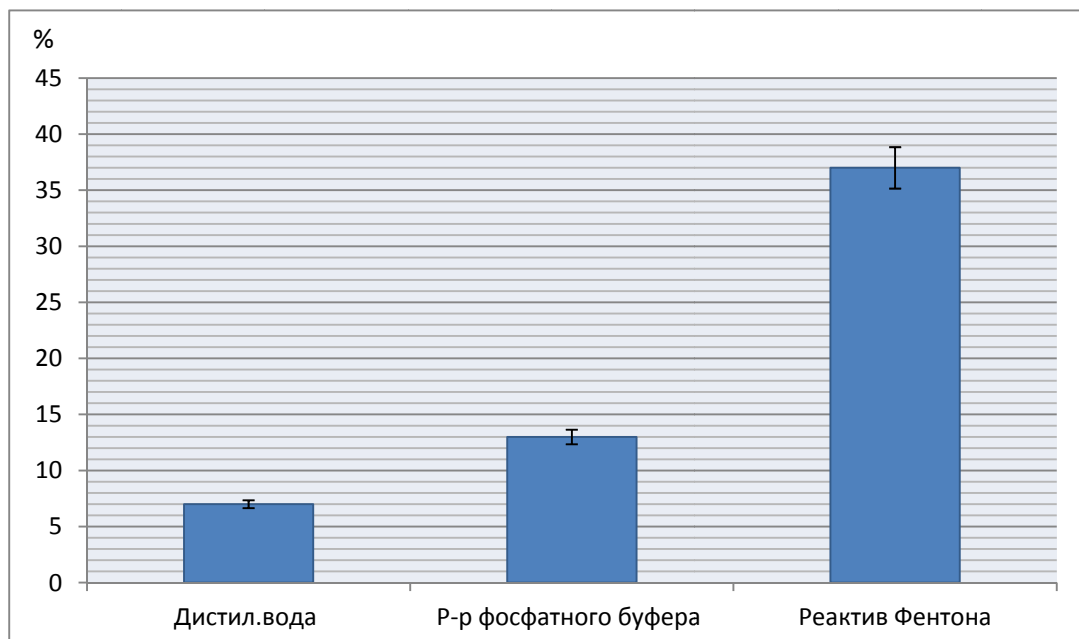


Рисунок 10. Потеря массы образцов II обработки при инкубации в различных модельных средах (% , $M \pm m$, $n=5$)

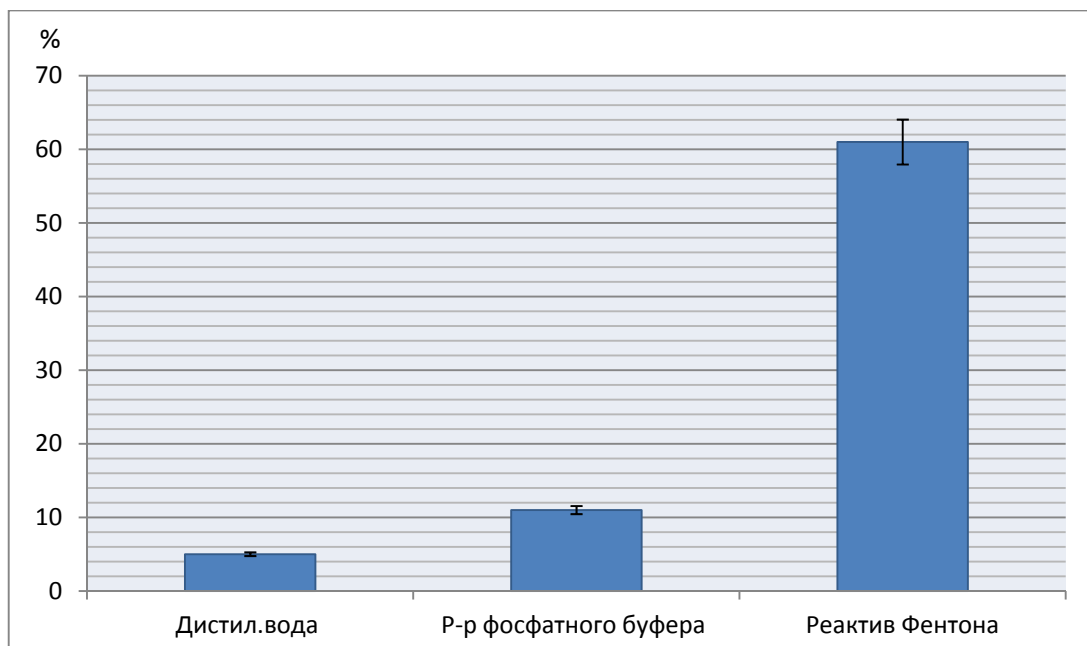


Рисунок 11. Потеря массы образцов III обработки при инкубации в различных модельных средах (% , $M \pm m$, $n=5$)

