

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"

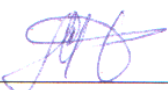
Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

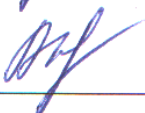
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ
ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ БИОМАТЕРИАЛА»**

Студент  Филатова Мария Александровна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр  Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 09.06.18 № 14)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отл. (протокол заседания ГЭК от 21.06.18 № 15)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Полимеры, используемые в трансплантологии	6
1.1.1 Синтетические полимеры	7
1.1.2 Природные полимеры.....	9
1.2 Требования, предъявляемые к имплантируемым материалам.....	12
1.3 Морфология внеклеточных коллагеновых матриц.....	14
1.3.1 Матрикс на основе перикарда	16
1.3.2 Матрикс на основе децеллюляризованной дермы коров и лошадей	18
1.3.3 Матрикс на основе подслизистой стенки мочевого пузыря.....	18
1.3.4 Матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи	19
1.4 Этапы получения внеклеточного коллагенового матрикса.....	20
1.4.1 Децеллюляризация.....	20
1.4.2 Стабилизация сшивающими агентами	24
1.4.3 Лиофилизация	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1 Подготовка материала исследования.....	28
2.2 Методы гистологического контроля.....	30
2.2.1 Окраска гематоксилин-эозином	30
2.2.2 Окраска по Ван-Гизону-Вейгерту	31
2.3 Подкожная имплантация экспериментальных образцов	32
2.4 Методы определения биохимических показателей крови.....	33
2.5 Методы статистической обработки данных.....	34
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	35
3.1 Результаты получения экспериментальных образцов разными способами децеллюляризации	35
3.1.1 Результаты ферментативной обработки	35
3.1.2 Результаты щелочной обработки	38

3.1.3 Результаты солевой обработки.....	40
3.1.4 Результаты детергентной обработки	41
3.2 Гистологическое исследование образцов.....	43
3.3 Изучение влияния подкожной имплантации образцов внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на биохимические параметры сыворотки крови крыс	47
3.3.1 Влияние подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса на активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови крыс	47
3.3.2 Влияние подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса на активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови крыс	49
3.3.3 Влияние подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса на активность глутамилтрансферазы в сыворотке крови крыс ..	50
3.3.4 Влияние подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса на активность щелочной фосфотазы в сыворотке крови крыс..	51
ВЫВОДЫ.....	53
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	54

ВВЕДЕНИЕ

Главной целью современной трансплантологии как части клинической медицины является повышение доступности качественной медицинской помощи методом трансплантации органов в соответствии с реальной потребностью населения и донорским ресурсом. Её развитие трудно представить без углубленного решения научных проблем, таких как: биологические и клинические аспекты органной, тканевой и клеточной трансплантации, преодоление тканевой несовместимости, отторжения трансплантата, создание моделей искусственного сердца, искусственных и биогибридных органов и систем и др [11].

Донорство органов в трансплантологии имеет ряд существенных ограничений, поэтому разработка альтернативных методов восстановления повреждений органов и тканей является актуальной и необходимой. Создание искусственных органов даёт возможность отказаться от трансплантации большей части органов доноров и может улучшить качество жизни и выживаемость пациентов. Децеллюляризация тканей и органов — перспективная технология, которая легла в основу создания матриксных материалов для тканевой инженерии и конструктивно-регенеративной медицины. С помощью данной методики стало возможным получение внеклеточного матрикса, который можно в дальнейшем использовать для создания различных трансплантатов [60,61].

Выделяют три вида биоматериала по его происхождению:

- Под аутотрансплантантом понимают пересадку органа в пределах одного организма. Данный вид пересадки органов и тканей относится к хирургии и не является предметом изучения трансплантологии.
- Под аллотрансплантантом понимают пересадку между организмами одного и того же вида (от одного человека другому), имеющими разный генотип. Это наиболее часто используемый вид трансплантации.

- Под ксенотрансплантантом понимают пересадку органа или ткани от представителя одного вида представителю другого вида, например от животного человеку [7].

Однако, несмотря на успехи в его применении, остается немало серьёзных проблем, требующих своего решения. К таким задачам относятся развитие иммунного ответа, токсическое воздействие, способность к биodeградации с образованием безопасных для организма продуктов при использовании алло- и ксеногенных материалов и др. Для предотвращения возникновения иммунных реакций биологические скаффолды должны быть децеллюляризованы, но при этом сохранять исходную структуру ткани и внеклеточного матрикса.

Целью настоящей работы являлась оценка эффективности различных способов децеллюляризации биоматериала.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести децеллюляризацию биоматериала различными способами: с помощью детергента (додецилсульфат натрия 1%), с помощью щелочной обработки, солевым методом, ферментативным методом.
2. Провести гистологическое исследование образцов и оценить эффективность различных способов децеллюляризации биоматериала.
3. Провести подкожную имплантацию образцов крысам.
4. Оценить влияния имплантируемых образцов на биохимические показатели сыворотки крови крыс: активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы.

Бакалаврская работа написана на 62 листах, содержит 7 рисунков, 12 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 68 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Полимеры, используемые в трансплантологии

Важное место в исследованиях современной клинической трансплантологии занимает разработка биологических и синтетических имплантатов. Для изготовления синтетических имплантатов широко применяются различные полимеры. По функциональным свойствам изделия из полимерных материалов успешно конкурируют с аналогичными образцами из традиционных материалов – металлов, стекла, натурального каучука, значительно превосходя их по экономическим показателям. В некоторых случаях синтетические полимеры являются незаменимыми материалами, например, для изготовления эластичных прозрачных трубок для систем переливания крови, мембран для массообменных устройств и т.п. Основные достоинства полимерных материалов: высокая стойкость к агрессивным средам, атмосферным и радиационным воздействиям, ударным нагрузкам, низкая теплопроводность, высокая производительность и малая энергоёмкость методов получения и переработки, низкая стоимость, малая масса изделий, биоинертность.

Для применения полимерного материала в каком-либо изделии или конструкции важно выбрать полимер соответствующего химического строения, внести в него необходимые добавки и обеспечить получение в процессе переработки в изделие структуру, обеспечивающую заданный комплекс свойств. На поведение полимерного материала или изделия из него оказывает влияние и условия эксплуатации, воздействие окружающей среды, нагрузки и других факторов [3].

1.1.1 Синтетические полимеры

Для создания имплантируемых конструкций одними из первых в тканевой инженерии стали использоваться биodeградируемые синтетические материалы на основе полимеров органических кислот.

Полигликолевая кислота (ПГА): биоразлагаемый, термопластичный полимер, являющийся самым простым линейным алифатическим полиэфиром; не растворяется в воде, т.е. имеет повышенную кристалличность [37]. Высокомолекулярные формы ПГА нерастворимы в большинстве органических растворителей, таких как этилацетат, диметилкетон, трихлорметан. Тем не менее, полигликолид растворяется в таких фторированных растворителях, как гексафторизопропанол и сесквигидратгексафторацетона. Их применяют для приготовления раствора полимера с высокой молекулярной массой для электроспиннинга или изготовления пленки[38]. В настоящее время полигликолевая кислота широко используется для изготовления биodeградируемого хирургического шовного материала [39, 40]. Хирургическая нить образуется путем скручивания волокон из данного соединения. К основным преимуществам хирургических нитей из ПГА относят то, что их не требуется удалять после операции, иными словами, нет дополнительных травм для прооперированной области, кроме того не происходит негативного влияния на близлежащие ткани организма. Внутри организма материал полностью биоразлагается в течение нескольких месяцев, преобразуясь до углекислоты и воды.

Полилактид представляет собой алифатический полиэфир, мономером которого является лактат. Полимер термопластичен, биоразлагаем и является биосовместимым [41]. Полилактиды применяются в изготовлении биodeградируемых упаковок, средств личной гигиены, из них конструируются материалы для фиксации переломов, хирургические нити, штифты [42]. Также полилактид используется как исходный материал

для печати на 3D – принтерах [43]. Из него изготавливают лекарственные препараты, в которых основу оболочки составляет полилактид в сочетании с противомикробными веществами в различных концентрациях, что способствует медленному и постепенному высвобождению препарата и предотвращению роста микроорганизмов [44].

Поликапролактон (ПКЛ) – биоразлагаемый полиэфир капролактона. Не растворяется в воде, органических растворителях, различных маслах, характеризуется низкой вязкостью и легко поддается обработке. При смешивании с крахмалом повышается его биоразлагаемость [45]. В медицине поликапролактон используется как шовный материал [46], а также применяется при изготовлении носителей для переноса лекарств в организме [58].

Полиэтилентерефталат (ПЭТФ) – в аморфном состоянии представляет собой твердое, бесцветное и прозрачное вещество, а в кристаллическом – непрозрачное и белое [47]. Полиэтилентерефталат плохо растворяется в воде и органических растворителях, устойчив к кислотам и слабощелочным растворам, довольно прочен, долго не изнашивается и является диэлектриком. В области хирургии ПЭТФ используется для изготовления протезов костных сосудов [49], сухожилий, связок, клапанов сердца [50]. Изменение химического состава боковых групп даёт возможность синтезировать из ПЭТФ материалы с разной скоростью деградации [48].

Полиамиды представляют собой пластмассу, основу которой составляют линейные синтетические высокомолекулярные соединения. Полиамиды характеризуются гидрофильностью [51], и их способность к водопоглощению оказывает большое воздействие на вязкость и прочность материала [52]. Из полиамидных волокон изготавливают хирургические нити, протезы кровеносных сосудов [53, 54].

Силиконы (полиорганосилоксаны): представляют собой кремнийорганические соединения, включающие в себя также полиорганосилоксаны (силиконовые масла, гидрофобизаторы, низкомолекулярные каучуки) и кремнийорганические мономеры (силаны) [55]. Силиконы способствуют повышению или снижению адгезии белков и клеток, придают материалам гидрофобность, сохраняют свойства при высоких температурах, а также их быстрых перепадах, диэлектрики, химически и биологически инертны, эластичны, и нетоксичны [56, 57]. Изделия из силиконов резистентны к радиационному воздействию, ультрафиолетовому излучению и воздействию электрических полей.

1.1.2 Природные полимеры

При изготовлении биоконструкций у полимеров природного происхождения значительно больше преимуществ, чем у синтетических, поскольку продукты распада таких материалов в организме являются естественными метаболитами, участвующими в биохимических внутриклеточных процессах, и т.о. биосовместимость природных полимеров во много раз превышает биосовместимость синтетических [20].

Однако, для создания тканей и органов широко применяются и синтетические материалы, и материалы на основе природных полимеров (хитозан, альгинат, коллаген), а также биокompозитные материалы (табл. 1) [26].

Таблица 1 – Виды биоматериалов, применяемых в тканевой инженерии

Биоматериал	Биосовместимость (включая цитотоксичность)	Токсичность	Резорбция	Область применения
Полимеры на основе органических кислот	+	++	Полная до CO_2 и H_2O	Хирургия, тканевая инженерия (как матрица-носитель практически для всех культур клеток).
Гидроксиапатит	+	+	Нерезорб.	
Альгинат	++	+	Полная	Перевязочные материалы, в тканевой инженерии в виде гидрогелей (хондробласты, нервные клетки)
Хитозан	++	+	Полная	Перевязочные материалы, в ТИ в виде пленок, губок; в сочетании с коллагеном (реконструкция костной, мышечной, хрящевой тканей, сухожилий)

Таблица 1 (продолжение)

Коллаген	+++	–/+	Замещение собственными белками, фермент. лизис	Перевязочные материалы, в ТИ (губки, трехмерные модели, пленки) как матрица-носитель практически для всех культур клеток.
Внеклеточный матрикс (естественные биологические мембраны)	++++	–/+	Ремоделирование с заменой собственными белками	Шовный материал, в ТИ (трехмерные модели, пленки) как матрица-носитель для практически всех культур клеток

Одними из первых в тканевой инженерии применялись биodeградируемые синтетические материалы на основе полимеров органических кислот, например молочной (PLA, полилактат) и гликолевой (PGA, полигликолид). При этом в составе полимера может быть как один тип кислотного остатка, так и их сочетания в различных пропорциях. Данные матрицы стали основой для реконструкции таких органов и тканей, как кожа, кости, хрящи, сухожилия, мышцы (поперечно-полосатая, гладкая и сердечная), тонкая кишка и др. Недостатками этих материалов являются: изменение pH окружающих тканей при разложении в организме, а также недостаточно высокая механическая прочность, что не даёт возможности использовать их как универсальный материал для матриц и подложек [18].

