

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:

**«ИЗУЧЕНИЕ КАЛЬЦИФИКАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО
КОЛЛАГЕНОВОГО МАТРИКСА, ПОЛУЧЕННОГО РАЗЛИЧНЫМИ
СПОСОБАМИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ»**

Студент Миронова Миронова Екатерина Сергеевна

Руководитель А.Д. Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр А.Д. Кручинина А.Д.

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

Заведующий кафедрой Г.А. Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 21.06.18 № 9)

Секретарь ГЭК А.Д. Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Биоматериалы.....	6
1.1.1 Общие сведения о биоматериалах.....	6
1.1.2 Синтетические биоматериалы.....	7
1.1.3 Натуральные биоматериалы.....	10
1.1.4 Применение биоматериалов в кардиохирургии.....	16
1.2 Структурные свойства и биохимический состав подслизистой тонкой кишки свиньи и материал на её основе.....	17
1.3 Кальцификация биоматериалов и её значение.....	21
1.4 Способы децеллюляризации.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Подготовка экспериментальных образцов.....	24
2.2 Гистологический контроль обработки.....	26
2.2.1 Окраска гематоксилин-эозином.....	27
2.2.2 Окраска по методу Вейгерта-Ван-Гизона.....	28
2.3 Моделирование кальцификации in vitro.....	28
2.4 Исследование скорости резорбции in vitro.....	30
2.5 Методы статистической обработки данных.....	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Результаты получения экспериментальных образцов внеклеточного коллагенового матрикса.....	32
3.2 Результаты гистологического исследования.....	33
3.3 Результаты исследования влияния способа удаления клеток на скорость резорбции материала.....	36
3.4 Результаты исследования влияния концентрации сшивающего агента на скорость резорбции.....	42
3.5 Результаты моделирования кальцификации in vitro.....	48
ВЫВОДЫ	55

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Актуальность и необходимость разработки новых биоматериалов обусловлена их потребностью и существованием высокого спроса в различных областях реконструктивной хирургии. Сегодня остро востребованы биосовместимые материалы для общей и сердечно-сосудистой хирургии, для изготовления протезов кровеносных сосудов, искусственных клапанов сердца, систем искусственного и вспомогательного кровообращения, для ортопедии и стоматологии, лекарственных форм нового поколения, сорбентов и т. д.[1].

При этом разрабатываемые материалы не должны вызывать местной воспалительной реакции; не должны оказывать токсического и аллергического действия на организм; не должны обладать канцерогенным действием; не должны провоцировать развитие инфекции; должны сохранять функциональные свойства в течение предусмотренного срока эксплуатации. Перечисленные свойства являются абсолютно необходимыми, но недостаточными для конкретного изделия. В зависимости от назначения и места имплантации к изделиям предъявляются дополнительные требования.

Биосовместимые материалы (изделия), предназначенные для контакта с кровью, выделяют в группу гемосовместимых материалов (изделий). К характерному свойству гемосовместимых материалов относится отсутствие отрицательного воздействия на кровь или ее компонентов. Т.е. такие материалы (изделия) не должны провоцировать образование тромбов и тромбоэмболии; активировать свертывающую, фибринолитическую системы и систему комплемента; оказывать отрицательное действие на белковые и форменные элементы крови; нарушать электролитический баланс крови.

Широкое применение в медицинской практике находят материалы природного и синтетического происхождения. У каждой группы отмечают ряд плюсов и минусов, одним из существенных недостатков современных биоматериалов на основе ксеногенных тканей является их кальцификация, в

дальнейшем приводящая к потере функциональной активности медицинских изделий на их основе. Поскольку молекулярные механизмы процесса остаются до конца не изученными, в научном сообществе ведется активный поиск причин кальцификации имплантатов и новых способов обработки материалов с целью подавления процесса.

Целью данной работы является изучение кальцификации внеклеточного коллагенового матрикса, полученного различными способами децеллюляризации.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Провести обработку подслизистой тонкой кишки свиньи раствором трипсина, гипертоническими и гипотоническими растворами солей, раствором детергента, раствором щелочи с целью получения внеклеточного коллагенового матрикса;
2. Провести гистологическое исследование материала методами световой и электронной микроскопии;
3. Исследовать влияние способа удаления клеток и концентрации сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала, на скорость резорбции образцов *in vitro*;
4. Исследовать влияние способа удаления клеток и концентрации сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала, на интенсивность кальцификации образцов *in vitro*.

Бакалаврская работа написана на 67 листах, содержит 17 рисунков, 14 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 96 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биоматериалы

1.1.1 Общие сведения о биоматериалах

Сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущей причиной смерти, в результате чего расходы на здравоохранение растут с каждым годом всё больше. Необратимое повреждение органов от болезней создает острую потребность в новых методах восстановления сердца. Лечение сердечных заболеваний включает в себя подходы, начиная от лекарств до хирургических вмешательств. Большинство хирургических вариантов включают лечение поврежденных тканей, как при шунтировании, или их замену, как при пересадке сердца. Однако источники донорских тканей человека находятся в хроническом дефиците. Создание альтернативных методов лечения значительно расширило бы возможности ухода за пациентами. Эффективные средства восстановления, реконструкции или регенерации поврежденных тканей значительно уменьшат потребность в дефицитных донорских органах. Биоматериалы демонстрируют растущий потенциал в качестве инструмента для таких процедур.

Биоматериалы определяются как материалы, которые взаимодействуют с биологическими системами в медицинских целях. Биоматериалы делятся на две основные категории: синтетические и натуральные. Синтетические материалы включают определенные материалы металлов, полимеров и керамики. Природные биоматериалы получают из нативных тканей из аутогенных (один и тот же человек), аллогенных (донор одного вида) или ксеногенных (животных) источников. В медицине отдают предпочтение применению биоматериалов из инертных материалов, так как они уменьшают реакцию с биологическими тканями, находясь с ними в контакте. Примерами могут служить металлические титановые имплантаты,

используемые в эндопротезировании тазобедренного сустава, которые не реагируют химически с местной областью, или биологически инертные золотые зубные пломбы.

Итак, биосовместимость подразумевает не только взаимное «сосуществование» двух субстанций (естественной и искусственной), но и то, что искусственный материал должен выполнять функции живой материи. Биосовместимость того или иного материала определяется не только его химической и надмолекулярной структурой, но и формой, топографией поверхности, спецификой взаимодействия с окружающими тканями.