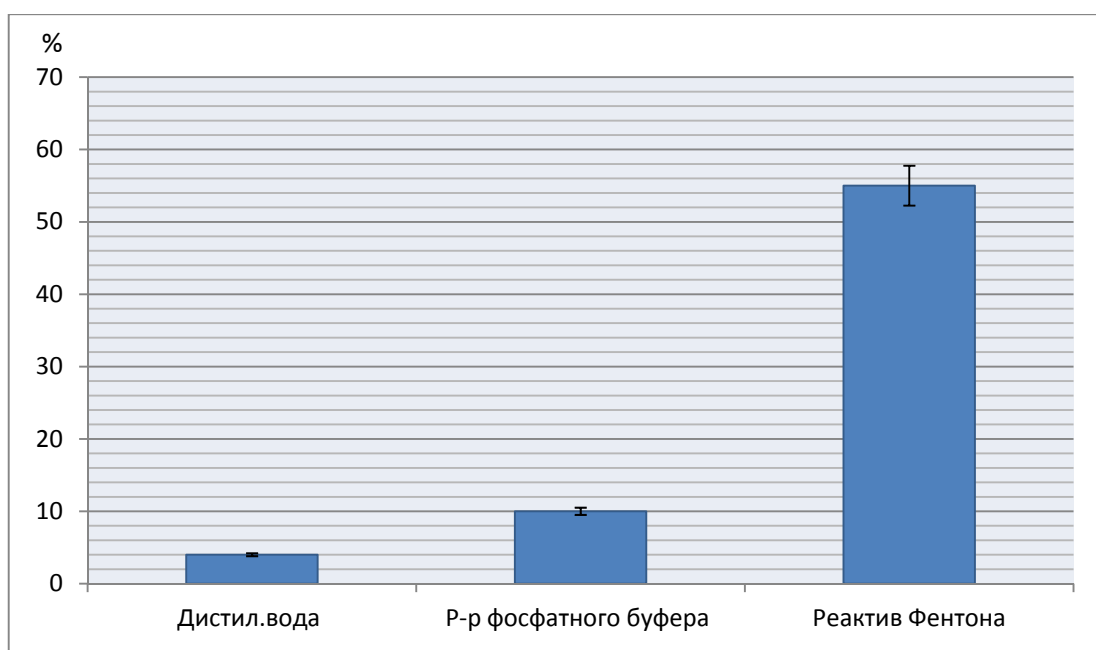


Рисунок 12. Потеря массы образцов IV обработки при инкубации в различных модельных средах (% , $M \pm m$, $n=5$)

При инкубации образцов материалов с I, II, III и IV обработкой в течение одного месяца в дистиллированной воде и фосфатном буфере

(pH=7,4) потеря массы образцов составила в среднем около 5% и 12% от первоначальных значений.

После имплантации материала в ткани животных, он может подвергнуться воздействию агрессивной окисляющей среды, которая формируется при развитии клеточного ответа, например, вызванного развитием реакции на инородное тело. Химия реакций клеточного ответа может описываться реакцией Фентона и сопровождаться внутриклеточным накоплением избытка ионов железа.

Под воздействием гидроксильных радикалов реактива Фентона образцы из разных экспериментальных групп обнаруживали высокую скорость резорбции, отличную от резорбции, наблюдаемой в образцах после инкубации в фосфатном буфере и дистиллированной воде (рис.13).