Особое место среди материалов для биоматриц-носителей занимают коллаген, хитозан и альгинат.

Коллаген лишён практически всех своих антигенных свойств, разрушается при ферментативном гидролизе и структурно замещается собственными белками, синтезируемыми фибробластами. Из него можно изготовить матрицы с определёнными свойствами для реконструкции практически всех органов и тканей. Являясь естественным тканевым белком, он хорошо подходит в качестве носителя культуры клеток, обеспечивая рост и развитие ткани.

Альгинат – полисахарид, получаемый из морских водорослей, может играть роль матрицы-носителя, однако не обладает оптимальной биологической совместимостью и механическими свойствами. Обычно он используется в виде гидрогелей для регенерации хрящевой и нервной ткани.

Хитозан – азотсодержащий полисахарид, являющийся основным компонентом наружного покрова насекомых, ракообразных и паукообразных. Этот биоматериал извлекают из хитиновых панцирей ракообразных и моллюсков. Заслуживает внимания комбинированный по составу препарат – коллагеново-хитозановый комплекс. В ходе лабораторных и клинических исследований была выявлена его инертность и способность к сохранению жизнеспособности клеточной культуры как *in vitro*, так и *in vivo*. Этот комплекс разрешен Минздравом РФ в качестве перевязочного, ранозаживляющего средства и уже используется в клинической практике в хирургии и стоматологии.

1.2 Требования, предъявляемые к имплантируемым материалам

Для успешного использования биоматериал должен обладать определенными химическими, биологическими и механическими свойствами. К требуемым химическим свойствам можно отнести такие характеристики, как отсутствие вредных химических реакций с тканями организма, а также межтканевыми жидкостями, резорбция с контролируемой

скоростью в организме. Необходимые механические свойства заключаются в прочности конструкции, возможности осуществлять хирургические манипуляции. Главной биологической характеристикой для материала является его биосовместимость с организмом. Биосовместимость материала может пониматься как способность материала не изменять направленность биохимических реакций, не угнетать морфогенетических потенций ткани, слагаемой клетками определенного типа. Рассматривая ткань как структуру более высокого иерархического уровня, находящуюся в процессе обновления, регенерации, следует обязательно помнить, что обновление клеточных популяций, направленное на компенсацию функций отмирающих клеток или становящихся физиологически неэффективными (физиологическая регенерация) или после действия повреждающих факторов, разрушающих клеточную популяцию (репаративная регенерация), проходит также в рамках адаптивных возможностей ткани [7].

Биоматериалы можно разделить по отклику организма на его имплантацию. Материал может быть 1) токсичным, и в этом случае окружающие его ткани будут отмирать; 2) биоинертным, и тогда образуется соединительная волокнистая ткань; 3) биоактивным, благодаря чему идёт образование новой ткани; 4) биорезорбируемым – конструкция из биоматериала заменяется собственной тканью организма, обладающей всеми присущими ей характеристиками и функциями [1]. Имплантация в организм любого чужеродного материала, в том числе биологических тканей, вызывает воспалительно-репаративную реакцию, которая является выражением защитной и репаративной функций соединительной ткани. Воспалительный процесс в окружающей ткани ведет к пролиферации фибробластов, которые продуцируют коллагеновые волокна и другие компоненты экстрацеллюлярного матрикса. Формируется соединительнотканная капсула, изолирующая инородное тело. Исключением

являются только материалы, подвергающиеся быстрой биodeградации и/или полной макрофагальной резорбции без формирования капсулы [24].

Интенсивность воспаления зависит от степени биосовместимости имплантируемых материалов. Именно поэтому биоматериалы, предназначенные для медицинской практики, обязательно проходят токсикологические и морфологические исследования в условиях, максимально приближающихся к их конкретному использованию [25].

Главные задачи во всех протоколах обработки биоматериалов – это лишение иммуногенности нативной ткани за счет полной децеллюляризации, удаление видоспецифичных молекул межклеточного вещества, а также максимальное сохранение архитектоники природной ткани.

1.3 Морфология внеклеточных коллагеновых матриц

Весьма широкой областью применения биоматериалов в настоящее время стала реконструктивная хирургия, которая позволяет производить реконструкцию дефектов различных тканей и органов и улучшить качество жизни пациентам без применения трансплантатов и биоискусственных органов.

Децеллюляризованные биоматериалы в настоящее время нашли широкое распространение в регенеративной медицине и многие из них являются коммерчески доступными (к примеру, при лечении пациентов с ожогами третьей степени зачастую прибегают к использованию трупной кожи в высушенном виде). Совокупность физических, химических и биологических методик предоставляет возможность найти наиболее эффективные пути устранения клеточных и ядерных компонентов, при этом сохраняя строю кровеносных сосудов и нервных путей.

Децеллюляризованный матрикс представляет собой структурно сложный комплекс, для которого характерно разнообразие функционального

белкового состава, наличие гликозаминогликана и факторов роста. Такой внеклеточный матрикс (ВКМ) можно использовать в качестве скаффолда, который впоследствии может быть колонизирован клетками с регенеративными свойствами (плюрипотентные клетки, эмбриональные стволовые клетки, клетки пуповины, мезенхимальные клетки и т. д.). После имплантации он сохраняет свой первоначальный размер и форму трансплантата. Ещё одной особенностью децеллюляризации является удаление иммуноактивных молекул, что приводит к снижению частоты отторжения трансплантата. Все основные процессы децеллюляризации начинаются с лизирования клетки физическим, химическим или биологическим путём. Под физическими методами обычно подразумевают изменение температурных условий, которые приводят к образованию внутриклеточных кристаллов льда, разрушающих целостность клеточной мембраны. Другим возможным методом является обработка под высоким давлением, что также приводит к клеточному лизису и уничтожению вирусов и бактерий. Физические способы чаще используются для децеллюляризации таких биоматериалов, как перикард, гортань, костный мозг, роговица или кровеносные сосуды [7].

Внеклеточный коллагеновый матрикс представляет собой структурно сложный комплекс, разнообразный по составу функциональных белков, гликопротеинов и протеогликанов, которые организованы в трехмерную систему. Эти характеристики определяют эластичность, сайты связывания с поверхностными рецепторами и сигнальных факторов, которые необходимы для ангиогенеза, клеточной миграции и пролиферации [11]. Первоначальная концепция пассивности ВКМ при реконструкции тканей была пересмотрена в связи с обнаружением взаимодействия между матриксом и внутриклеточными цитоскелетными и ядерными элементами. Внеклеточный коллагеновый матрикс играет важную роль в процессе дифференциации миобластов до мышечных трубок [15]. Эти сведения приобрели большую

значимость в тканевой инженерии, поскольку это позволило использовать ВКМ в качестве основы для реконструкции тканей путем применения клеток с пролиферативно-дифференцировочным потенциалом.

1.3.1 Матрикс на основе перикарда

На сегодняшний день одним из успешно применяемых в реконструктивно-восстановительной хирургии биоматериалов, является ксеноперикардальная ткань.

Перикард – это замкнутый мешок; окружающая сердце оболочка, которая состоит из двух слоев. Ее наружный слой - фиброзный перикард со всех сторон окружает сердце, переходя в наружную оболочку отходящих от сердца крупных кровеносных сосудов. Внутренний слой перикарда - серозный перикард представляет собой закрытую со всех сторон полость серозной оболочки: ее внутренний (висцеральный) листок –эпикард вплотную прилегает к стенке сердечной мышцы, а наружный (париетальный)листок сращен с фиброзным перикардом. Между обоими листками находится щелевидная полость перикарда, в которой имеется небольшое количество жидкости, предотвращающей трение между двумя его листками во время сердечных сокращений [7]. Ткань перикарда представляет собой чередование поперечно и продольно расположенных слоев коллагеновых волокон. В составе этих слоев располагаютсяэластическиеволокна,которыеориентированыпараллельноколлагеновым. Коллагеновые волокна обладают наибольшей прочностью и составляют жесткую матрицу биоткани. Эластические волокна, наоборот, обладают способностью к обратимым деформациям под влиянием механических воздействий: при растяжении они удлиняются, а затем, будучи освобожденными, мгновенно укорачиваются подобно резиновой ленте [58]. Доказано то, что коллагеновые и эластические волокна играютразную роль в

структурах соединительной ткани и упруго-деформативные свойства ткани зависят от состояния структурных белков [67]. Межклеточное вещество, несмотря на специфическую роль каждого из своих компонентов, при осуществлении общих функций соединительной ткани, выступает как единое целое.

Такое тесное единство обеспечивается общностью происхождения, химическими связями между протеогликанами, гликопротеинами, коллагеном и эластином, тесным структурным взаимодействием всех этих элементов на всех уровнях – от молекулярного до тканевого.

Ксеноперикард на протяжении уже нескольких десятилетий широко применяется в хирургии сердца и сосудов для закрытия дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородок, создания искусственных клапанов сердца, протезирования сосудов, протезирования и пластики клапанов сердца, околосердечных тканей, профилактики спаечных процессов в редостении, биопротезирования и пластики магистральных сосудов и уже доказал свою высокую эффективность применения в этой области медицины [5,19,20]. Что касается общей хирургии - хирургия грыж брюшной стенки, хирургия диафрагмальных грыж, хирургическое лечение перитонита (использование ксеноперикарда для закрытия лапаростомной раны в условиях абдоминального компартмент-синдрома), реконструктивно-восстановительная хирургия внепеченочных желчных путей (использование био материалов для протезирования желчных протоков), укрытие паренхиматозных органов при резекции (например, укрытие культи доли печени при резекции). Ксеноперикард с недавнего времени применяется при протезировании сухожилий, укреплении связочного аппарата суставов [17]. Возможно применение ксеноперикарда при следующих операциях: пластика мочевыводящих путей, гинекологические слинги, укрепление мышц тазового дна, урослинги, закрытие культи почки [18].

1.3.2 Матрикс на основе децеллюляризованной дермы коров и лошадей

Децеллюляризованная дерма коров и лошадей в результате лиофилизации также приобретает пористую структуру, но более прочную, чем в губке из раствора коллагена, что подтверждается сохранностью фибрилл коллагена с периодической исчерченностью [30]. Эти скаффолды имеют безусловную перспективу клинического и экспериментального применения, но нуждаются в дальнейшей модификации. На данный момент они применяются в пластике мягких тканей [29].