1.1.2 Синтетические биоматериалы

Синтетические биоматериалы, используемые в сердечно-сосудистой хирургии, в основном включают в себя полимеры, металлы или комбинации обоих. Керамика используется гораздо реже в сердечных процедурах. Основными преимуществами синтетических материалов являются их прочность и долговечность, хотя их взаимодействие с организмом может вести к осложнениям. Для синтетических биоматериалов важную роль играет отсутствие токсичности, особенно если эти материалы биоразлагаемы, так как они могут высвобождать потенциально вредные побочные продукты деградации в организм.

Расширенный политетрафторэтилен широко используется в сердечно-сосудистой хирургии в связи с простотой использования этого материала. Этот материал рекомендуется для использования в общей сердечной реконструкции, изготовления васкулярных графтов и педиатрических шунтов. Его структура обеспечивает высокую прочность и устойчивость к дилатации. Химический состав способствует снижению показателей рестеноза и гемостаза, уменьшению кальцификации [13, 77, 92, 94]. Кроме того, было показано, что материал не вызывает аллергическую реакцию [90]. Эти свойства сделали политетрафторэтилен отличным вариантом для

создания шунтов [29, 59, 65], реконструкции клапанов [7, 58], и материал был использован для покрытия имплантируемых приборов для того чтобы уменьшить воспаление [94]. Однако, из-за того, что политетрафторэтилен - синтетический материал, в некоторых случаях он может вызывать отрицательную иммунную реакцию и тромбирование.

Терефталат полиэтилена (ПЭТ), термопластиковый полимер, обладает химической инертностью, что обеспечивает его биосовместимость. Этот материал обычно используется в сердечно-сосудистой хирургии как васкулярный трансплантат в сплетенной или связанной конфигурации. В сердечно-сосудистой хирургии ПЭТ используется для создания сосудистых графтов. Ряд ПЭТ-трансплантатов содержат белковые покрытия, обычно изготовленные из коллагена или альбумина с целью уменьшения кровопотери и для предотвращения инфекции трансплантата [46]. Поверхности трансплантатов ПЭТ часто гофрируют для усиления биоинтеграции. Было обнаружено, что ПЭТ-трансплантаты способствуют эндотелизации путем рекрутирования эндотелиальных клеток на поверхность просвета трансплантата без кальцификации или разрастания тканей [79]. Места локализации коллагена и гликозаминогликанов также были найдены в имплантированных графтах, и механические свойства показывают их незначительное ухудшение с течением времени [77]. У ПЭТ также есть недостаток, так как он является синтетическим материалом и, в некоторых случаях, может привести к образованию тромба.

Полиуретаны (PUs) принадлежат к классу соединений, называемых реакционными полимерами, и образуются в результате реакции изоцианатной группы с гидроксильной группой с образованием пены. Кроме того, из полиуретана можно изготовить различную термопластиковую форму любой сложности, используемую в медицине. Термопластичный полиуретан обладает высокой прочностью, эластичностью и прозрачностью. Микробное сопротивление идеально подходит для предотвращения инфекции.

Вероятность тромбоза полиуретана аналогична другим материалам, таким как политетрафторэтилен [54]. Этот материал часто использовался в прошлом для замены клапанов [47], до появления биопротезов клапанов. В настоящее время полиуретаны в основном используются в кардиостимуляторах в качестве изолятора [81]. Полиуретан прочен, но хочется, чтобы он обладал еще и хорошей гибкостью. Для решения этой проблемы, их изготавливают с сополимером PU-силикона для того чтобы взять преимущество гибкости силикона. Было представлено, что провода с силиконовым покрытием сохраняют электрические свойства, важные для стимуляции лучше, чем провода с PU-изоляцией [42]. Каждый материал (PU или силикон) имеет свои собственные преимущества. Выбор материала в медицинской практике основан на специфических требованиях к проведению конкретной операции.

Металлы используются для многих медицинских целей в течение нескольких десятилетий из-за их прочности и биосовместимости. Обычно используемые биосовместимые металлы включают титан, нержавеющую сталь, золото и серебро. В сердечно-сосудистой хирургии, металлы используются в стентах для открытия просвета закупоренных сосудов. Титан и нержавеющая сталь были классически использованы в конструкции стента, для более новых стентов используются сплавы кобальт–хром или платина–хром для их большей прочности [45, 64]. Стенты из нитинола, изготовленные из никеля и титанового сплава, преобладали в прошлом благодаря своим свойствам запоминания формы, но их использование было исключено из-за образования аллергических реакций на никель [71]. Металлы также широко используются при замене клапанов сердца. Механические запасные сердечные клапаны изготовлены из таких металлов, как нержавеющая сталь или титан [88]. Механические клапаны могут служить на протяжении всей жизни пациента, но необходимой мерой является применение антикоагулянтных препаратов до конца жизни из-за вероятности образования

тромбов [6]. Пациенты, которые не могут принимать антикоагулянтные препараты вынуждены выбрать другие варианты клапанов.

1.1.3 Натуральные биоматериалы

В то время как синтетические материалы восстанавливают и замещают поврежденные сердечно-сосудистые ткани, они меркнут по сравнению с функциональными возможностями естественных тканей. Каждая из тканей в теле уникально оптимизирована к своей специфической системе органа, и предполагает врожденную биосовместимость. Аутологичная ткань, или ткань, собранная и используемая для одного и того же пациента. Поставка необходимых тканей и состояние здоровья пациента являются основными препятствиями для получения аутологичной ткани. Лучший выбор – аллогенные ткани или донорские ткани от организмов того же вида; у человека эти ткани называются гомографты. К сожалению, человеческие донорские ткани, необходимые для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, находятся в очень ограниченном количестве, и списки людей, нуждающихся в трансплантатах сердца остаются невероятно длинными. Ксеногенные ткани животных помогли восполнить эту потребность, особенно при восстановлении тканей или замене клапанов [27].

Иммунный ответ имеет особое значение для аллогенных и ксеногенных тканей. При аллогенных донорских тканях человека пациентом должны приниматься иммуносупрессивные препараты, но даже тогда ткань или орган все равно могут быть отвергнуты [38]. Для устранения иммунного отторжения ксеногенных тканей, перед применением, их децеллюляризируют [19]. Главным образом, внеклеточные материалы матрицы представляют собой каркас, состоящий из сохранившихся после децеллюляризации коллагенов и эластинов, для восстановления поврежденной области. В качестве сырья для получения подобных

материалов выступают перикард, подслизистая тонкой кишки, подслизистая мочевого пузыря, глиссонова капсула печени и др.