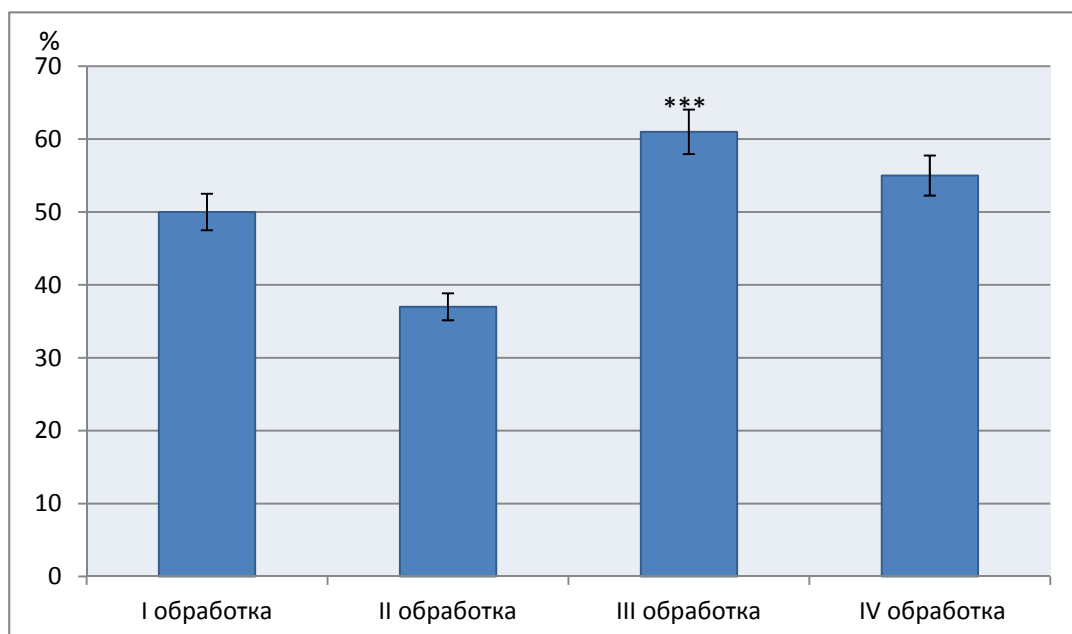


*Рисунок 13. Потеря массы образцов при инкубации в модельной среде – Реактив Фентона (% , $M \pm m$, $n=6$). Здесь: *** - $p < 0,001$ относительно I обработки*

Потеря массы III группы образцов при их инкубации в течение одного месяца в растворе Фентона была выше на 39%, чем у II группы. Самую

высокую скорость резорбции в реактиве Фентона показали образцы III, IV обработки.

Быстрая резорбция материала ВКМ на основе ПТК после инкубации в течение одного месяца в реактиве Фентона предполагает и быструю биорезорбцию материалов в условиях выраженного клеточного ответа или при развитии воспалительных процессов в организме человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования производилась сравнительная оценка методов децеллюляризации и их влияние на свойства биоматериала. Данные методы обеспечивает сохранение целостности волокон нативной соединительной ткани, отвечающих за прочностные характеристики биоматериала и за счет удаления клеточных элементов способствует уменьшению выраженности воспалительной реакции, возникающей в ответ на имплантацию материала в организм реципиента.

Децеллюляризованный биоматериал на основе ПТК обладает достаточными прочностными характеристиками для дальнейших испытаний *in vivo*.

Согласно полученным результатам можно сделать следующие **выводы:**

1. Установлено, что применение разработанных способов децеллюляризации позволяет эффективно удалить клетки и сохранить коллагеновые и эластиновые волокна биоматериала.

2. Выявлено, что образцы из разных экспериментальных групп претерпевали высокую скорость резорбции в модельной среде – реактив Фентона. Высокий процент потери массы образца после инкубации говорит о хорошей биodeградации материала.

3. Отмечено, что результаты проведенных исследований по изучению физико-механических характеристик материала на основе ПТК свидетельствуют о перспективности применения внеклеточного коллагенового матрикса в медицинских целях для регенерации мягких тканей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный коллагеновый матрикс

КП – ксеноперикард

ПТК – подслизистая тонкой кишки

SDC – дезоксихолат натрия

SDS – додецилсульфат натрия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арсентьев, П. А. Медицинские и биоматериалы / П. А. Арсентьев, Н. В. Комисаренко, Е. Ю. Макарычева. – М.: Издательство МЭИ, 2000. – 72 с.
2. Афанасьев, Д. С. Сравнительный анализ использования аутотрансплантата из связки надколенника и учетверенного сухожильного трансплантата *m. semitendinosus* и *m. gracilis* для пластики ПКС / Д. С. Афанасьев, А. В. Скорогляднов, С. С. Копенкин, А. Б. Бут-Гусаим, А. В. Зинченко, В. Ю. Розаев. – СПб.: Человек и его здоровье, 2009. – 104 с.
3. Бегун, П. И. Биохимическое моделирование объектов протезирования / П. И. Бегун. – СПб.: Политехника, 2011. – 464 с.
4. Билич, Г. Л. Анатомия человека / Г. Л. Билич, В. А. Крыжановский. – М.: Эксмо, 2012. – 224 с.
5. Васин, С. Л. Биосовместимость / С. Л. Васин. – М.: ИЦ ВНИИ геосистем., 2000, – 286 с.
6. Волова, Т. Г. Полиоксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая. – Красноярск: Группа компаний «Платина», 2006. – 288 с.
7. Григорюк, А. А. Морфологические исследования применения имплантатов с коротким сроком рассасывания для лечения вентральных грыж в эксперименте / А. А. Григорюк, Ю. А. Кравцов // Бюллетень экспер. биол. и мед. – 2005. – № 12. – С. 698-700.
8. Губарева, А. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс / А. Губарева, А. С. Сотниченко, И. В. Гилевич, П. Маккиарини // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – № 3. – С. 73-86.
9. Демичев, Н. П. Сухожильная гомопластика в реконструктивной хирургии / Н. П. Демичев. – Ростов на Дону: изд-во Рост. ун-та, 2000. – 102 с.