1.3.3 Матрикс на основе подслизистой стенки мочевого пузыря

Эпителий слизистой оболочки мочевого пузыря (уротелий) представлен ровным пластом плотно прилегающих друг к другу клеток, при этом соединительнотканых элементов в межклеточных пространствах не зафиксировано. Базальная мембрана представляет собой совокупность коллагеновых и эластических волокон с преобладанием последних и отличается ровным контуром, повторяющим ход эпителиального пласта. Ее толщина достигает 21 мкм. В собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистом слое, представленных сетью коллагеновых волокон с небольшой примесью эластических и некоторым количеством мышечных элементов, определяются артериолы, венулы и капилляры с содержанием в адвентиции сосудов и базальной мембране эндотелия только коллагеновых волокон. Мышечные волокна формируют пучки приблизительно одинаковой толщины, идущие в разных направлениях, детерминированных функциональной нагрузкой. Между мышечными пучками располагается небольшое количество коллагеновых волокон с единичными эластическими волокнами, которые представляют собой каркас мышечного слоя. В

интактном мочевом пузыре крыс основными локализациями коллаген- и эластинсодержащих элементов являются: базальная мембрана уротелия, собственная пластинка слизистой оболочки, подслизистая основа, стенки кровеносных сосудов и стромальный каркас мышечной оболочки. Соотношение коллагеновые волокна/эластические волокна в разных структурах различное. Базальная мембрана эпителия отличается преобладанием эластических волокон; собственная пластинка слизистой оболочки, подслизистый слой, стенки кровеносных сосудов и стромальный каркас мышечной оболочки демонстрируют преимущественное содержание коллагеновых волокон. Биоматериалы на основе подслизистой стенки мочевого пузыря в настоящее время находят применение в пластике мягких тканей, лечении ожогов, гинекологических операциях [28].

1.3.4 Матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи

Подслизистая основа тонкой кишки (ПТК) представляет собой слой соединительной ткани, находящийся между мышечным слоем и слизистой оболочкой.

Скаффолд из подслизистой тонкой кишки является естественным бесклеточным ксеногенным биоматериалом, который был использован во многих исследованиях в качестве матрикса для регенерации тонкого кишечника. Большую его часть составляет коллаген (90%), который в основном представлен коллагеном I типа, но так же присутствуют коллагены III, IV, V и VI типов. Помимо этого в структуре внеклеточного матрикса наблюдается присутствие гликопротеинов и факторов роста, которые могут улучшать заживление. Ещё одним важным компонентом ВКМ являются гликозоаминогликаны, играющие немалую роль в закреплении ростовых факторов и цитокинов, поэтому важно учитывать, что их удаление в процессе децеллюляризации может оказать отрицательное воздействие на

вязкоупругие свойства скаффолдов. Поскольку подслизистая является децеллюризованной тканью, то риск иммунологического ответа минимален [32]. Как правило, используется тонкая кишка свиньи, но и другие млекопитающие, такие как крысы и собаки также были использованы в экспериментах. Подслизистая тонкой кишки содержит прежде всего фибриллярный коллаген и адгезивные гликопротеины, которые служат в качестве каркаса, на котором клетки могут мигрировать и размножаться. Трансплантация скаффолда из подслизистой стимулирует ангиогенез, рост соединительной и эпителиальной тканей [31].

1.4 Этапы получения внеклеточного коллагенового матрикса

Тканеинженерные конструкции (ТИК), которые используются в качестве пластического материала для реконструктивной хирургии, состоят из подложек-носителей, называемых матриксами, матрицами или скаффолдами, и культивируемых на них клеток различных типов [27]. Получение таких скаффолдов осуществляется путём последовательной смены нескольких стадий, ключевыми из которых являются децеллюляризация и стабилизация сшивающим агентом.

1.4.1 Децеллюляризация

Одной из главных задач, которые ставит перед собой тканевая инженерия, является разработка и преобразование природных и синтетических каркасов, а также оценка и поддержание жизнеспособности клеток или тканей, взаимодействующих с ними. Для предотвращения возможных иммунных реакций биологический матрикс должен быть децеллюляризован, сохраняя при этом исходную структуру ткани.

Используемые наиболее часто методы децеллюляризации сочетают в себе химические и физические способы. Однако наиболее эффективный метод удаления клеток предполагает использование ещё и ферментных агентов, но в данном случае конечный результат будет зависеть от таких факторов как, например, вид ткани, содержание липидов и др.

В основе методик децеллюляризации лежит механическое, ферментативное, детергентное воздействие или их комбинирование для устранения клеток с сохранением матрицы, состоящей, по большей части, из внеклеточных компонентов. Каждый метод децеллюляризации оказывает больший или меньший эффект на ту или иную ткань. Это зависит от многих факторов, таких как клеточность ткани (например, печень или сухожилие), плотность (например, кожа или жировая ткань), содержание липидов (например, головной мозг или стенка мочевого пузыря), толщина (например, стенка аорты или перикард), и т.п. Любой метод в той или иной степени повреждает микроструктуру внеклеточного коллагенового матрикса, поэтому одной из главных задач децеллюляризации является не только максимальное удаление несущих антигены клеток, но и минимизация ущерба, наносимого материалу.

Различают следующие способы децеллюляризации:

- Щелочная и кислотная обработки: под воздействием кислот и оснований происходит гидролиз цитоплазматических компонентов и деградация нуклеиновых кислот, однако при этом вероятно неблагоприятное воздействие на содержание гликозаминогликанов. Часто используемым кислотным агентом является перуксусная кислота, поскольку обработка данным соединением позволяет сохранить факторы роста, а липидные плёнки не подвергаются деградации при перфузии. Кроме того, к преимуществам надуксусной кислоты можно отнести её антисептические свойства. Щелочные агенты в большинстве своём оказывают не такое мягкое действие в отличие от кислотных и обычно применяются для удаления

волосков из дермальных образцов перед началом процесса децеллюляризации. Как результат, такие свойства могут приводить к разрушительным последствиям для ВКМ и их использования может вызвать неблагоприятные побочные эффекты на волокна коллагена, что в результате может закончиться снижением механических свойств матрикса.

- Гипертоническая и гипотоническая обработки: использование гипотонических или гипертонических растворов вызывает клеточный лизис через осмотический шок, а также приводит к нарушению взаимодействия ДНК с белком. Полного исключения клеток из обработанной ткани не происходит, что может вызвать ухудшение процесса заживления трансплантата и даже его последующее отторжение. Для достижения снижения присутствия клеточного дебриса частой практикой является полоскание ткани гипер- или гипотоническими растворами в нескольких циклах. Наиболее часто для этого применяются растворы Трис, HCl, ЭДТА и NaCl.

- Неионные детергенты: неионные детергенты нашли широкое распространение в силу их мягкого воздействия на тканевую архитектуру и высокую эффективность удаления клеток. Они нарушают липид - липидные и липид - белковые взаимодействия, сохраняя при этом белок - белковые связи. Triton X-100 (октилфенолэтоксилат) самый часто используемый детергент и применяется в основном для тонких тканей, таких как сердечные клапаны, кровеносные сосуды и связки. Время выдержки образцов в Triton X-100 может варьироваться в зависимости от различных условий, начиная с 6 часов и заканчивая 2 неделями, при этом результаты будут также отличаться. Несмотря на это, Triton X-100 вызывает минимальные изменения в составе ВКМ, является лучшим средством для элиминации липидов из обработанных тканей, но, с другой стороны, он уменьшает содержание гликозаминогликанов.

- Ионные детергенты: SDS (додецилсульфат натрия) солюбилизирует клеточные мембраны, но способен денатурировать белки, нарушая их взаимодействия. В качестве агента он более эффективен, чем TritonX-100, особенно при работе с плотными органами (как почки, печень или височно-нижнечелюстные суставы), но оказывает пагубное влияние на количество ГАГ в ВКМ, что само по себе снижает механическую устойчивость матрикса. Инкубационное время SDS и TritonX-100 различно. SDS наиболее эффективен в течение 24 ч инкубационных периодов при 0,1-1%.

- Цвиттер-ионные детергенты: CHAPS или 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат сочетает в себе свойства ионных и неионных детергентов. Как было подтверждено гистологическим анализом, CHAPS отлично подходит для тонких тканей, таких как, например, периферические нервы, кровеносные сосуды или легкие. Он не нарушает структуру коллагена и эластина, однако способствует ухудшению механических свойств матрикса, как и в случаях с обработкой Triton X-100 или гипертоническими растворами.

- Спиртовая обработка: спирты эффективно удаляют липиды из ткани, но вызывают её дегидратацию, что приводит к лизису клеток. Использование метанола или этанола способствует осаждению белка, поэтому их применение ограничивается устранением фосфолипидов, поскольку наличие фосфолипидов в ткани может стать причиной кальцификации (для этого обычно осуществляют комбинацию метанола с хлороформом). Следует иметь в виду, что любые остаточные химические вещества, присутствующие в ВКМ после децеллюляризации, могут оказывать цитотоксическое действие на колонии клеток. Для достижения полного удаления этих остатков следует провести несколько циклов отмывки.

- Биологическая децеллюляризации: биологические агенты, такие как протеолитические ферменты, применяют в комбинации с хелатирующими агентами и нуклеазами. Трипсиновый протеолиз получил широкое

распространение при децеллюляризации клапанов сердца или дермы. Однако, использование трипсина может вызвать нежелательные изменения в содержании коллагена, эластина или гликозаминогликанов, т.к. он оказывает негативное влияние на стабильность внеклеточных компонентов, поэтому рекомендуется применять его на короткие промежутки времени, чтобы предотвратить повреждение основных компонентов внеклеточного матрикса. Такие свойства трипсина могут быть использованы для разрушения мембраны, что повысит эффективность последующих обработок [7].

1.4.2 Стабилизация сшивающими агентами

Следующим этапом после проведения децеллюляризации является обработка сшивающими агентами для улучшения физико-механических характеристик материала. К таким соединениям относятся карбодиимид, глutarовый диальдегид, эпоксидные соединения и проч. Полученные в результате биоматериалы должны быть неиммунногенными, атравматичными, гипоаллергенными, биоинертными, а также обладать приемлемыми физическими и механическими свойствами [9].

Химическая реакция под действием сшивающих агентов необратима. Данные соединения препятствуют способности полимеров к деформациям и набуханию в растворителях, повышают их прочность и химическую устойчивость. Процесс сшивания полимеров может также происходить под воздействием тепла и ионизирующих излучений. Условно сшивающие агенты разделяют на отвердители для пластических масс и вулканизирующие агенты для каучуков.

Сшивание представляет собой процесс возникновения химических связей между молекулярными цепочками с образованием трехмерной сети из связанных друг с другом молекул.

Технология применения ковалентного сшивания нашла применение в ряде коммерческих (в частности для производства клеев для слоистых материалов, новых полимеров; компонент для усиления механических свойств волокон и придания им свойств водонепроницаемости, а также компонент для усиления бумаги [36]) и исследовательских отраслей для улучшения свойств получаемой полимерной системы, например, термореактивных материалов и покрытий[33]. Сшивающие агенты можно использовать при синтезе ионообменных смол[34] и гидрогелей[35], полученных из полимерных молекул, содержащих полярные группы. Гидрогели растворимы в воде, поэтому для того, чтобы придать им свойства, благодаря которым они будут нерастворимыми, гидрогели химически сшиваются во время синтеза или на стадии реакции после полимеризации исходных мономеров.

Среди многих доступных белковых сшивающих агентов глутаровый альдегид, несомненно, нашел самое широкое применение в различных областях, таких как гистохимия, микроскопия, цитохимия, индустрия кожаного лечения, ферментная технология, химическая стерилизация, биомедицинская и фармацевтическая. Глутаровый альдегид получил большой успех из-за его коммерческой доступности и низкой стоимости в дополнение к его высокой реакционной способности. Он быстро реагирует с аминогруппами при нейтральном pH и более эффективен, чем другие альдегиды, в получении термически и химически стабильных сшивок.