Перикард давно используется в кардиохирургии для реконструкции клапана и закрытия перикарда [41, 80]. Ксеногенный перикард обычно получают из крупного рогатого скота, свиней и, реже, из лошадей. Ткани из этих источников имеются в больших количествах, что позволяет изготавливать на заказ изделия различной конфигураций. Перикард в большей степени состоит из волокон коллагена и имеет эластичные свойства. Перикардальная ткань имеет следующие характеристики: гибкость, высокая биосовместимость и длительная работоспособность, низкая тромбогенность и естественная сопротивляемость инфекциям [10].

Чтобы уменьшить вероятность неблагоприятного иммунного ответа, перикард децеллюляризуется с помощью одной из многих возможных процедур обработки. Морфология тканей и коллагеновые структуры зависят от выбранного процесса децеллюляризации [33]. После удаления клеточного содержания, ткань сшивается, используя глутаральдегид для консервации и увеличения прочности биоматериала. Однако, известны случаи обывзествления постимплантационного трансплантата, что связывают с обработкой глутаровым альдегидом [17, 83]. Таким образом, в настоящее время ведется активная разработка методов снижения кальцификации материала за счет введения дополнительной стадии обработки после стабилизации глутаровым альдегидом или замены сшивающего агента. Подходы включают обработку перикарда глутаральдегидом, глутаминовой кислотой [17], модификацию процедуры децеллюляризации [33] и нанопокрывание перикардиальных трансплантатов титаном для предотвращения иммунной реакции и, следовательно, кальцификации [34]. Есть небольшие различия между перикардами, полученными из разных источников. Бычий перикард имеет более высокое содержание коллагена, чем свиной [16, 50]. Клапаны, изготовленные из перикарда крупного рогатого скота, показали меньшую обструкцию, чем клапаны, изготовленные

из ткани перикарда свиньи, хотя оба клапана показывают аналогичные гемодинамические результаты [20]. Ткани крупного рогатого скота и свинины не проявляли существенной разницы в степени кальцификации при различной обработке глутаральдегидом [83].

В последние годы наблюдается значительное увеличение применения инъекционных биоматериалов для лечения инфаркта миокарда [70, 78, 89]. Инъекционные материалы в основном включают в себя: гидрогели, состоящие из альгината, фибрин, хитозан, коллаген или матригель; и самособирающиеся пептиды в виде нановолокон. Эффективность этих материалов была исследована на животных моделях инфаркта миокарда. Исследования показали улучшение сердечной функции, уменьшении размера рубца, увеличение толщины стенки и увеличении неоваскуляризации в области инфаркта.

Альгинат гидрогель представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей. Он имеет аффинно-связывающие фрагменты, позволяющие связывать белки, лекарственные препараты и факторы роста и постепенно высвобождать их [75]. Показано, что применение альгинатного геля изменяет процесс ремоделирования левого желудочка после инфаркта миокарда [49].

Фибрин образуется из взаимодействия белков крови фибриногена и тромбина в процессе свертывания в ране после травмы. Фибриновый клей используется в хирургии в качестве герметика, для контроля кровотечений, ускорения заживления ран, для заполнения отверстий после операции, а также при доставке лекарств и клеток [44, 93].

Хитозан – полисахарид, извлеченный из экзоскелета ракообразных и главным образом используемый для того чтобы повысить быстроту свертывания крови. Кроме того, гидрогель хитозана использовался как средство доставки белков [52, 53] и клеток, что в последнем случае приводило к усилению приживления и выживаемости стволовых клеток в ишемизированном сердце [53].

В качестве основного компонента ВКМ, коллаген играет важную роль в процессе ремоделирования, по этой причине коллагеновый гель был одним из первых материалов, используемых для инкапсуляции и доставки клеток в сердце [35, 78]. Во многих исследованиях использовались коллагеновые гели для доставки мезенхимальных стволовых клеток в области инфаркта миокарда, что показало улучшение сердечной функции за счет увеличения сосудистой плотности [31].

Matrigel представляет собой белковую смесь, полученную из клеток саркомы мыши, и содержит много важных белков ВКМ, таких как ламинин и коллаген, а также факторы роста, которые способствуют пролиферации и дифференциации клеток [39, 78]. Matrigel широко используется как субстрат для прикрепления зародышевых и плюрипотентных стволовых клеток в культуре. Matrigel способен удерживать стволовые клетки после инъекции в инфарктной ткани и впоследствии улучшать сердечную функцию. Однако, так как этот гель выведен от опухолей мыши, он не применим для человека.

Самосборные пептиды – это наноструктуры, образующиеся при спонтанной агрегации пептидов, обычно в нановолокна. Эти цепи пептида могут обеспечить 3D микроокружение, способное рекрутировать клетки, повышающие васкуляризацию и синтез факторов роста. При их введении в миокард в зоне инфаркта уменьшилась область повреждения сердечной ткани, увеличивалась плотность сосудов и восстанавливалась сердечная функция [43]. Самособирающиеся пептиды также были соединены с мезенхимальными стволовыми клетками, что привело к устойчивому росту, выживанию и дифференцировке стволовых клеток, уменьшению области повреждения ткани и значительному улучшению функциональных показателей сердца (например, показателей систолической функции, фракции выброса левого желудочка и фракционного укорочения левого желудочка) [62].

Много попыток было сделано для проектирования различных сердечных тканей, но ни один тип клапана не может расти и расширяться

вместе с пациентом по мере их роста и старения. Для этого, были исследованы тканевые клапаны сердца. Желательные параметры для тканевой инженерии клапанов включают: нетромбогенность, биосовместимость, возможность роста и ремоделирования, легкая имплантируемость, гемодинамическая совместимость и долговечность [9]. В настоящее время задача состоит в создании проекта тканевого клапана с механической прочностью, чтобы он выдерживал кровяное давление и силы сократительной способности сердца, которые способны плавно интегрироваться с нативными клетками и тканями [76]. Классический подход для проектирования клапана – использовать децеллюляризованные образцы алло - или ксено-трансплантатов на которых находятся разные виды клеток. Примерами различных комбинаций являются гомографты, засеянные мезенхимальными стромальными клетками сердца [26], свиной клапан и перикард, засеянные фибробластами крупного рогатого скота [24] и фибриновый гель в сочетании с фибробластами кожи человека [72]. Клиническое использование клапанов еще не достигнуто из-за отсутствия проверки осуществимости *in vivo*.