10. Дронов, А. Ф. Имплантаты с направленными действиями для реконструктивной хирургии сосудов (экспериментально-клиническое исследование): дисс. д-ра мед. наук. – М., 2000. – 53 с.
11. Егиев, В. Н. Сравнительная оценка степени фиксации фибробластов на синтетических эндопротезах, используемых для пластики дефектов передней брюшной стенки / В. Н. Егиев // Герниология. – 2006. – № 2. – С. 37-41.
12. Зотов, В. А. Пластика брюшной стенки сетчатыми элементами из никелида титана / В. А. Зотов // Биосовместимые материалы и имплантаты с памятью формы. – Томск: Нортхэмптон, 2001. – 227 с.
13. Иванов, А. С. Ксенопластика в реконструктивной хирургии сердца и сосудов. Результаты 20-летнего использования пластических материалов на основе ксеноперикарда / А. С. Иванов, В. А. Иванов, Г. М. Балоян, Е. П. Евсеев // Биопротезы в сердечно-сосудистой хирургии. – 2001. – № 17. – С. 41-43.
14. Иванов, С. В. Морфология тканей при использовании протезов из полипропилена и политетрафолена / С. В. Иванов, И. С. Иванов, А. А. Должников, А. А. Мартынец, А. В. Цуканов // Анналы хирургии. – 2009. – № 3. – С. 59-64.
15. Каплунов, О. Ф. К истории оперативного восстановления крестообразных связок коленного сустава / О. Ф. Каплунов // Травматология и ортопедия в России. – 2007. – № 1. – С. 74.
16. Карлов, А. В. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики / А. В. Карлов, В. П. Шахов. – Томск: СТТ, 2001. – 477 с.
17. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – Спб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
18. Краев, А. В. Анатомия человека / А. В. Краев, О. В. Резцов. – М.: Медкнига, 2007. – 496 с.

19. Краснопольский, В. И. Синтетические материалы в хирургии тазового дна / В. И. Краснопольский, А. А. Попов, С. Н. Буянова // Акуш. и гинекол. – 2003. – № 6. – С. 36-38.
20. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 2000. – 312 с.
21. Ланина, С. Я. Методологические и методические вопросы гигиены и токсикологии полимерных материалов и изделий медицинского назначения / С. Я. Ланина. – М., 2002. – С. 61-86.
22. Милованова, З. П. 11-летний опыт применения ксеноперикарда в хирургии сердца / З. П. Милованова, А. С. Иванов, Л. П. Черепенин // Хирургия тетрады Фалло. – М.: ИПО «Полигран», 2000. – 224 с.
23. Петрова, Н. В. Медико-биологические исследования дренажа для лечения тяжелых форм глаукомы / Н. В. Петрова, И. А. Довжик, В. И. Севастьянов, А. М. Бессметрный, В. П. Еричев, О. В. Робустова // Глаукома. – 2003. – №4. – С. 40-44.
24. Попков, А. В. Биосовместимые импланты в травматологии и ортопедии / А. В. Попков // Гений ортопедии. – 2014. – №3. – С. 34-45.
25. Севастьянов В. И. Биосовместимость / В. И. Севастьянов. – М.: ИЦ ВНИИ геосистем., 2000. – 366 с.
26. Севастьянов, В. И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия / В. И. Севастьянов // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – № 3. – С. 69-80.
27. Толстоухов, В. С. Разработка и экспериментальное исследование метода децеллюляции ксенотрансплантатов без применения ферментов / В. С. Толстоухов, Д. В. Никишин // Вестник Пензенского государственного университета. – 2016. – № 2 (14). – С. 67-73.
28. Фунг Зуй Хонг Шон. Отдаленные результаты имплантации ксеноперикардальных кондуитов при хирургической коррекции аневризмы восходящей аорты: дисс. канд. мед. наук. – М, 2012. – 23 с.

29. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джоунс. – М.: Техносфера, 2007. – 304 с.
30. Хлусов, И. А. Вопросы клеточных технологий и биоинженерии тканей / И. А. Хлусов // J. Sib. Fed. Univ. – 2008. – № 1. – С. 269-294.
31. Чеснов, Ю. М. Биосовместимость ксеноперикарда, фиксированного эпоксидными соединениями, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* / Ю. М. Чеснов // Актуальные вопросы кардиологии. – 2002. – № 2. – С. 188-190.
32. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения / М. И. Штильман. – М.: ИКЦ “Академ-книга, 2006. – 400 с.
33. Шумаков, В. И. Биополимерные матриксы для искусственных органов и тканей / В. И. Шумаков, В. И. Севастьянов // Здоровоохранение и медицинская техника. – 2003. – №4. – С. 30-33.
34. Allman, A. J. Xenogeneic extracellular matrix elicits a TH2-restricted immune response / A. J. Allman, T. B. McPherson, S. F. Badylak, L. C. Merrill, B. Kallakury, C. Sheehan, R. H. Raeder, D. W. Metzger // Transplantation. – 2001. – № 71. – P. 1631-1640.
35. Aminian, A. Enhanced cell adhesion on bioinert ceramics mediated by the osteogenic cell membrane enzyme alkaline phosphatase / A. Aminian // Mater. Sci. Eng. C. Elsevier B.V. – 2016. – № 69. – P. 184-194.
36. Anaya-Alaminos R. et al. Antimicrobial biomaterials and their potential application in ophthalmology // J. Appl. Biomater. Funct. Mater. – 2015. – № 4 (13). – P. 346-350.
37. Ansaloni, L. Hernia repair with porcine small-intestinal submucosa / L. Ansaloni, F. Catena, S. Gagliardi, F. Gazzotti, L. D'Alessandro, A. D. Pinna // Hernia. – 2007. – № 11 (4). – P. 321-326.
38. Archibald, S. J. Monkey median nerve repaired by nerve graft or collage nerve guide tube / S. J. Archibald, J. Shefner, C. Krarup, R. D. Madison // J Neurosci. – 2005. – № 15. – P. 4109-4123.

39. Badylak, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material / S.F. Badylak // *Biomaterials*. – 2007. – № 28. – P. 3587-3593.
40. Badylak, S. F. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds, *Annu / S. F. Badylak, D. Taylor, K. Uygun // Rev. Biomed.* – 2011. – № 13. – P. 27-53.
41. Bejjani, G. K. Safety and efficacy of the porcine small intestinal submucosa dural substitute: results of a prospective multicenter study and literature review / G. K. Bejjani, J. Zabramski, Durasis Study Group // *J Neurosurg.* – 2007. – № 106 (6). – P. 1028-1033.
42. Bernard, M. P. Structure of a cDNA for the pro alpha 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro alpha 2(I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene / M. P. Bernard, J. C. Myers, M. L. Chu // *Biochemistry.* – 2003. – № 22 (5). – P. 1139-1145.
43. Bhat, S. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare / S. Bhat, A. Kumar // *Landes Biosci.* – 2013. – № 3. – P. 1-12.
44. Booth, C. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold / C. Booth, S. A. Korossis, H. E. Wilcox, K. G. Watterson, J. N. Kearney, J. J. Fisher // *Heart Valve Dis.* – 2002. – № 11. – P. 457-462.
45. Boyd, W. D. Pericardial reconstruction using an extracellular matrix implant correlates with reduced risk of postoperative atrial fibrillation in coronary artery bypass surgery patients / W. D. Boyd, W. E. Johnson, P. K. Sultan, T. F. Deering, R. G. Matheny // *Heart Surg Forum.* – 2010. – № 13(5). – P. 311-316.
46. Brown, B. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix / B. Brown, K. Lindberg, J. Reing, D.B. Stolz, S.F. Badylak // *Tissue Eng.* – 2006. – № 3 (12). – P. 519-526.
47. Cardoso, M. J. Marine origin polysaccharides in drug delivery systems / M. J. Cardoso, R. R. Costa, J. F. Mano // *Mar. Drugs.* – 2016. – № 2 (14). – P. 1-27.

48. Cebotari, S. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: Toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells / S. Cebotari // *Artif. Organs.* – 2010. – № 3 (34). – P. 206-210.
49. Chaudhari, A. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review / A. Chaudhari // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – № 12 (17). – P.197-204.
50. Cobb, MA. Histology after dural grafting with small intestinal submucosa / MA. Cobb, SF. Badylak, W. Janas, FA. Boop // *Surg Neurol.* – 2006. – № 46. – P. 389-394.
51. Crapo, P. M. Small intestinal submucosa gel as a potential scaffolding material for cardiac tissue engineering / P. M. Crapo, Y. Wang // *Acta Biomater.* – 2010. – № 6 (6). – P. 2091-2096.
52. Davis, J. Handbook of Materials for Medical Devices / J. Davis // *ASM Int.* – 2003. – № 23. – P. 205-216.
53. Deeken, C.R. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate / C. R. Deeken // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2011. – № 2 (96). – P. 199-206.
54. Dong, J. The study of a new detergent (octyl-glucopyranoside) for decellularizing porcine pericardium as tissue engineering scaffold / J. Dong, Y. Li, X. Mo // *Journal of Surgical Research.* – 2013. – № 1 (183). – P. 56-67.
55. Franklin, M. E. 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 / M. E. Franklin, J. M. Treviño, G. Portillo, I. Vela, J. L. Glass, J. J. González // *Surg Endosc.* – 2008. – № 22 (9). – P. 1941-1946.
56. Gilbert, T. W. Strategies for tissue and organ decellularization / T. W. Gilbert // *Journal of cellular biochemistry.* – 2012. – № 7. – P. 2217-2222.