Для получения дополнительных внутренних связей в белке можно использовать бифункциональные агенты на основе имидоэфиров, в частности диметилапидимидат. Классический способ образования связи между карбоксильной группой и аминогруппой основан на использовании карбодиимидов[6]. Иными словами, карбодиимид служит конденсирующим агентом и равным образом осуществляет реакцию образования амидной связи за счет активированных карбоксильных групп белка и аминогрупп

носителя или сшивающего реагента. Обработка белков такими карбодиимидами может приводить к образованию межмолекулярных и внутримолекулярных амидных связей между карбоксильными и аминогруппами белковых молекул: при этом исходный карбодиимид превращается в соответствующее производное мочевины и не входит в состав возникшего белкового конъюгата[4].

1.4.3 Лиофилизация

Лиофилизация - способ высушивания объектов. Материал предварительно подвергается заморозке, после чего помещается в вакуум. В процессе лиофилизации вода или другой растворитель удаляется из замороженного раствора с помощью сублимации, создавая пористую структуру, которая легко поддается регидратации. Лиофилизацию применяют в случае необходимости долгого хранения и консервирования различных объектов биологического происхождения, для получения сухой плазмы донорской крови, сывороток и вакцин, в фармацевтической и пищевой промышленности, а также в реконструктивной хирургии при трансплантации органов и тканей.

Физические основы процесса заключаются в равновесии фаз. Обычно лед, вода и водяные пары могут существовать в равновесии одновременно при давлении 0,61 кПа и температуре 0,0075°C. Точка сосуществования трех фаз называется точкой равновесия. Если, начиная с этой точки, увеличивать температуру, оставляя давление на уровне ниже точки равновесия, можно наблюдать процесс сублимации.

Первый этап - замораживание при нормальном давлении, осуществляемое с помощью морозильной машины. В этом процессе очень контролировать скорость заморозки, поскольку крупные кристаллы,

получаемые медленным замораживанием, оказывают более разрушительное воздействие на материал, чем мелкие [21].

Далее следует первичная сушка. На этом этапе давление снижается до 100 - 500 Па. Для начала сублимации льда (воды) в материал должно быть подано достаточное количество тепла. На этой первой стадии сушки около 95% воды в материале сублимируется. Этот этап обычно медленный, потому что нельзя добавлять слишком много тепла. Давление внутри контролируется вакуумным насосом. Уменьшенное давление ускоряет процесс.

На последнем этапе задача происходит удаление жидких частиц воды. Этот этап обусловлен сорбционными изотермами конкретного материала. Температура повышается и может быть даже выше 0°C , однако давление в сушилке обычно остается постоянным. После этого последнего процесса окончательное содержание остаточной воды в материале составляет от 1% до 4%.

Ограничением данной технологии является невозможность получения прямого измерения температуры, не влияя на динамику процесса или не уменьшая стерильность[22].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Подготовка материала исследования

В качестве сырья для получения экспериментальных образцов использовали фрагменты подслизистой тонкой кишки свиньи, которые были предварительно очищены и проверены на наличие дефектов, после чего передавались на дальнейшую обработку.

Процесс обработки сырья для изготовления ВКМ состоит из следующих этапов:

- децеллюляризация
- наслиивание и дегидратация на стеклах
- обработка сшивающим агентом
- лиофилизация
- стерилизация

Децеллюляризация. При подготовке экспериментальных образцов были использованы следующие способы удаления клеток и клеточного дебриса:

1. Обработка поверхностно-активными веществами: после предварительной обработки солевыми растворами биоматериал был подвержен обработке раствором детергента додецилсульфата натрия.

2. Щелочная обработка: после предварительной обработки солевыми растворами биоматериал был обработан раствором гидроксида натрия, выдержан в растворе соляной кислоты, выдержан в растворе гидрокарбоната натрия.

3. Солевая обработка: после предварительной обработки солевыми растворами биоматериал выдерживали в гипертоническом солевом растворе. Поочередную смену гипертонического и гипотонического растворов повторяли многократно.

4. Ферментативная обработка: после предварительной обработки солевыми растворами биоматериал выдерживали в растворе протеолитического фермента трипсина. После этапа ферментации инактивация фермента производилась путём изменения рН раствора, после чего проводили нейтрализацию и отмывку до достижения значений рН промывной жидкости от 5,5 до 6,5.

Для оценки эффективности проведенной обработки образцы биоматериала помещали в раствор формалина и проводили гистологический контроль.

Наслаивание и дегидратация на стеклах. Этап обработки заключается в последовательном наслаивании нескольких лоскутов биоматериала друг на друга на поверхности оргстекла, удалении воздуха между слоями путем разглаживания лоскутов и последующего высушивания на воздухе в течение нескольких суток.

Обработка сшивающим агентом. Этап обработки заключается в фиксации биоматериала на пальцах, удалении излишков ткани с помощью ножниц и помещении биоматериала в раствор сшивающего агента 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида гидрохлорида. Обработка длится не менее суток.

Лиофилизация. Процесс осуществляется в четыре стадии:

- предварительное замораживание;
- первичное высушивание (сублимация в вакууме);
- вторичное высушивание (досушивание) или вакуумная десорбция;
- окончание процесса сушки и извлечение высушенного материала;

Стерилизацию проводят окисью этилена. По сравнению с другими методами данный процесс стерилизации более длительный и включает в себя следующие стадии:

- предварительная обработка биоматериала воздухом с изменением температуры и влажности;

- газовая фаза, когда продукт обрабатывается газообразным оксидом этилена;
- проветривание биоматериала для удаления остатков газа из продукта.

2.2 Методы гистологического контроля

Для оценки эффективности проведенной обработки образцы биоматериала помещали в раствор формалина, содержащего карбонат кальция. В качестве методов гистологического контроля применяли следующие техники окрашивания образцов биоматериала: окраска гематоксилин-эозином, окраска по Ван-Гизону-Вейгерту.

2.2.1 Окраска гематоксилин-эозином

Данная методика предполагает двойное окрашивание: гематоксилином, обладающим в растворе основными свойствами, благодаря чему способен выявлять базофильные клеточные структуры, окрашивая их в сине-фиолетовый цвет, и эозином, проявляющим кислотные свойства и окрашивающим цитоплазму в розовый цвет.

На образцы наносили несколько капель гематоксилина и выдерживали 7-10 минут, после чего помещали их в дистиллированную воду для удаления красителя. После этого выдерживали в 70% растворе спирта для обезвоживания. После этого окрашивали водным раствором эозина в течение 1 минуты. Далее срезы промывали в дистиллированной воде для удаления избытка красителя и обрабатывали 96 % раствором этанола. После обезвоживания для просветления срезы промывали помещали в раствор ксилола. Затем препарат накрывали покровным стеклом [59].

2.2.2 Окраска по Ван-Гизону-Вейгерту

Окраска соединительной и мышечной тканей по данной методике широко применяется в гистологических исследованиях. У этого способа имеется ряд преимуществ по сравнению с окраской гематоксилин-эозином, поскольку окраска тканей происходит по-разному. Так, соединительная ткань после окрашивания пикрофуксином будет иметь ярко-красный цвет, а все остальные ткани — буровато-желтый или желто-зеленый. Метод Ван-Гизона позволяет отдифференцировать гладкомышечные клетки от соединительнотканых в тех случаях, когда их трудно различить на препаратах, окрашенных другими методами. В качестве ядерной окраски применяется железный гематоксилин Вейгерта, дающий черную или бурочерную окраску ядер.

Для депарафинирования срезы дважды обрабатывали ксилолом в течение 2-4 минут. Остатки ксилола удаляли погружением в спирты нисходящей концентрации: 96% - на 2-3 минуты, 70% - на 2 минуты. Промывали в дистиллированной воде. Наносили на срез 10 капель раствора йодной кислоты, выдерживали 5 минут. Поместили срезы в раствор Вейгерта и инкубировали ночь. Промывали срезы в дистиллированной воде. Наносили на срез 10 капель дифференцирующего кислотного буфера, оставили на 10 минут. После этого наносили на образец 10 капель железного гематоксилина Вейгерта 1 и добавили 5 капель железного гематоксилина Вейгерта 2, оставили на 10 мин. Подсиняли образцы в проточной воде в течение 10 мин. Затем наносили на срез 10 капель пикрофуксина по Ван-Гизону, выдерживали 7 мин. Промывали срезы в дистиллированной воде. Для обезвоживания препарат помещали в растворы с возрастающей концентрацией спирта: 70% спирт – на 5-10 секунд; 96% спирт – в течение 2 минут [7].

2.3 Подкожная имплантация экспериментальных образцов

Эксперимент проводили на 18 самцах белых беспородных крыс в возрасте 3-х месяцев массой 200-250 грамм. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище и сменой светового режима каждые 12 часов. За 24 часа до проведения оперативного вмешательства животные не получали пищи. Образцы внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки имплантировали в организм животного по методу Fishbein M. et al., 1982. Перед операцией животных в течение 7 дней содержали в виварии. Содержание животных и условия проведения экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2-2015 «Требования к обращению с животными» [10]. Перед имплантацией исследуемых образцов с операционного поля удаляли шерсть. Оперативное вмешательство проводилось в стерильных условиях, под действием эфирного наркоза. Перед тем как провести имплантацию экспериментальных образцов участок кожи в месте разреза обеззараживали 0,05 % раствором хлоргексидина, излишки антисептика удаляли стерильными салфетками. Для имплантации разрезы длиной 1 см каждый на спине животного. Подкожные карманы формировали с помощью заостренного шпателя, отделяя подкожные ткани от мышечного слоя. Образцы, размером 10x10 мм, предварительно стерилизованные окисью этилена, дополнительно промывали дистиллированной водой непосредственно перед имплантацией и помещали в образовавшуюся полость с помощью стерильного пинцета. Разрез закрывали рассасывающейся нитью кетгута, накладывая простые узелковые хирургические швы. Рану обрабатывали антисептиком и закрывали клеем медицинским БФ-6.

Были сформированы три группы животных: экспериментальная, контрольная и интактная. В каждой группе участвовало не менее 6 животных.

Интактная группа (n=6) состояла из животных, которые не подвергались оперативному вмешательству.

Контрольной группе животных (n=6) была проведена операция, но без имплантации исследуемого материала.

Животные из опытной группы (n=6) подвергались оперативному вмешательству с имплантацией экспериментальных образцов.

2.4 Методы определения биохимических показателей крови

Кровь экспериментальных животных собирали, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Для сравнения результатов в полученной сыворотке определяли активность ферментов и концентрацию веществ, рекомендованных к анализу ГОСТ Р ИСО 10993-11-2015. "Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия": аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), γ -глутамилтрансфераза (ГГТ).

Определение всех биохимических показателей проводили с использованием стандартных наборов реактивов для клинической лабораторной диагностики («Ольвексдиагностикум», Россия).

Активность аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы определяли колориметрическим методом Райтмана-Френкеля. Фермент АСТ катализирует реакцию переаминирования между L-аспартатом и α -кетоглутаровой кислотой с образованием оксалоацетата и реакцию переаминирования, но между L-аланином и α -кетоглутаровой кислотой с образованием пировиноградной кислоты. Об активности фермента судят по

образованию оксалоацетата или пирувата, образующего с 2,4-ДНФГ(2,4-динитрофенилгидразин) окрашенные гидразоны. Активность АСТ и АЛТ пропорциональна количеству образовавшихся гидразонов, которое определяется фотометрически при длине волны 537 нм [49].

Активность щелочной фосфатазы определяли методом по конечной точке. Щелочная фосфатаза (ЩФ) в щелочной среде катализирует реакцию дефосфорилирования субстрата р-нитрофенилфосфата с образованием окрашенного продукта р-нитрофенола. Количество образовавшегося р-нитрофенола устанавливают по увеличению оптической плотности реакционной среды при 405 нм и пропорционально активности щелочной фосфатазы [58].