И естественные и синтетические биоматериалы имеют свои ограничения и могут привести к нежелательным последствиям (лимитированная стойкость и более высокий шанс затромбирования). Природные биоматериалы превосходят по функциональности и биосовместимости, но не обладают устойчивостью. Синтетические биоматериалы обладают преимуществами прочности и долговечности, но не обладают достаточными функциональными возможностями. Материалы совмещались в смеси, создавались лучшие варианты, которые извлекли пользу прочности различных материалов и уменьшали их недостатки. Композиционные материалы достигаются методами смешивания (физически комбинированные без образования химических связей), покрытия (путем погружения в воду или распыления), сополимеризации (полимерная структура, модифицированная с образованием нескольких блочных

мономеров, затем полимеризованная) и многослойности (прослаивание материалов с последующей механической фиксацией) [66, 67]. Инъекционные гидрогели обычно сочетаются друг с другом и другими элементами и обладают преимуществами перестраиваемых свойств, которыми можно управлять, изменяя сшивку [22, 28, 86].

Биоматериалы можно совместить с клетками, чтобы обеспечить поддержку структуры, для увеличения роста клеток и их выживания. Регенерация тканей с использованием клеточного материала исследована как механизм заживления поврежденных и больных тканей сердца. Их пролиферативная способность и способность дифференцироваться в сердечно-сосудистые клетки делают стволовые клетки идеальным вариантом [78]. В доклинических и клинических исследованиях исследовано множество различных стволовых клеток взрослого человека [44, 49, 52, 53, 70, 75, 89, 93]. Основной проблемой, задерживающей терапию стволовыми клетками от широкого использования, является тот факт, что после инъекции *in vivo* происходит низкое приживление из-за миграции клеток из места раны и/или клетки просто умирают [62]. Доставка стволовых клеток с помощью биоматериалов становится все более популярным методом и развивается в собственной области. Испытывают биоматериалы в виде вводимых гидрогелей или лоскутных материалов естественного и синтетического источников, и факторы роста являются решением для доставки стволовых клеток к месту раны для улучшения приживления и помощи их выживанию и пролиферации пост-трансплантата [48, 69, 78, 85, 82]. Большинство этих исследований находятся на доклинической стадии. В целом, результаты исследования показывают, что существует большой потенциал для стволовых клеток и для эффективного лечения сердечно-сосудистых заболеваний, при условии, что способы введения таких методов лечения разработаны для оптимизации терапевтических результатов.

Биоматериалы могут быть модифицированы, для расширения их применения в генной инженерии, для доставки лекарственных препаратов.

Полимеры приживаются, и гели легко смешиваются с факторами роста, цитокинами и фармацевтическими препаратами, для позволения лекарственным системам контролируемо высвободиться [84, 96]. Могут быть поставлены различные препараты и факторы роста, такие как антикоагулянты и пептиды, способствующие эндогенной пролиферации клеток и ангиогенезу [68, 84]. Тканевые трансплантаты включают различные лекарства и факторы роста в свою структуру для увеличения дифференцировки определенных клеток. Факторы роста, такие как EGF, TGF, VEGF и BMPs, были использованы для стимуляции клеток сердечно-сосудистого происхождения [23, 84, 95].

1.1.4 Применение биоматериалов в кардиохирургии

Биопротезы в России стали использоваться в операциях в 1965-1968 гг. в Институте сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева (Бокерия Л.А. и соавторы, 2009), в соавторстве с ними были В.А. Бухарини, В.И. Бураковский. Профессор Г.И. Цукерман в 1977 г. имплантировал первый ксеноперикардальный биопротез клапана в аортальную позицию. За существенную работу над проблемой биопротезирования Г.И. Цукерман и соавторы. В 1984 году были удостоены Государственной премии.

В наше время также ведется разработка новых биопротезов. В России над этим работают три крупные лаборатории: в Научном центре сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева, в Российском научном центре хирургии им. академика Б.В. Петровского РАМН, а также в Кемеровском кардиологическом центре.

Среди каркасных биопротезов, представленных в России и широко используемых во всем мире, представлены такие, как: Carpentier-Edwards (CE-SAV), Carpentier-Edwards PERIMOUNT (CE-P), Medtronic Mosaik (MM); бескаркасных — Edwards Prima Plus, St Jude Medical Toronto SPV, Medtronic Freestyle, Sorin Freedom и др.

Для изготовления сосудистых материалов используются материалы ксеногенного происхождения. Впервые имплантация свиного ксеноаортального клапана CE-SAV была проведена в Университете Британской Колумбии в 1981 г. В 1984 г. проводилась имплантация ксеноперикардального клапана CE-Perimount в Университете Франсуа Рабле. Данные по двум видам протезов были предоставлены и опубликованы этими двумя центрами.

Каркасные биопротезы обладают хорошими характеристиками, такими как устойчивость к инфекции, отличные гемодинамические параметры, отсутствие тромбогенности, отсутствие риска геморрагических инсультов. Данные характеристики делают каркасные биопротезы альтернативой механических протезов.

В настоящее время в мировой клинической практике наблюдается тенденция к более широкому применению биологических заменителей клапанов сердца. В 2002 году мировые продажи биологических клапанов начали превышать продажи механических клапанов на 100 млн долларов (при общей сумме в 800 млн долларов). Использование биопротезов для протезирования аортального клапана значительно увеличилось. Были усовершенствованы и каркасные, и бескаркасные биопротезы. Тенденция отхода от механических клапанов основывалась на ожидании увеличенного срока службы и оптимизации гемодинамических параметров современных биопротезов.

1.2 Структурные свойства и биохимический состав подслизистой тонкой кишки свиньи и материал на ее основе

Структурные свойства и биохимический состав подслизистой тонкой кишки свиньи были хорошо изучены (см. табл. 1)

Материал, полученный из подслизистой тонкой кишки, набирает в последнее время популярность в сердечно-сосудистой хирургии, он является

производным от подслизистой основы тонкой кишки. Подслизистую тонкой кишки можно обрабатывать различными способами, но обычно его обрабатывают следующим образом: сначала разрезают собранный тонкий кишечник в продольном направлении, а затем механически удаляют слой подслизистой оболочки, сохраняя при этом мембрану в целости. Клетки удаляют кислотой, а полученные фрагменты ВКМ стерилизуют перед использованием пациентом [11].