57. Gilbert Triplett, R. New Frontiers in Biomaterials / R. Gilbert Triplett, O. Budinskaya // Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am. – 2017. – № 1. – P. 105-115.
58. Gorschewsky, O. Quantitative analysis of biochemical characteristics of bone-patellar tendon-bone allografts / O. Gorschewsky // Biomed. Mater. Eng. – 2005. – № 6 (15). – P. 403-411.
59. Goudouri, O. M. An experimental bioactive dental ceramic for metal-ceramic restorations: Textural characteristics and investigation of the mechanical properties / O. M. Goudouri // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. Elsevier. – 2017. – №66. – P. 95-103.
60. Grood, E. S. Cruciate ligament prosthesis: strength, creep, and fatigue properties / E. S. Grood, F. R. Noyes// J. Bone Joint Surg. – 2006. – № 58. – P. 1083-1088.
61. Hasan, A. Micro and nanotechnologies in heart valve tissue engineering / A. Hasan // Biomaterials. Elsevier Ltd. – 2016. – № 103. – P. 278-292.
62. Hench, L. L. Third-Generation Biomedical Materials / L. L. Hench // Science. – 2002. – № 295. – P. 1014-1017.
63. Hilfiker, A. Reduction of xeno-antigens in porcine pulmonary heart valves by decellularization and glycolytic enzymatic treatment / A. Hilfiker // Xenotransplantation. – 2014. – № 2 (21). – P. 190–198.
64. Hodde, J. Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix / J. Hodde, R. Record, R. Tullius, S. Badylak // Biomaterials. – 2002. – № 23. – P. 1841-1848.
65. Holubec, T. Use of extracellular matrix patches in cardiac surgery / T. Holubec, E. Caliskan, S. H. Sündermann, C. T. Starck, A. Plass, D. Bettex, V. Falk, F. Maisano // J Card Surg. – 2015. – № 30 (2). – P. 145-148.
66. Holzmüller, W. Das PDS-augmentierte Patellar-sehnentransplantat zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes am Schafsknie: Chir Forum / W. Holzmüller // Langenbecks Arch. Chir. – 2003. – № 45. – P. 265-268.

67. James, S. L. Cruciate ligament stents in reconstruction of the unstable knee / S. L. James // Clin. Orthop. – 2001. – № 143. – P. 90-96.
68. Keane, T. J. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance / T. J. Keane, I. T. Swinehart, S. F. Badylak // Methods. – 2015. – № 4. – P. 32-47.
69. Lam, M. T. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration / M. T Lam, J. C Wu // Expert Rev Cardiovasc Ther. – 2012. – № 10 (8). – P. 1039-1049.
70. Lih, E. Polymers for cell/tissue anti-adhesion / E. Lih // Prog. Polym. Sci. – 2015. – № 44. – P. 28-61.
71. Liu, D. The smart drug delivery system and its clinical potential / D. Liu // Theranostics. – 2016. – № 9 (6). – P. 1306-1323.
72. Macchiarini, P. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway / P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go // Lancet. – 2008. – № 372. – P. 2023-2030.
73. Marshall, M. An alternative to synthetic aortic grafts using jejunum / M. Marshall // J Invest Surg. – 2000. – № 32. – P. 333-341.
74. Mironova, S. S. Spaetresultate der Rekonstruktion des Bandapparates des Kniegelenkes mit Lawsan / S. S. Mironova // Zbl. Chir. – 2000. – № 103. – P. 432-434.
75. Montazerian, M. Bioactive and inert dental glass-ceramics // M. Montazerian, E. D. Zanotto // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2016. – № 1. – P. 1-21.
76. Murase, Y. Evaluation of compliance and stiffness of decellularized tissues as scaffolds for tissue-engineered small caliber vascular grafts using intravascular ultrasound / Y. Murase, Y. Narita, H. Kagami, K. Miyamoto, Y. Ueda, M. Ueda // ASAIO J. – 2006. – № 52. – P. 450-455.
77. Muzzarelli, A. A. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone / A. A. Muzzarelli // Mar. Drugs. – 2015. – № 12 (13). – P. 7314-7338.
78. Nkomo, V. T. Burden of valvular heart diseases: a population-based study / V. T. Nkomo // Lancet. – 2006. – № 9540 (368). – P. 1005-1011.