Активность γ -глутамилтрансферазы в сыворотке крови определяли методом по конечной точке. Метод основан на способности гамма-ГТ переносить γ -глутамиловую группу синтетического субстрата L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида на акцептор глицил-глицин, что сопровождается высвобождением в инкубационную среду 5-амино-2-нитробензоата. Активность фермента прямо пропорциональна количеству образовавшегося 5-амино-2-нитробензоата в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм[58].

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 $p < 0,05$ [13].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты получения экспериментальных образцов разными способами децеллюляризации

Для получения биосовместимого материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи в первую очередь было необходимо подобрать режимы обработок сырья ксеногенного происхождения с целью удаления клеток и их компонентов. После проведения различных вариантов обработки с помощью гистологических техник определяли следующие параметры: наличие клеток в поле зрения, состояние коллагеновых и эластиновых волокон. Критерием выбора обработки являлось полное удаление клеток и отсутствие поврежденных коллагеновых и эластиновых волокон. Для определения этих параметров использовали стандартные гистологические техники окраски образцов: окраска гематоксилин-эозином и окраска по Ван-Гизону-Вейгерту.

3.1.1 Результаты ферментативной обработки

Наиболее часто для обработки тканей, как и в нашем случае, используется трипсин, относящийся к классу сериновых протеиназ, воздействующий ещё и на коллагены, что вызывает более выраженное снижение механической прочности ткани, чем децеллюляризация с помощью других методов. С другой стороны, он оказывает значительно меньшее влияние на гликозаминогликаны. Еще один вариант применения трипсина – для первичного «вскрытия» ткани, что облегчает процесс прохождения внутрь других децеллюляризирующих агентов и положительно влияет на конечный результат обработки.

Результаты разных режимов ферментативной обработки представлены в таблицах 2– 4.

Таблица 2 – Влияние активности фермента на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
3 ПЕ			20		0				0			
5 ПЕ		12			0				0			
8 ПЕ	4				0				0			
10 ПЕ	0				0				0			
15 ПЕ	0					4			0			
20 ПЕ	0						12			3		
25 ПЕ	0							28			8	

При ферментативной обработке материала ксеногенного происхождения оптимальным значением активности фермента (трипсина) в растворе является 10 ПЕ. Снижение активности фермента приводит к неполному удалению клеток, а её повышение вызывает повреждение волокон коллагена и эластина, что делает данный способ децеллюляризации недопустимым.

Таблица 3 – Влияние температуры при ферментации на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишке

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
20°C		10			0				0			
37°C	0				0				0			
50°C		14			0				0			

Исследования показали, что при ферментативной обработке увеличение и снижение температуры приводит к неполному удалению клеток. Температурный оптимум фермента составляет 37°C. Повреждений коллагеновых и эластических волокон не наблюдается.

Таблица – 4. Влияние времени экспозиции в растворе на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишке

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
20 минут		7			0				0			
30 минут	3				0				0			
40 минут	0				0				0			
50 минут	0					5				3		
60 минут	0						9				7	

Исследования показали, что при ферментативной обработке наиболее эффективным временем выдержки материала в растворе является 40 минут, т.к. при меньшем времени экспозиции клетки удаляются не полностью, а увеличение времени экспозиции приводит к частичному повреждению коллагеновых и эластических волокон.

3.1.2 Результаты щелочной обработки

Результаты щелочной обработки представлены в таблицах 5– 7.

Таблица 5 – Влияние концентрации щелочи на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
0,1 М			20		0				0			
0,5 М		12			0				0			
1 М	0				0				0			
1,5 М	0					3			0			
2 М	0						10				6	
2,5М	0							18			12	

Оптимальное значение концентрации щелочи 1 М раствор. При снижении концентрации раствора не происходит полного удаления клеток, при повышении - в поле зрения клеток нет, но повреждаются коллагеновые и эластические волокна, что делает данный вид обработки неприемлемым.

Таблица 6 – Влияние температуры при щелочной обработке на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
20°C	0				0				0			
37°C	0						6			3		
50°C	0						14				8	

Оптимальное значение температуры в данном виде обработки - 20°C, наличия клеток не наблюдается, повреждение коллагеновых и эластических волокон отсутствует. При повышении температуры усиливается гидролиз из-за чего нарушаются волокна коллагена и эластина и, следовательно, физико-химические свойства материала уменьшаются.

Таблица 7 – Влияние времени экспозиции в растворе на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
10 минут		12			0				0			
20 минут	4				0				0			
30 минут	0				0				0			

Таблица 7 (продолжение)

40 минут	0					3				2		
50 минут	0						12				10	

Исследования показали, что при щелочной обработке наилучшие результаты были достигнуты при выдерживании материала в щелочном растворе в течение 30 минут, т.к. меньшее время экспозиции не даёт полного удаления клеток, поскольку клеточные компоненты не разрушаются до конца, а увеличение времени экспозиции приводит к частичному повреждению коллагеновых и эластических волокон.

3.1.3 Результаты солевой обработки

Результаты солевой обработки представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Влияние количества циклов смены растворов на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
1 цикл				35	0				0			
2 цикл			28		0				0			
3 цикл		14			0				0			
4 цикл	5				0				0			
5 цикл	0				0				0			
6 цикл	0				0				0			

В данном случае на качество обработки оказывает влияние не время экспозиции и температура, а количество циклов смены растворов. Полное

отсутствие клеток и сохранность волокон наблюдаются при пятикратной и шестикратной смене гипертонического и гипотонического раствора.

3.1.4 Результаты детергентной обработки

Результаты детергентной обработки представлены в таблицах 9– 11.

Таблица 9 – Влияние концентрации детергента на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)				
	%	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
0,4%			24		0					0			
0,6%		11			0					0			
0,8%	4				0					0			
1%	0				0					0			
2%	0					5				0			
3%	0						9				4		
4%	0							22				9	

Оптимальное значение концентрации раствора детергента составило 1%. При понижении концентрации раствора полного удаления клеток не происходит, при повышении – в поле зрения клеток не наблюдается, но повреждаются коллагеновые и эластические волокна, что делает данный вид обработки неприемлимым.

Таблица 10 – Влияние температуры при детергентной обработке на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
20°C	0				0				0			
37°C	0					4				3		
50°C	0						10				7	

Оптимальное значение температуры в данном виде обработке 20°C, наличия клеток не наблюдается, повреждение коллагеновых и эластических волокон отсутствует. При повышении температуры происходит разрушение коллагеново-эластической структуры матрикса.

Таблица 11 – Влияние времени экспозиции в растворе на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

№ обработки	Наличие клеток (количество в поле зрения)				Состояние коллагеновых волокон (поврежденные волокна, %)				Состояние эластических волокон (поврежденные волокна, %)			
	0-5	5-15	15-30	>30	0	0-5	6-15	> 15	0	0-5	6-15	>15
20 минут		12			0				0			
40 минут	4				0				0			

Таблица 11(продолжение)

60 минут	0				0				0			
80 минут	0						7			3		
100 минут	0						10				6	

Исследования показали, что при данном режиме обработки наилучшие результаты достигнуты при выдерживании материала в растворе в течение 60 минут, т.к. меньшее время экспозиции не даёт полного удаления клеток, поскольку клеточные компоненты не разрушаются до конца, а увеличение времени экспозиции приводит к частичному повреждению коллагеновых и эластических волокон.

3.2 Гистологическое исследование образцов

Результатом всех видов обработок являлось получение внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Результаты гистологического исследования образцов внеклеточного коллагенового матрикса представлены на рисунках 1- 3.

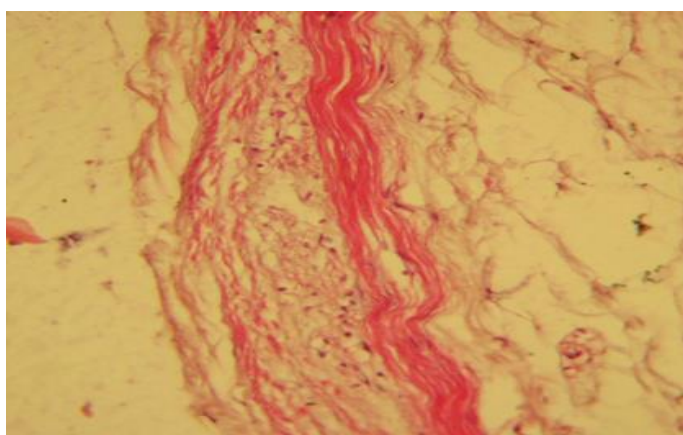


Рисунок 1. Образец внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи до обработки. Окраска гематоксилин-эозином, x200

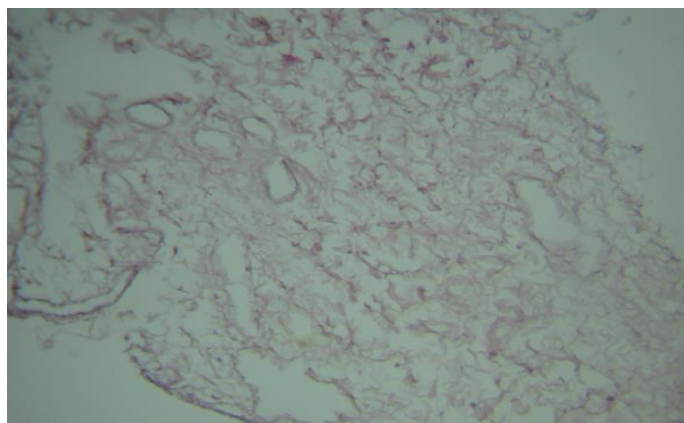


Рисунок 2. Образец внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи после обработки. Окраска гематоксилин-эозином, x200

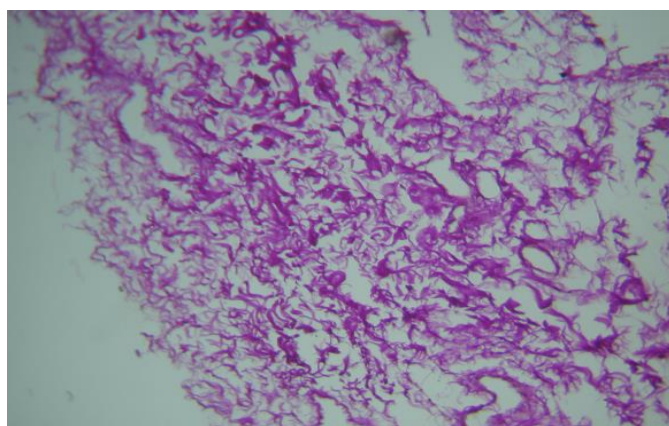


Рисунок 3. Образец внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи после обработки. Окраска по Вейгерт - Ван- Гизону, x200

При проведении гистологического исследования было установлено:

- при окрашивании образцов гематоксилин-эозином клеточных элементов после обработок не наблюдается (рис.1, Б);
- при окрашивании образцов по методу Вейгерт-Ван-Гизона была выявлена сохранность коллагеновых и эластических волокон после обработок (рис.1, В). Полученный материал представляет собой матрикс на основе подслизистой тонкой кишки, лишенный клеточных элементов.

Уникальные свойства внеклеточного матрикса определяются содержанием специфических белков. Коллаген – наиболее часто встречаемый полипептид в составе ВКМ, и, несмотря на то, что на сегодняшний день описано свыше 20 типов коллагена, во внеклеточном матриксе присутствует только коллаген I, III, IV, VI и VII типов [12]. Коллаген I типа обладает достаточно прочной структурой, что легло в основу его использования при создании матрикса. Иной тип коллагена - коллаген VI типа - необходим для проявления механических и физических свойств или поддержания гелеобразной консистенции ВКМ. Следовательно, внеклеточный коллагеновый матрикс является источником нескольких типов коллагена, способных обеспечить надлежащую среду для реконструкции тканей.