Подслизистая тонкой кишки свиньи имеет толщину от 0,05 до 0,22 мм [57] и переменную пористую микроструктуру с порами от 20 до 30 мкм [12, 63], что обеспечивает диффузию кислорода, необходимую для поддержания пролиферации и жизнеспособности клеток. Так же были определены коэффициенты диффузии кислорода подслизистой тонкой кишки свиньи $7 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ см}^2 / \text{с}$ [8]. Те же анализы показали, что коэффициент диффузии кислорода внеклеточного матрикса, человеческой дермы (Alloderm) и собачьей фасции, были идентифицированы в подслизистой тонкой кишки свиньи. Кроме того, подслизистая тонкой кишки свиньи содержит гликозаминогликаны и протеогликаны [37, 40], которые обеспечивают прикрепление клеток и сайты связывания факторов роста, и усиливают клеточную инфильтрацию в поврежденные ткани [14, 32, 61]. Известно также, что подслизистая тонкой кишки свиньи высвобождает факторы роста, включая фактор роста фибробластов-2 (FGF-2), трансформирующий фактор роста-beta1 (TGF- β 1) и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VE - GF) [40, 55, 91].

Таблица 1 – Структурные свойства и биохимический состав подслизистой тонкой кишки свиньи

Свойство	Описание
Толщина	0.05 – 0.22 мм [57]
Ширина пор	20 – 30 мкм [8]

Коэффициент диффузии кислорода	$7 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$ [8]
--------------------------------	---

Продолжение таблицы 1

Свойство	Описание
Структура волокна	Одиночное, непрерывное предпочитаемое направление волокна, параллельное к длинной оси кишечника [36]
Биохимический состав	Коллаген [40, 87] Эластин [87] Фибронектин [51, 56] Ламинин [51] Гликозаминогликаны и протеоглики [37, 40] Фактор роста фибробластов-2 (FGF-2) [91] Трансформирующий фактор роста-beta1(TGF-β1) [55] Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)[91]

Подслизистая основа тонкой кишки свиньи является сырьем для получения бесклеточный коллагенового матрикса. Его применение значительно увеличивает процент заживляемости ран и скорость заживления по сравнению со стандартным лечением [60, 73, 74]. Существуют технологии создания многослойных конструкторов, что позволяет изменять толщину и физико-механические свойства изделий для различных направлений применения.

Сравнивались механические свойства конструкций в 1, 2, 3 и 4 слоя [30]. Толщина одного слоя составляет приблизительно 50 мкм. Итоговая прочность на растяжение, модуль упругости, растяжение и сила удерживания шва определялись как в сыром, так и в сухом состоянии. При испытании в сухом состоянии прочность возрастала с увеличением количества слоев. Чем больше слоев, тем больше материал растягивается. Модуль упругости мало отличался у материалов с различным количеством слоев, что свидетельствует о том, что все они имеют сходные характеристики напряжения и деформации. Характеристики материалов в сухом и влажном состоянии сильно отличались друг от друга [30]. Значения максимального выдерживаемого напряжения, модуля упругости были ниже для сухих образцов. В условиях повышенной влажности относительное растяжение обратно пропорционально количеству слоев и максимальным нагрузкам. Для теста на удержание шва влажные условия обеспечивали более высокую прочность удерживания. Как влажные, так и сухие образцы демонстрировали ту же тенденцию, что большее количество слоев в материале привело к большей прочности удерживания шва [30].

Несколько исследований на животных были проведены для того чтобы исследовать другие возможные направления применения ПТК в сердечно-сосудистой хирургии. Эмульсионная форма ПТК была протестирована на эффективность в лечении инфаркта миокарда. Животным с инфарктом миокарда вводили эмульсию ПТК, при этом ангиогенез был значительно повышен по сравнению с миокардом после инфаркта, в который был введен физиологический раствор. Эхокардиография показала улучшение фракции укорочения, фракции выброса и ударного объема [96]. Также изучен потенциал ПТК в качестве каркаса для тканевой инженерии сердца. В одном исследовании, неонатальные клетки сердца крысы были смешаны с формой геля ПТК и депозированы на субстраты полимера. Полученные тканевые конструкции показали более высокие темпы сокращения и большую экспрессию тропонина Т по сравнению с контролем Matrigel (BD Biosciences)

[25]. Также была исследована комбинированная терапия ПТК и стволовыми клетками для лечения хронического инфаркта миокарда. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга высевали на участки ПТК и имплантировали трансплантаты на эпикардальную поверхность инфарктного миокарда у кроликов. Для сравнения были также имплантированы только лоскуты ПТК. В обоих случаях (ПТК с клетками и без них) значительно улучшились сократительная функция и размерность левого желудочка, плотность капилляров инфарктной области и патологические изменения миокарда.

Результаты с клетками были немного лучше [85]. Исследования на животных показывают, что ПТК может использоваться для лечения инфаркта миокарда, а также для доставки клеток с целью регенерации поврежденных областей сердца. Наконец, в клиническом исследовании на пациентах, перенесших первичное изолированное аортокоронарное шунтирование, наблюдалось значимое снижение скорости послеоперационной фибрилляции предсердий у пациентов, которым также проводилась перикардальная реконструкция с использованием ПТК, по сравнению с пациентами без какой-либо реконструкции [15].

1.3 Кальцификация биоматериалов и её значение

В наше время благодаря прогрессу в медицинской науке и технике, были созданы различные имплантируемые устройства и изделия, предназначенные для функционирования в организме, такие как системы искусственного сердца и вспомогательного кровообращения, сосудистые и клапанные протезы, офтальмологические и урологические устройства, и др. К таким устройствам предъявляются особые требования. Одной из ключевых проблем биоматериалов является их кальцификация.

Под кальцификацией понимается образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в объеме имплантатов. Кальцификация

приводит к потере функциональных свойств протезов и необходимости повторных операций. Однако, данный процесс играет положительную роль для восстановительной хирургии костных тканей, когда процесс кальцификации необходим для имплантированных конструкций (штифты, протезы суставов и др.). Но есть и негативные последствия этого процесса, они связаны с тем, что патологической кальцификации подвергаются искусственные материалы и изделия, используемые не только в сердечнососудистой хирургии, но и в офтальмологии, урологии, при операциях на брюшной полости [1].

Различают два типа патологической кальцификации: метастатический и дистрофический. Метастатический возникает при нарушении обмена кальция в организме и при перегрузке организма кальцием. Дистрофический тип проходит без нарушения системного кальциевого обмена в поврежденных тканях, или находящихся в состоянии некроза.

Второй тип часто встречается при имплантации биоматериалов в ортопедии. При повреждении, воспалении и некрозе тканей кальций и фосфор выходят из поврежденных клеток, повышая их концентрацию.