79. Osborn, J. F. The material science of calcium phosphate ceramics / J. F. Osborn, H. Newesely // *Biomaterials*. – 2000. – № 2 (1). – P. 108-111.
80. Ott, H. C. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart / H. C. Ott // *Nature medicine*. – 2008. – № 2. – P. 213-221.
81. Ott, H., Taylor, D. Decellularization and recellularization of organs and tissues inventors // US patent 20090202977, 2009.
82. Patel, R. Bioinert membranes prepared from amphiphilic poly(vinylchloride)-g-poly(oxyethylene methacrylate) graft copolymers / R. Patel // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier B.V.* – 2013. – № 3 (33). – P. 1662-1670.
83. Prasertsung, I. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique / I. Prasertsung // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2008. – № 1 (85). – P. 210-219.
84. Raina, D. B. Muscle as an osteoinductive niche for local bone formation with the use of a biphasic calcium sulphate/hydroxyapatite biomaterial / D. B. Raina // *Bone Jt. Res.* – 2016. – № 10 (5). – P. 500-511.
85. Ramakrishna, S. Biomedical applications of polymer-composite materials: A review / S. Ramakrishna // *Compos. Sci. Technol.* – 2001. – № 9. – P. 1189-1224.
86. Rehm, K. E. Biomechanische Untersuchungen vom resorbierbaren Bandersatz und deren klinische Bedeutung: *Chir. Forum* / K. E. Rehm // *Langenbecks Arch. Chir.* – 2004. – № 67. – P. 205-211.
87. Rieder, E. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells / E. Rieder // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2004. – № 2. – P. 399-405.
88. Rykke, M. Dental materials for posterior restorations / M. Rykke // *Endod. Dent. Traumatol.* – 2002. – № 4. – P. 139-148.

89. Salimi Bani, M. A new model for the artificial aorta blood vessels using double-sided radial functionally graded biomaterials / M. Salimi Bani // Med. Biol. Eng. Comput. Springer Berlin Heidelberg. – 2016. – № 3. – P. 12-17.
90. Sano, M.B. Towards the creation of decellularized organ constructs using irreversible electroporation and active mechanical perfusion / M. B. Sano // BioMed Central Ltd. – 2010. – № 1 (9). – P. 83-87.
91. Scherer, M. A. Resorptionskinetik von Polidioxanon-Kordeln in Abhaengigkeit vom Implantationsort:Berichtsband DVM/AO Tagung 11 / M. A. Scherer // Deutscher Verband fuer Materialforschung und pruefung. – 2001. – № 78. – P. 73-81.
92. Seitz, J. M. Recent Advances in Biodegradable Metals for Medical Sutures: A Critical Review / J. M. Seitz // Adv. Healthc. Mater. – 2015. – № 13 (4). – P. 1915-1936.
93. Shi, L. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review / L. Shi, V. Ronfard // Int J Burns Trauma. – 2013. – № 3 (4). – P. 173-179.
94. Siebels, W. Die Auswirkung von temporaeren synthetischen Verstaerkungsmaterialien auf die biomechanischen Eigenschaften gestielter Patellarseh-nenplastiken als Kreuzbandersatz beim Schaf : Chir. Forum / W. Siebels // Langenbecks Arch. Chir. – 2009. – № 13. – P. 261-264.
95. Smith, R. M. Role of small intestine submucosa (SIS) as a nerve conduit: preliminary report / R.M. Smith, C. Wiedl, P. Chubb, C. H. Greene // J Invest Surg. – 2004. – № 17 (6). – P. 339-344.
96. Song, Z. Prevention of postoperative tendon adhesion by biodegradable electrospun membrane of poly(lactide-co-glycolide) / Z. Song // Chinese J. Polym. Sci. – 2015. – № 4. – P. 587-596.
97. Song, Z. Reconstruction of abdominal wall musculofascial defects with small intestinal submucosa scaffolds seeded with tenocytes in rats // Z. Song, Z. Peng, Z. Liu, J. Yang, R. Tang, Y. Gu // Tissue Eng Part A. – 2013. – № 19 (13-14). – P. 1543-1553.