Помимо фибриллярных белков в составе ВКМ обнаружены и другие компоненты, которые во многом определяют биологические свойства полученного материала.

Эластин — главный протеин эластических волокон, которые в больших количествах присутствуют в межклеточном веществе кожи, стенках кровеносных сосудов, связках, лёгких. Эти ткани могут растягиваться в несколько раз по сравнению с исходной длиной, сохраняя при этом высокую прочность на разрыв, и возвращаться в первоначальное состояние после снятия нагрузки. В составе эластина преобладают такие аминокислоты как: глицин, валин, аланин, пролин и лизин. Наличие большого количества гидрофобных радикалов препятствует созданию стабильной глобулы, в результате чего полипептидные цепи эластина не способны формировать регулярные вторичную и третичную структуры, принимая разные конформации с примерно равной свободной энергией. В межклеточном пространстве молекулы эластина образуют волокна и слои, в которых отдельные пептидные цепи соединены множеством прочных поперечных сшивок в разветвлённую сеть, называемых десмозинами. Наличие

ковалентных сшивок между пептидными цепями с неупорядоченной конформацией позволяет всей сети эластических волокон растягиваться и сжиматься в разных направлениях, придавая соответствующим тканям свойство эластичности.

Фибронектин. Чаще всего встречается в подслизистых структурах и базальных мембранах тканей. Он обладает способностью к связыванию коллагена, протеогликанов, гиалуроновой кислоты, углеводов плазмалеммы, гепарина, фермента трансклутаминазы. Благодаря особенностям строения фибронектин может выполнять интегрирующую функцию в организации межклеточного вещества, способствовать клеточной адгезии и использоваться в качестве белкового покрытия в синтетическом каркасном материале. Аналогично можно охарактеризовать и другой адгезивный белок, присутствующий в составе внеклеточного матрикса, - ламинин [22].

Гликозаминогликаны и протеогликаны. Гликозаминогликаны(ГАГ) — линейные отрицательно заряженные гетерополисахариды. Они могут связывать большое количество воды, что обеспечивает желеобразный характер у межклеточного вещества. Протеогликаны - высокомолекулярные соединения, состоящие из гликозаминогликанов (90-95%) и белка (5-10%). Они образуют основное вещество межклеточного матрикса соединительной ткани и могут составлять до 30% сухой массы ткани. Среди функций данных соединений можно выделить участие во межклеточных взаимодействиях, формировании и поддержании формы клеток, образовании каркаса при формировании тканей. препятствование распространению болезнетворных микроорганизмов.

- Фактор роста эндотелия (ФРЭ) - гликопротеин, связывающийся только с клетками эндотелия сосудов и стимулирующий их пролиферацию.

Вызывает расширение кровеносных сосудов, что очень важно для поддержания кровотока в тканях при воспалении.

- Фактор роста фибробластов (ФРФ) - семейство полипептидов, представленное девятью белками. Принимает участие в росте и дифференцировке фибробластов при образовании фиброзной капсулы вокруг очага воспаления.
- Фактор роста тромбоцитов (ФРТ) влияет на многие клетки. Индуцирует синтез щелочной фосфатазы и протеогликанов в одонтобластических клетках зубной пульпы и костной ткани.

3. 3 Изучение влияния подкожной имплантации образцов внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи на биохимические параметры сыворотки крови крыс

В рамках данного исследования был проведён анализ биохимических параметров сыворотки крови крыс: аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, глутамилтрансферазы и щелочной фосфатазы.

3.3.1 Влияние подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса на активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови крыс

Результаты определения активности АЛТ в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель представлены на рисунке 4.

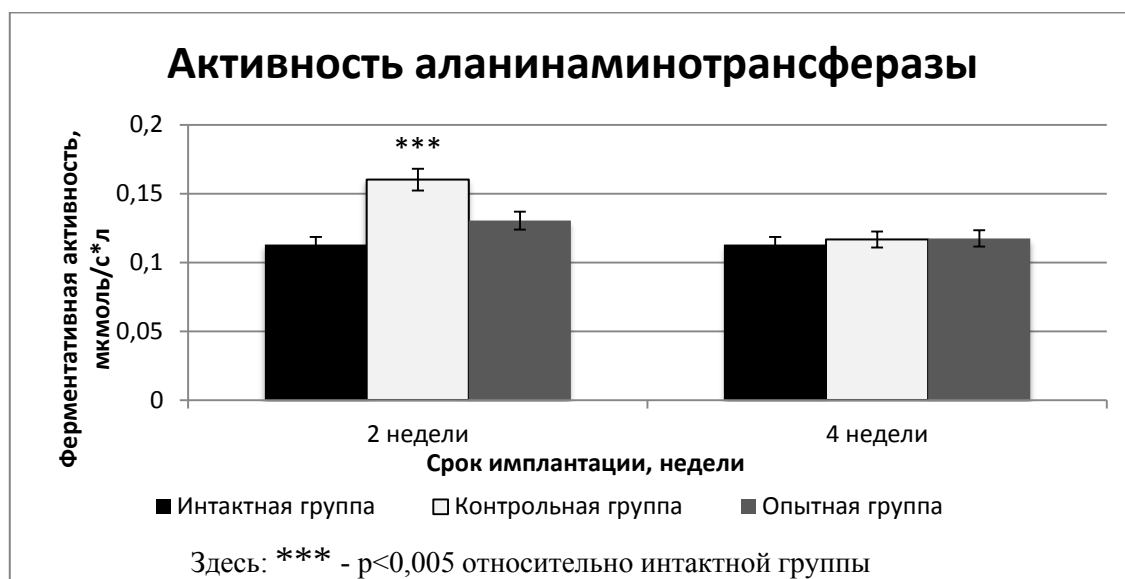


*Рисунок 4. Активность аланинаминотрансферазы после декапитации по истечении 2 и 4 недель (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно интактной группы)*

Важным показателем является повышение активности АЛТ в сыворотке крови крыс контрольной группы через 2 недели после проведения оперативного вмешательства. Активность исследуемого фермента увеличилась в 1,4 раза относительно интактной группы. Через 4 недели активность фермента в сыворотке крови крыс контрольной и опытной групп не изменялась.

Изменение активности АЛТ, вероятно, является результатом оперативного вмешательства, которое может оказывать стрессорное воздействие на организм.

За счет преимущественного расположения АЛТ в цитозоле печени его повышение считают более специфичным для заболеваний печени. Но при повреждении или разрушении клеток, богатых АЛТ, происходит выброс этого фермента в кровяное русло, что приводит к повышению активности его в крови.

3.3.2 Влияние подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса на активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови крыс

На рисунке 5 представлены результаты определения активности АСТ в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

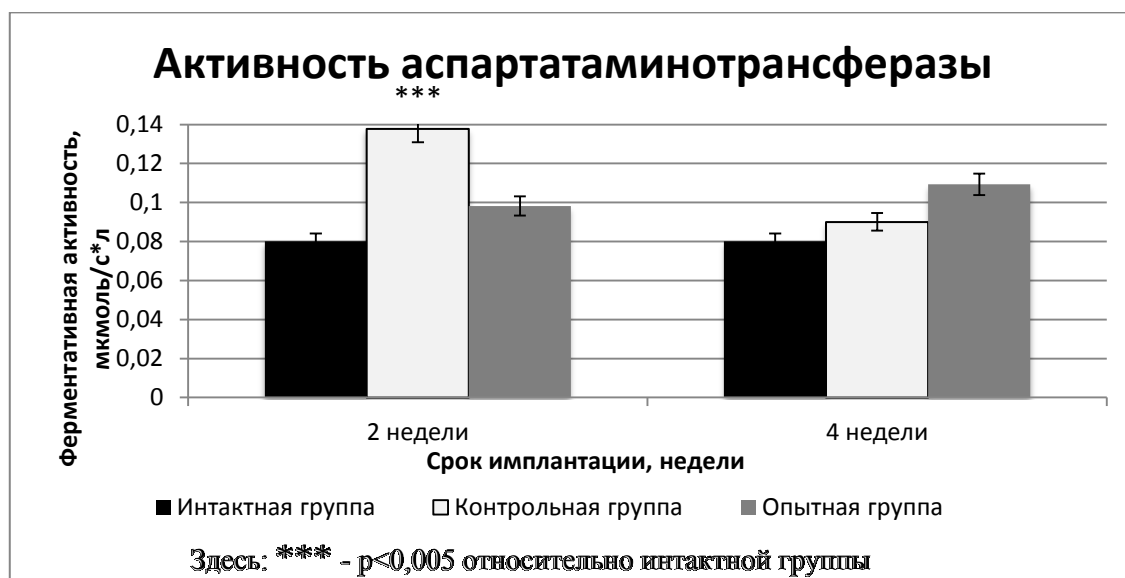


Рисунок 5. Активность аспартатаминотрансферазы после декапитации по истечении 2 и 4 недель (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p<0,005$ относительно интактной группы)

Нами было установлено, что через 2 недели после операции наблюдалось достоверное увеличение активности АСТ в сыворотке крови контрольной группы в 1,72 раза относительно интактной. По истечении 4 - недельного срока активность исследуемого фермента не изменялась.

По-видимому, наблюдаемое увеличение активности АСТ может быть обусловлено оперативным вмешательством, которое вызывает изменения нейроэндокринного, метаболического и воспалительного характера.

3.3.3 Влияние подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса на активность глутамилтрансферазы в сыворотке крови крыс

На рисунке 6 представлены результаты определения активности гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

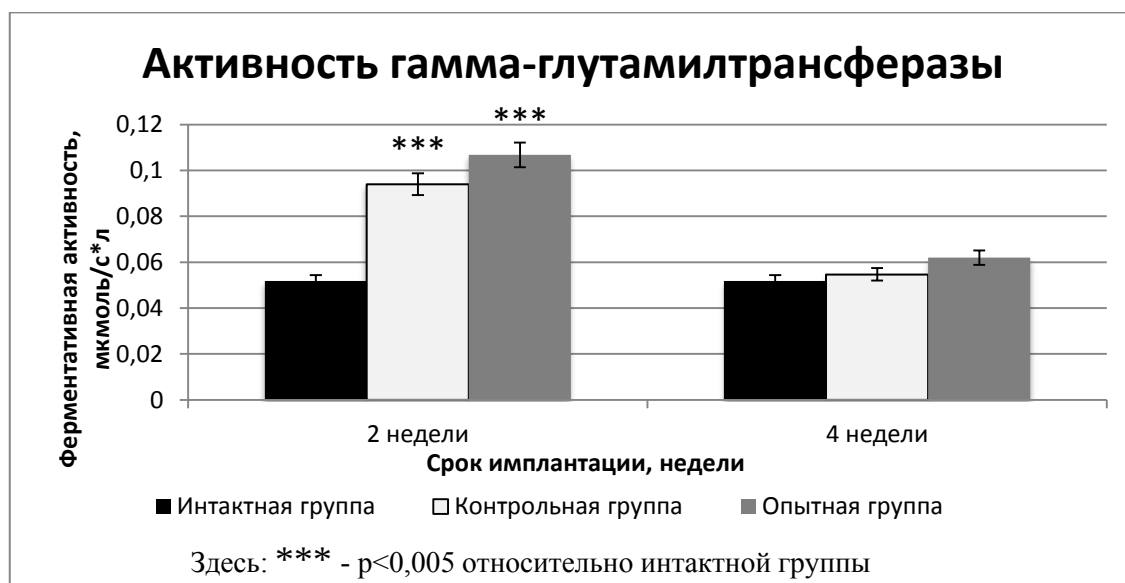


Рисунок 6. Активность гамма-глутамилтрансферазы после декапитации по истечении 2 и 4 недель имплантации образцов (мкмоль/с*л, $M \pm t$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно интактной группы)

Согласно полученным данным, наблюдается увеличение активности гамма-глутамилтрансферазы через 2 недели после произведенной операции. Активность исследуемого фермента контрольной группы увеличивается в 1,88 раза, активность ГГТ опытной группы в 2,07 раза, по сравнению с животными интактной группы. Увеличение активности фермента, по-видимому, вызвано активацией гипоталамо-гипофизарной оси, вследствие стрессорного воздействия, которое заключалось в оперативном вмешательстве.