1.4 Способы децеллюляризации

Учитывая важность выполняемых функций имплантатов, к ним предъявляются высокие требования. Материалы не должны провоцировать реакции воспаления, вызывать реакций отторжения, кальцификации, должны иметь низкие антигенные свойства и высокую степень биосовместимости с органами и тканями реципиента.

Для достижения данных требований выполняется обработка биологического сырья, которая и является основным фактором, влияющим на качество материала. Под обработкой в первую очередь подразумевается децеллюляризация. Проведенная не должным образом или недостаточная обработка может привести к тяжелым последствиям, таким как: отторжение материала, образование гнойно-воспалительных процессов, некрозов, а также стать причиной новообразований и тд.

Процесс децеллюляризации подразумевает полное удаление клеток и их фрагментов из интересующей нас ткани, которые в основном являются антигенными факторами, приводящими к нежелательным осложнениям после имплантации.

На сегодняшний день существует много патентов, которые описывают подобные методики, но в большинстве своем все они являются вариацией или продолжением одной и той же техники. В 1988 году впервые был описан способ подготовки биоткани для ксенопротезирования путем ферментативной обработки террилитином в фосфатном буферном растворе в течение 4-х часов при 43°C, последовательной отмывки в кислотном растворе, в 1 М растворе гидрокарбоната натрия и растворах хлорида натрия, выдержки в многократно заменяемом растворе глутарового альдегида в буферном растворе с возрастающей концентрацией и стерилизации. Существует недостаток данного метода: высокая концентрация фермента вызывает разрушение коллагеново-эластической основы биоткани, образование кавитаций и нарушение физико-механических свойств трансплантата.

На базе компании ООО «Кардиоплант» проводится изучение и создание альтернативных методов обработки тканей ксеногенного происхождения с целью получения новых биоматериалов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Подготовка экспериментальных образцов

Получение образцов и исследование их свойств проводилось на базе ООО «Кардиоплант» и кафедры «Общая биология и биохимия» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет».

Обработка сырья проходила в несколько этапов (таблица 2):

1. Механическая чистка
2. Химико-биологическая обработка
3. Обработка сшивающим агентом
4. Лиофильная сушка

Таблица 2 - Технологическая схема производства внеклеточного коллагенового матрикса

Этап процесса	Основная задача этапа
Механическая чистка	Предварительная очистка сырья ксеногенного происхождения
Химико-биологическая обработка	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

Для получения экспериментальных образцов проводили несколько вариантов химико-биологической обработки ткани ксеногенного

происхождения с целью удаления клеток и их компонентов и несколько вариантов обработки сшивающим агентом:

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 подвержен обработке раствором гидроксида натрия, с последующей отмывкой в дистиллированной водой, выдержке в растворе соляной кислоты, промывке в дистиллированной воде, выдержке в растворе гидрокарбоната натрия.

3. Солевая обработка: после предварительной обработки солевыми растворами биоматериал выдерживали в дистиллированной воде, далее выдерживали в гипертоническом солевом растворе, попеременную 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 pH раствора, после чего проводили нейтрализацию и отмывку до достижения значений pH промывной жидкости от 5,5 до 6,5.

Критерием эффективности обработок служили следующие показатели: отсутствие клеточных элементов и сохранность коллагеновых и эластиновых волокон, которые определялись с помощью гистологического исследования полученных экспериментальных образцов.

Обработка сшивающим агентом – раствором 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида проводится с целью повышения упругости, механической прочности материала и снижения скорости резорбции в организме реципиента. 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид образует амидные связи между карбоксильной и аминогруппами группами белковых молекул. Сшивающий агент применяется

для стабилизации материалов на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, успешно зарекомендовавших себя в клинической практике.

Для всех экспериментальных групп образцов проводили исследование скорости их резорбции и интенсивности кальцификации *in vitro*.

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 происходит следующим образом:

- Подготовка образцов.
- 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 Вейгерт-Ван-Гизона.
- Заключение окрашенных срезов под покровное стекло.
- Изучение срезов под микроскопом в проходящем свете.

После обработки образец биоматериала был помещен в 4% раствор нейтрального формалина не менее, чем на 24 ч, после чего его 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 микротомы, 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)°C, далее на предметное стекло, предварительно обработанное смесью белка куриного яйца с глицерином. Высушивали стекло в термостате при температуре (38 ± 2)°C.

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) [3].

2.2.1 Окрашка 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, двукратно 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 [3].

2.2.2 Окраска по методу Вейгер-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 [3].

2.3 Моделирование кальцификации *in vitro*

Эксперименты *in vitro* по кальцификации биоматериалов и имплантатов привлекают для оценки склонности биоматериалов к кальцификации и возможности минерализации органических матриц при образовании природных кристаллов.

В эксперименте были исследованы 8 групп образцов материала, отличающиеся между собой способами децеллюляризации и концентрациями сшивающих агентов.

Моделирование кальцификации проводилось в растворе, общим объемом 5 л, который содержал: 0,9% HCl (0,154 M), 1,15% KCl (0,154 M), 1,22% CaCl₂ (0,11 M), 2,11% KН₂PO₄ (0,154 M), 3,8% MgSO₄*7H₂O (0,154 M), 0,1 M фосфатный буфер, pH 7,4.

Из каждой группы материалов вырезались образцы, размером 2×2 см по 10 шт, они нанизывались на нить, делая прокол в центре, таким образом, чтобы они не касались друг друга. Нить с образцами погружалась в раствор, фиксировались оба конца так, чтобы образцы не касались дна и стенок тары. Далее образцы инкубировались в данном растворе при температуре 37°С в течение 4 и 8 недель. Смена раствора производилась каждые 7 дней, также в раствор добавляли 2 ампулы гентамицина для предотвращения роста патогенной микрофлоры.

После извлечения из раствора, образцы высушивались до постоянной массы, определялось ее значение и затем они подвергались сухому озолению в муфельной печи при температуре 525°С. Далее остатки растворялись в 0,25 мл 1н соляной кислоты и в 0,25 мл 1н гидроксида натрия, с последующим количественным определением кальция и фосфора в образцах с использованием наборов клинико-лабораторной диагностики.

Метод фотометрического определения кальция основан на взаимодействии о-крезолфталейнкомплексона с кальцием в щелочной среде и образовании комплекса красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски которого при 575 нм пропорционально концентрации кальция и измеряется фотометрически при длине волны 575 нм (560-580 нм) [2].