98. Steinert, R. F. Range of refractive independence and mechanism of action of a corneal shape-changing hydrogel inlay: Results and theory / R. F. Steinert // J. Cataract Refract. Surg. – 2015. – № 8 (41). – P. 1568–1579.
99. Tan, M. Y. Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits / M. Y. Tan, W. Zhi, R. Q. Wei, Y. C. Huang, K. P. Zhou, B. Tan, L. Deng, J. C. Luo, X. Q. Li, H. Q. Xie, Z. M. Yang // Biomaterials. – 2009. – № 30 (19) – P. 3234-3240.
100. Van Hove, R. P. Titanium-Nitride Coating of Orthopaedic Implants: A Review of the Literature / R. P. Van Hove // Biomed Res. Int. Hindawi Publishing Corporation. – 2015. – №15. – P. 1-9.
101. Vedakumari, W. S. Quercetin impregnated chitosan–fibrin composite scaffolds as potential wound dressing materials - Fabrication, characterization and in vivo analysis/ W. S. Vedakumari // Eur. J. Pharm. Sci. Elsevier B.V. – 2017. – №97. – P. 106–112.
102. Vert, M. Terminology for biorelated polymers and applications / M. Vert // Pure Appl. Chem. – 2012. – № 2. – P. 377-410.
103. Yeo, Y. Polymers in the prevention of peritoneal adhesions / Y. Yeo, D. S. Kohane // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2008. – № 1. – P. 57-66.
104. Yu, Z. Osseointegration of nanohydroxyapatite- or nano- calcium silicate- incorporated polyetheretherketone bioactive composites in vivo / Z. Yu // Int. J. Nanomedicine. – 2016. – № 6 – P. 123-133.
105. Zakhary, K. E. Emerging Biomaterials in Trauma / K. E. Zakhary, J. S. Thakker // Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am. Elsevier Inc. – 2017. – № 1 (29). – P. 51-62.
106. Zhang, D. Electrospun SF/PLCL nanofibrous membrane: a potential scaffold for retinal progenitor cell proliferation and differentiation / D. Zhang // Sci. Rep. – 2015. – № 5. – P. 143-156.
107. Zhao, X. 3D patterned substrates for bioartificial blood vessels. The effect of hydrogels on aligned cells on a biomaterial surface / X. Zhao // Acta Biomater. Acta Materialia Inc. – 2009. – № 26. – P. 159-168.

108. Zhao, Z. Q. Improvement in cardiac function with small intestine extracellular matrix is associated with recruitment of C-kit cells, myofibroblasts, and macrophages after myocardial infarction / Z. Q. Zhao, J. D. Puskas, D. Xu, N. P. Wang, M. Mosunjac, R. A. Guyton, J. Vinten-Johansen, R. Matheny // J Am Coll Cardiol. – 2010. – № 55 (12). – P. 1250-1261.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет физико–математических и
естественных наук

Кафедра «Общая биология и
биохимия»

Направление подготовки

06.04.01 Биология

Магистерская программа «Биохимия и
молекулярная биология»

Утверждаю

Зав. кафедрой



Г. А. Карпова

« 1 » декабря 2016 г.

Задание

По ВКР студента Орловой Ирины Витальевны

Тема работы: «Сравнительная оценка эффективности различных методов
децеллюляризации и их влияния на свойства биоматериала»

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 2016 г. № 1192 а/о

Срок сдачи студентом законченной работы « 17 » мая 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Составление плана магистерской диссертации	Декабрь 2016	Выполнено
2.	Определение цели и задач магистерской диссертации	Декабрь 2016	Выполнено
3.	Поиск и анализ научной литературы по теме «Сравнительная оценка эффективности различных методов децеллюляризации и их влияния на свойства биоматериала», изучение информации о способах децеллюляризации, гистологической оценке сохранности биоматериала, видах биоматериалов	Декабрь 2016-март 2017	Выполнено
4.	Подбор и оформление библиографического списка	Март 2017	Выполнено
5.	Изучение способов децеллюляризации	Март-апрель 2017	Выполнено
6.	Изучение методов оценки физико-механических характеристик биоматериала	Апрель 2017	Выполнено
7.	Изучение методов гистологического контроля	Май 2017	Выполнено
8.	Изучение скорости резорбции in vitro	Июнь-июль 2017	Выполнено
9.	Оформление первой и второй главы магистерской диссертации	Сентябрь-ноябрь 2017	Выполнено
10.	Проведение исследования по теме «Сравнительная оценка эффективности различных методов децеллюляризации и их влияния на свойства биоматериала»	Ноябрь 2017-май 2018	Выполнено
11.	Подготовка образцов разными методами децеллюляризации	Ноябрь-декабрь 2017	Выполнено
12.	Гистологическое исследование образцов	Январь 2018	Выполнено
13.	Исследование физико-механических характеристик различных образцов биоматериала	Февраль 2018	Выполнено
14.	Исследование скорости резорбции in vitro	Март-апрель 2018	Выполнено
15.	Проведение статистической обработки полученных результатов	Апрель-май 2018	Выполнено

16.	Оформление полученных результатов в виде таблиц, схем, диаграмм	Апрель-май 2018	Выполнено
17.	Подведение итогов и обработка результатов, полученных в ходе эксперимента	Май 2018	Выполнено
18.	Оформление третьей главы магистерской диссертации	Май 2018	Выполнено
19.	Формулирование выводов, оформление магистерской диссертации	Май 2018	Выполнено
20.	Подготовка презентации и доклада для защиты магистерской диссертации	Май 2018	Выполнено

Дата выдачи задания «01» декабря 2016г.

Руководитель
Венедиктов А. А., к.б.н.,
управляющий ООО "Кардиоплант"

Задание принял к исполнению
Орлова И. В.