Нормализация активности исследуемого фермента в сыворотке крови крыс опытной и контрольной группы свидетельствует об отсутствии токсического действия имплантируемого материала.

3.3.4 Влияние подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса на активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс

На рисунке 7 представлены результаты определения активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс интактной, контрольной и опытной групп после декапитации по истечении 2 и 4 недель.

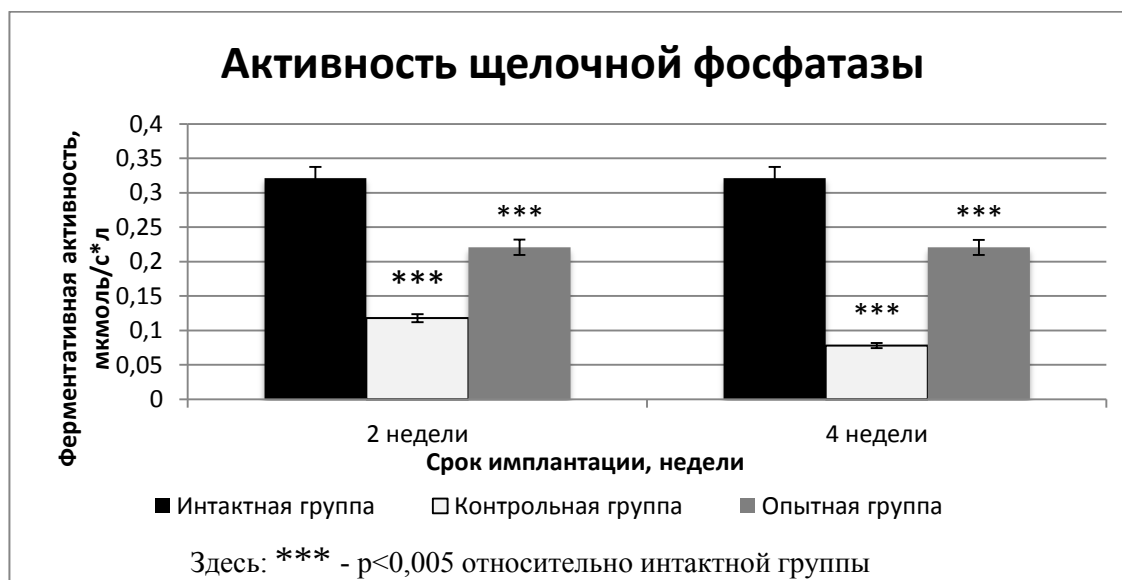


Рисунок 7. Активность щелочной фосфатазы после декапитации по истечении 2 и 4 недель (мкмоль/с*л, $M \pm m$, $n=6$, Здесь: *** - $p < 0,005$ относительно интактной группы)

Установлено, что по истечении 2 и 4 недель активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс контрольной группы уменьшалась в 2,7 раза и в 4,12 раза соответственно. В опытной группе было отмечено снижение активности через 2 и 4 недели после операции в 1,4 раза относительно интактной группы.

Наблюдаемые изменения активности щелочной фосфатазы по истечении 2-недельного срока, по-видимому, являются следствием оперативного вмешательства, которое оказывает стрессорное воздействие.

Известно, что повышение активности щелочной фосфатазы может свидетельствовать о поражениях печени. Тот факт, что по истечении 4-недельного срока определяемый показатель не превышал нормального значения, вероятно, говорит о том, что подкожная имплантация бесклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи не оказывает токсического действия на организм животного.

ВЫВОДЫ

1. Были подобраны режимы децеллюляризации биоматериала при помощи растворов фермента, щелочи, соли и детергента, в результате которых получен внеклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

2. Гистологическое исследование показало, что во всех экспериментальных образцах наличия клеток не обнаружено, волокна коллагена и эластина сохранены.

3. Отмечено отсутствие повышения активности ферментов: аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы в сыворотке крови контрольной и опытной групп по сравнению с интактной на четвёртой неделе после проведения операции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агапова, О.И. Сканирующая зондовая нанотомография для исследования 3D структуры матриц для тканевой инженерии и регенеративной медицины: диссертация ... кандидата биологических наук / О.И. Агапова. – Москва, 2015. – 121 с.
2. Архипова, А.Ю. Биорезорбируемые скаффолды на основе фиброина шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины диссертация ... кандидата биологических наук / А.Ю. Архипова. – Москва, 2016. – 158 с.
3. Базылев, В.В. Применение ксеноперикардальной заплаты «Кардиоплант» при реконструкции корня аорты по методике Nicks-Nunez / В.В. Базылев, Е.В. Немченко, В.А. Карнахин, А.С. Коциенко // Инновационные имплантаты в хирургии: сб. тр. Ч. 3. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2014 – С. 84 - 91.
4. Березин, И.В. Имобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов, К. Мартинек. – М.: «Высшая школа», 1987. – 159 с.
5. Боброва, М.М. Децеллюляризация ткани печени как перспективная технология получения пористого матрикса для тканевой инженерии и регенеративной медицины / М.М. Боброва, Л.А. Сафонова, О.И. Агапова, М.Е. Крашенинников, М.Ю. Шагидулин, И.И. Агапов // Современные технологии в медицине. – 2015. – т.7, №4. – С. 6-13.
6. Варфоломеев, С.Д. Химическая энзимология / С.Д. Варфоломеев. – М.: «Академия», 2005. – 468 с.
7. Венедиктов, А.А. Разработка биоматериалов для реконструктивной хирургии на основе ксеноперикардальной ткани: диссертация ... кандидата медицинских наук / А.А. Венедиктов. – Москва, 2014. – 126 с.

8. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : электрон.учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 261 с.
9. Гамзин, С.С. Сравнительное исследование биомеханических свойств говяжьего ксеноперикарда после различных обработок / С.С. Гамзин, А.Д. Кручинина, А.А. Венедиктов, М.Т. Генгин // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. – Пенза, Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского, 2012. – №29. – С.25-28.
10. ГОСТР ИСО 10993-2-2011 "Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными".
11. Готье, С.В. Трансплантология и искусственные органы / С.В. Готье. – М.: «Лаборатория знаний», 2018. – 314 с.
12. Дорошенко, И.А. Влияние сшивающих агентов на набухание поливинилового спирта в воде / И.А. Дорошенко, И.С. Алексеев // Вестник Витебского государственного технологического университета. – Витебск, 2014. – №27. – С. 136 – 140.
13. Ерошевская, В.И. Математическая статистика /В.И. Ерошевская, Е.Л. Ерошевская, Л.П. Минченкова. – Минск: Белорусский национальный технический университет, 2014. – Ч.2– 75 с.
14. Иванов, А.С. Ксенопластика в реконструктивной хирургии сердца и сосудов / А.С. Иванов, В.А. Иванов, Г.М. Балоян, Е.П. Евсеев, А.Б. Шехтер, З.П. Милованова // Биопротезы в сердечно-сосудистой хирургии. – Кемерово, 2001. — С.41-43.
15. Кузнецов, С.С. Многофотонная микроскопия в изучении морфологических особенностей радиационно-индуцированных повреждений мочевого пузыря / С.С. Кузнецов, В.В. Дуденкова, М.В. Кочуева, Е.Б. Киселева, Н.Ю. Игнатьева, О.Л. Захаркина, Е.А. Сергеева, К.В. Бабак, А.В.

Масленникова // Современные технологии в медицине. – Нижний Новгород, ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2016 – т. 8, № 2. – С. 31- 39.

16. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – Спб.: «СпецЛит», 2010. – 95 с.

17. Лысая, Я.П. Разработка датчика для мониторинга температуры процесса лиофилизации биологического материала / Я.П. Лысая, В.С. Тындык // Биомедицинская инженерия и электроника. – Херсон, 2014. – №3. – С. 33 - 41.

18. Марычев, С.Н. Полимеры в медицине / С.Н. Марычев, Б.А. Калинин и др. – Владимир: Владимирский государственный университет, 2001. – 68 с.

19. Митрошин, А.Н. Возможности реконструкции сухожилий сгибателей пальцев кисти биологическим материалом / А.Н. Митрошин, С.В. Сиваконь, У.В. Баулина // Сборник трудов XVII межрегиональной научно-практической конференции памяти Н.Н. Бурденко. – Пенза, 2010 – С.223-224.

20. Севастьянов, В. И. Биосовместимые материалы/ В. И. Севастьянов, М. Т. Кирпичникова. – М.: «МИА», 2011. – 544 с.

21. Северин, Е.С. Биохимия / Е.С. Северин. – М.: «ГЭОТАР-МЕД», 2003. – 779 с.

22. Семенов, А.И. Зарубежные промышленные полимерные материалы и их компоненты. Толковый словарь-справочник / А.И. Семенов, К.К. Полякова. –М.: – Изд-во Акад. наук СССР, 1963. – 430 с.

23. Хрыщанович, В.Я. Ксеногенная клеточная терапия: современное состояние проблемы и перспективы свиной клеточной трансплантации / В.Я.

Хрыщанович, С.И. Третьяк, А.А. Глинник // Журнал гродненского государственного медицинского университета. –2012. – №37 – С. 14-23.

24. Шехтер, А.Б. Тканевая реакция на имплантат/ А.Б. Шехтер, И.Б. Розанова // Биосовместимость. – М.: ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. – С. 174–211.

25. Шехтер, А. Б. Технология получения и структурные особенности коллагеновых децеллюляризованных коллагенсодержащих матриц для тканевой инженерии в урологии /А.Б.Шехтер, А.Е. Гуллер, Л. П. Истранов, Е.В. Истранова, А. З. Винаров, Д. В. Бутнару, и др.// Архив патологии. – М.: «Медиа Сфера» 2015. – № 6 – С.29- 38.

26. Яблонский, П.П. Децеллюляризованные матрицы митрального клапана и направленная регенерация тканей в биологической модели: диссертация ... кандидата медицинских / П.П Яблонский. – Санкт-Петербург, 2016.– 102 с.

27. Alhusein, N. Electrospun matrices for localised controlled drug delivery: release of tetracycline hydrochloride from layers of polycaprolactone and poly(ethylene-co-vinyl acetate)/N.Alhusein, I.S.Blagbrough,P.A. De Bank // Drug Delivery and Translational Research. – 2012. – Vol. 2(6). – P. 477-488.

28. Amoore, L. Governance, risk and dataveillance in the war on terror' / L. Amoore, M. De Goede // Crime Law Soc Change. – 2005. – Vol.43 (2-3). –P. 149-173.

29. Andrew, J. From Nano to Macro: Studying the Hierarchical Structure of the Corneal Extracellular Matrix Exp Eye Res / J. Andrew, Quantock, Moritz Winkler, Geraint J. Parfitt, Robert D. Young, Donald J. Brown, Craig Boote, James V. Jester // Department of Ophthalmology and Biomedical Engineering, University of California. – 2015. – Vol.133. – P. 81-99.