Метод фотометрического определения фосфора основан на способности фосфат-ионов образовывать в кислой среде в присутствии детергента с молибдатом аммония фосфорномолибденовый комплекс,

оптическая плотность которого при длине волны 340 нм пропорциональна концентрации неорганического фосфора в исследуемом образце [2].

2.4 Исследование скорости резорбции in vitro

Исследование скорости резорбции материала определяли на модели in vitro. В качестве модельных сред, рекомендованных международным стандартом ИСО, были выбраны:

- дистиллированная вода;
- раствор фосфатного буфера (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 [5].

В эксперименте были исследованы 8 групп образцов материала, отличающиеся между собой разными способами децеллюляризации и концентрациями сшивающих агентов.

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 резорбции оценивалась 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 $p < 0,05$ [4].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты получения экспериментальных образцов внеклеточного коллагенового матрикса

В качестве сырья для получения экспериментальных образцов использовалась подслизистая тонкой кишки свиньи, представляющая собой слой рыхлой волокнистой соединительной ткани между мышечным и слизистым слоями тонкой кишки. Внешний вид сырья для получения внеклеточного коллагенового матрикса представлен на рисунке 1.

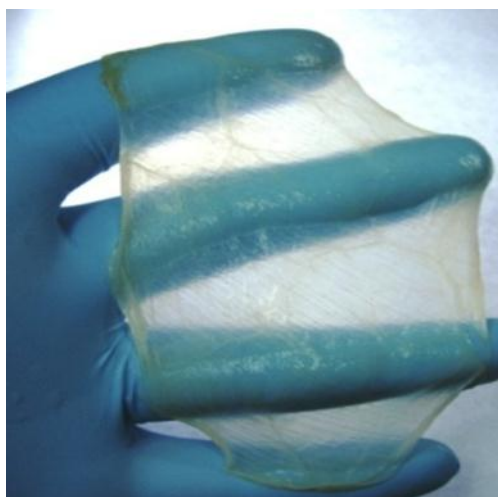


Рисунок 1. Подслизистая тонкой кишки свиньи

При получении биоматериала с высокой биосовместимостью для реконструктивной хирургии необходимым является проведение обработки по удалению клеток и их компонентов, а также обработки сшивающим агентом. Удаление клеточных элементов является обязательным этапом обработки. Наличие клеточных элементов вызывает развитие выраженной воспалительной реакции и отторжение имплантата, существенно снижая биосовместимость материала с организмом.

Знание влияния параметров обработки на итоговые свойства биоматериала является необходимым для дальнейшего получения биоматериалов с заданными свойствами и разработки новых медицинских изделий для различных областей медицины.

В исследовании было получено несколько экспериментальных групп образцов, клетки которых были удалены разными способами:

- 1 группа – удаление клеток путем обработки раствором трипсина
- 2 группа – удаление клеток путем обработки гипертоническими и гипотоническими растворами солей
- 3 группа – удаление клеток путем обработки раствором детергента
- 4 группа – удаление клеток путем обработки раствором щелочи

Экспериментальные группы 5-8 отличались между собой концентрацией сшивающего агента, применяемой для стабилизации биоматериала.

- 5 группа – без сшивающего агента
- 6 группа – обработка раствором 0,1 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида
- 7 группа – обработка раствором 0,25 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида
- 8 группа – обработка раствором 0,5 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида

Критерием эффективности обработок служили следующие показатели: отсутствие клеточных элементов и сохранность коллагеновых и эластиновых волокон, которые определялись с помощью гистологического исследования полученных экспериментальных образцов.

3.2 Результаты гистологического исследования

Свойства биоматериала зависят от компонентов, входящих в его состав. После обработки мы получаем внеклеточный коллагеновый матрикс

на основе подслизистой тонкой кишки, о чем свидетельствуют результаты гистологического исследования методами световой (рисунок 2) и сканирующей электронной микроскопии (рисунок 3).