30. Badylak S.F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction / S. F. Badylak // Seminars in Cell and Developmental Biology. – 2002. c Vol.13(5).– P. 77-83.

31. Badylak S. F. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model / S. F. Badylak, S. Meurling, M. Chen, A. Spievack, A. Simmons-Byrd // *Journal of Pediatric Surgery*. – 2000. – Vol. 35. № 7. – P. 1097–1103.
32. Bessey, O. A. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic milliliters of serum / O. A. Bessey, O. H. Lowry, M. J. Brock // *J. biol. Chem.* – 1941. – Vol. 164. – P. 321-329.
33. Cartmill, B.T. How do absorbable sutures absorb? A prospective double-blind randomized clinical study of tissue reaction to polyglactin 910 sutures in human skin / B.T. Cartmill, D.M. Parham, P.W. Strike, L. Griffiths, B. Parkin // *Orbit*. – 2014. – Vol. 33(6). – P. 437- 443.
34. Courtman, D.W. The development of pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical influences cell production / D. W. Courtman, C.A. Pereira, B. Kashef // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1994. – Vol.28. – P. 655-666.
35. Dyson, R.W. *Specialty Polymers* / R.W. Dyson. – NY: Chapman and Hall, 1987. – 414 p.
36. Faezeh Koohestani Extracellular Matrix Collagen Alters Cell Proliferation and Cell Cycle Progression of Human Uterine Leiomyoma Smooth Muscle Cells / Faezeh Koohestani, Andrea G. Braundmeier, Arash Mahdian, Jane Seo, JiaJia Bi, Romana A. Nowak, *PloS one*. – 2013. – Vol.8. – P. 51-54.
37. Guo, S.Z. Properties of polylactide inks for solvent-cast printing of three-dimensional freeform microstructures / S.Z. Guo, M.C. Heuzey, D. Therriault D. // *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. – 2014. – Vol. 30(4). – P. 1142-1150.
38. Hauschka, S.D. The influence of collagen on the development of muscle clones / S.D. Hauschka, I.R. Konigsberg // *Proceedings of the National Academy of Science*. – 1966. – Vol. 55(1). – P.119-126.
39. Hrebikova, H. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix/ H. Hrebikova, D. Diaz, J Mokry // *Biomedical*

papers of the Medical Faculty of the University Palacky. – 2013. –Vol. 159(1). – P. 12-17.

40. Huang, Z. Effects of dimethylolpropionic acid modification on the characteristics of polyethylene terephthalate fibers / Z. Huang, L. Bi, Z. Zhang, Y. Han // Molecular medicine reports.– 2012. – Vol. 6, (4). – P. 709-715.

41. Jennings, T. A. Lyophilization: introduction and basic principles// Englewood. CO :Interpharm Press. – 1999. – P. 624.

42. Kershen, R.T.Beyond collagen: injectable therapies for the treatment of female stress urinary incontinence in the new millennium / R.T. Kershen, R.R. Dmochowski, R.A. Appel // Journal of Urology. – 2002.– Vol. 29. –P.559-574.

43. Lowe, A.B. Graft Copolymerization of N,N-Dimethylacrylamide to Cellulose in Homogeneous Media Using Atom Transfer Radical Polymerization for Hemocompatibility // A.B. Lowe, M.S. Donovan, T.A. Sanford, B.S. Sumerlin, Y. Mitsukami, C.L. McCormick // Journal of Biomedical Science and Engineering. – 2002. – Vol.35. – P. 4570-4572.

44. Lonys, L.Silicone rubber encapsulation for an endoscopically implantable gastrostimulator / L. Lonys, A. Vanhoestenbergh, N. Julemont, S. Godet, M. – P. Delplancke, P. Mathys, A. Nonclercq // Medical and Biological Engineering and Computing. –2015. – Vol. 53 (4). – P. 319-329.

45. Ma, Z. Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering / Z. Ma, M. Kotaki, T. Yong, S Ramakrishna// Biomaterials. – 2005. – Vol. 26 (15). – P. 2527-2536.

46. Mallick, B. Analysis of strain-induced crystallinity in neutron-irradiated amorphous PET fiber/ B. Mallick // Applied Physics A. – 2015. – Vol. 119 (2). – P. 653-657.

47. Makarawo, T.P. Polylactidebioabsorbable struts for chest wall reconstruction in a pediatric patient / T.P. Makarawo, R.A. Reynolds, M.L. Cullen // *The Annals of thoracic surgery*. – 2015. – Vol. 99(2). – P. 689-691.
48. Mel, A. A potential platform for developing 3D tubular scaffolds for paediatric organ development/ A. Mel, T. Yap, G. Cittadella, L. Hale, P. Maghsoudlou, P. de Coppi, M. Birchall, A. Seifalian // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2015. – Vol. 26(3). – P. 1-8.
49. Perniconi, B. The pro-myogenic environment provided by whole organ-scale acellular scaffolds from skeletal muscle/ B. Perniconi, A. Costa, P. Aulino, P. Teodori, S. Adamo, D. Coletti// *Biomaterials*. – 2011. –Vol. 32(31). – P.7870-7882.
50. Pihlajamaki, H. The impact of polyglycolide membrane on a tendon after surgical rejoining. A histological and histomorphometric analysis in rabbits/ H. Pihlajamaki, O. Tynninen, P. Karjalainen, P. Rokkanen// *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2007. – Vol. 81(4). – P. 987-993.
51. Reitman, S. A. Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases/ S. Reitman, S. Frankel// *American Journal of Clinical Pathology*. –1957. –Vol.28. – P. 56-63.
52. Rowe, T.W.G. Freeze-drying of biological materials: some physical and engineering aspects// *Current Trends in Cryobiology*. – 1970 – P. 61-138.
53. Sevastianov, V.I. The Functional Effectiveness of a Cell-Engineered Construct for the Regeneration of Articular Cartilage / V.I. Sevastianov, G.A. Dukhina, A.M. Grigoriev, N.V. Perova, L.A. Kirsanova, N.N. Skaletskiy, D.G.Akhaladze, S.V. Gautier // *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. – 2015. – Vol. 1. – P. 86-92.
54. Schwarzbauer J. E. Fibronectin: from gene to protein / J.E. Schwarzbauer // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1991. – Vol. 3(5). – P.786-791.

55. Shen, Z.Q. Comparison of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends as carbon source for biological denitrification/ Z.Q. Shen, J. Hu, J.L. Wang, Y.X. Zhou// International Journal of Environmental Science and Technology. – 2014. – Vol. 12 (4). – P. 1235-1242.
56. Srisuwan, Y. Preparation of Silk Fibroin Microspheres and Its Application to Protein Adsorption/ Y. Srisuwan, P. Srihanam, Y. Baimark// Journal of Macromolecular Science. – 2009. – Vol. 46 (5). – P. 521-525.
57. Stevens, M.P. Polymer Chemistry: An Introduction / M.P. Stevens. NY: Oxford University Press, 1999. – 255 p.
58. Surguchenko, V.A. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (in vitro study) / V.A. Surguchenko, A.S. Ponomareva, L.A. Kirsanova, N.N. Skaleckij, V.I. Sevastianov// Journal of biomedical materials research. Part A. – 2015. – Vol.103(2). – P. 463-470.
59. Surovikin, Y.V. Synthesis and properties of a new generation of carbon materials from the Sibunit family modified with silicon compounds / Y. V. Surovikin, V.A. Likholobov// Solid Fuel Chemistry. – 2014. – Vol. 48 (6). – P. 335-348.
60. Swinehart I.T. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis / I.T. Swinehart, S.F. Badylak // Developmental Dynamics. – 2016. – Vol.245(3). – P.351-360.
61. Szasz, G. New substrates for measuring gamma-glutamyltranspeptidase activity/ G. Szasz, J. P. Persijn, et al.// Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. – 1974. –Vol. 12. –P. 228.
62. Vanderrest M. Collagen family of proteins / M. Vanderrest, R. Garrone// The FASEB Journal. – 1991. – Vol.5(13). – P. 2814-2823.
63. Water, J.J. Three-dimensional printing of drug-eluting implants: preparation of an antimicrobial polylactide feedstock material/ J.J. Water, A. Bohr,

J. Boetker, J. Aho, N. Sandler, H.M. Nielsen, J. Rantanen // Journal of pharmaceutical sciences. – 2015. – Vol. 104(3). – P. 1099-1107.

64. Xu, Z. Thermal behavior of poly (ethylene terephthalate)/SiO₂/TiO₂ nano composites prepared via in situ polymerization/ Z. Xu, J. Zhu, X.Liao, H. Ni // Journal of the Iranian Chemical Society. – 2014. – Vol. 12 (5). – P. 765-770.

65. Ye, J-S. An approach to preparing decellularized whole liver organ scaffold in rat / J-S. Ye, J. Stoltz, N. de Isla, Y. Liu, Y.Yin, L. Zhang // Journal of Biomedical Materials. – 2015. – Vol. 25(1). – P. 159–166.

66. Yodthong, B. Effect of Methanol Treatment on Regenerated Silk Fibroin Microparticles Prepared by the Emulsification-Diffusion Technique / B. Yodthong, S. Srihanam // Journal of Applied Sciences. – 2009. –Vol.9. – P. 3876-3881.

67. Zhu, Y. Non-isothermal crystallization behavior of compatibilized polypropylene/recycled polyethylene terephthalate blends / Y. Zhu, C. Liang, Y. Bo, S. Xu // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. – 2014. – Vol. 119 (3). – P. 2005-2013.

68. Zhu, G.C. Experimental study on the construction of small three-dimensional tissue engineered grafts of electrospun poly-epsilon-caprolactone / G.C. Zhu, Y.Q. Gu, X. Geng, Z. G. Feng, S.W. Zhang, L.Ye, Z.G. Wang // Journal of materials science. Materials in medicine. – 2015. –Vol. 26 (2). –P. 112-116.

69. Zolotareva, N. Microchannel Thermocured Silicone Rubber / N. Zolotareva, V. Semenov// Silicon. – 2014. – Vol. 7(2). – P. 89-93.

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
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
Карпова Г.А. Карпова
« 01 » 11 2017 г.

Задание

По ВКР студента Филатовой Марии Александровны

Тема работы: «Оценка эффективности различных способов
децеллюляризации биоматериала».

Утверждена приказом по Университету от « 31 » 10 2017 г. № 10969/6

Срок сдачи студентом законченной работы « 25 » 11 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	ноябрь 2017	выполнено
2.	Поиск научной, справочной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	ноябрь - декабрь 2017	выполнено
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	ноябрь - декабрь 2017	выполнено
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР	декабрь 2017	выполнено
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	ноябрь - декабрь 2017	выполнено
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	декабрь 2017	выполнено
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка экспериментальных образцов	январь 2018 - март 2017	выполнено
8.	Подборка режимов обработки биоматериала	январь - март 2018	выполнено
9.	Проведение децеллюляризации различными методиками	январь - март 2018	выполнено
10.	Проведение гистологического исследования полученного материала	январь - март 2018	выполнено
11.	Проведение подкожной имплантации экспериментальных образцов	январь - март 2018	выполнено
12.	Обработка и анализ полученных результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	январь - март 2018	выполнено
13.	Оформление результатов исследования в виде графиков	январь - март 2018	выполнено
14.	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	январь - март 2018	выполнено
15.	Итоговое оформление ВКР	апрель - май 2018	выполнено
16.	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	май 2018	выполнено

Дата выдачи задания « 01 » 11 201 г.

Руководитель Ильин / А.Д. КручининаЗадание принял к исполнению Ильин