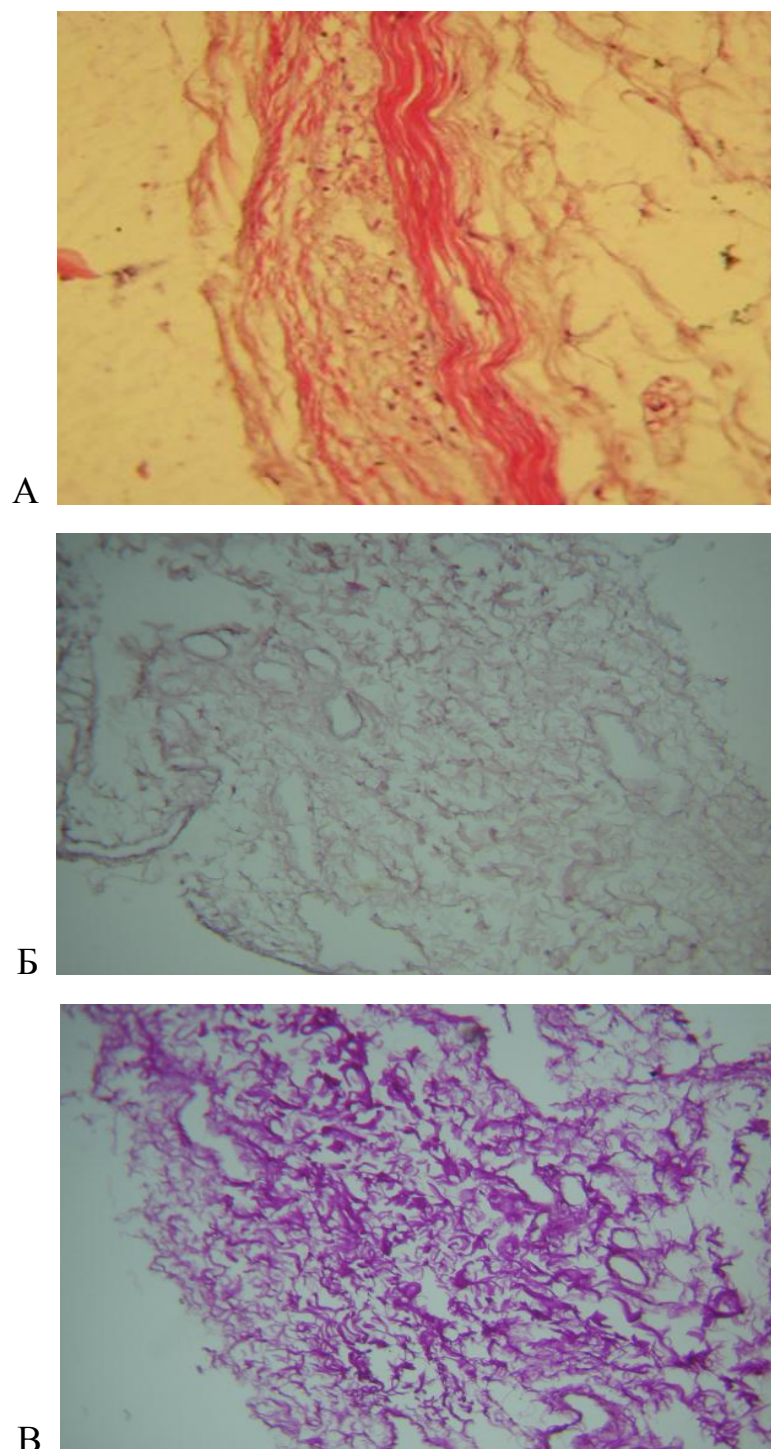


Рисунок 2. Результаты гистологического исследования внеклеточного коллагенового матрикса до (А) и после обработки (Б) Окраска гематоксилин-эозин, x200. (В) Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

На рисунке 2А изображена подслизистая тонкой кишки свиньи до обработки. Окраска с помощью гематоксилин-эозина позволяет увидеть наличие клеток, окрашенных в фиолетовый цвет. Окраску по Вейгерт-Ван-Гизону используют для оценки состояния коллагеново-эластиновой структуры.

После проведения обработки в составе материала клетки не обнаружены (рисунок 2Б), а структура внеклеточного коллагенового матрикса остается в сохранности (рисунок 2В).

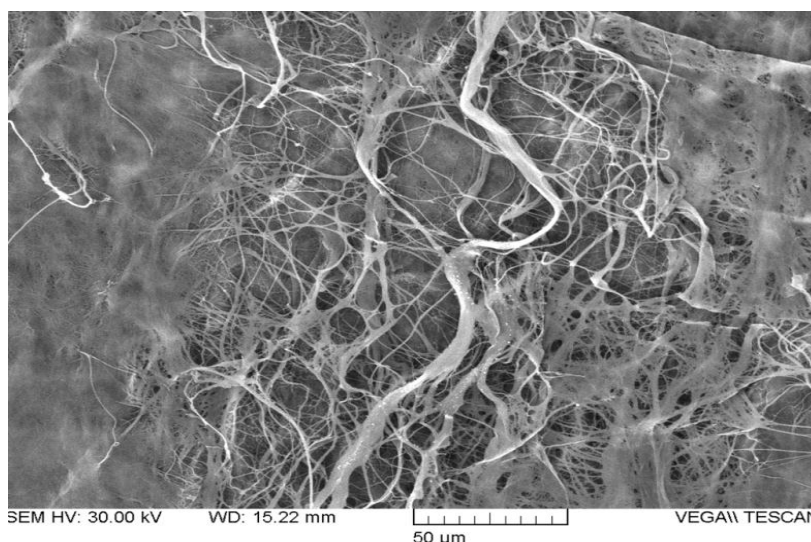


Рисунок 3. Результаты сканирующей электронной микроскопии внеклеточного коллагенового матрикса

На данной фотографии мы видим трехмерное изображение исследуемого нами внеклеточного коллагенового матрикса.

Компонентный состав материала определяет его свойства, поэтому задачей обработки является удаление нежелательных компонентов с сохранением необходимых.

Необходимым и актуальным является проведение всестороннего изучения свойств полученного материала и поиск возможных направлений его применения в тканевой инженерии в качестве матрицы для заселения

клеток и в реконструктивной хирургии для восстановления дефектов тканей и органов.

3.3 Результаты исследования влияния способа удаления клеток на скорость резорбции материала

Данный этап исследования заключался в изучении влияния способов удаления клеточных элементов на скорость резорбции биоматериалов *in vitro* в модельных средах согласно международному стандарту ИСО: дистиллированная вода (контроль), раствор фосфатного буфера (имитация крови), реактив Фентона (имитация воспалительного процесса при контакте материала с кровью [26]).

Интенсивность резорбции образцов оценивалась по потере массы. Массы образцов до и после их выдерживания в модельных растворах представлены в таблицах 3-6.

Таблица 3 – Масса образцов 1 группы до и после моделирования резорбции in vitro ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г					
	Дистиллированная вода, г		Фосфатный буфер, г		Реактив Фентона, г	
	до	после	до	после	до	после
1	0,0475	0,0444	0,0484	0,0404	0,0476	0,0255
2	0,048	0,0464	0,0469	0,0395	0,0478	0,0207
3	0,046	0,0445	0,0479	0,0419	0,0481	0,0267
4	0,0494	0,0469	0,0478	0,0413	0,0463	0,0265
5	0,0476	0,0436	0,0473	0,0403	0,0478	0,0204
Сред. значение	0,0477	0,0452	0,0476	0,0407	0,0474	0,024

Средняя масса образцов 1 группы до выдерживания в дистиллированной воде составила 0,0477 г, после – 0,0452 г. Средняя масса образцов до выдерживания в растворе фосфатного буфера составила 0,0476 г,

после – 0,0407 г. Средняя масса образцов до выдерживания в реактиве Фентона составила 0,0474 г, после выдерживания – 0,024 г.

Таблица 4 – Масса образцов 2 группы до и после моделирования резорбции in vitro ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г					
	Дистиллированная вода, г		Фосфатный буфер, г		Реактив Фентона, г	
	до	после	до	после	до	после
1	0,046	0,0457	0,0478	0,0401	0,0476	0,0314
2	0,0492	0,044	0,0486	0,043	0,0478	0,0306
3	0,0475	0,0441	0,0473	0,0415	0,0473	0,0292
4	0,049	0,0441	0,0472	0,0412	0,0484	0,028
5	0,0465	0,0446	0,0481	0,0407	0,0481	0,0316
Сред. значение	0,0476	0,0445	0,0478	0,0413	0,0478	0,0302

Средняя масса образцов 2 группы до выдерживания в дистиллированной воде составила 0,0476 г, после – 0,0445 г. Средняя масса образцов до выдерживания в растворе фосфатного буфера составила 0,0478 г, после – 0,0413 г. Средняя масса образцов до выдерживания в реактиве Фентона составила 0,0478 г, после – 0,0302 г.

Таблица 5 – Масса образцов 3 группы до и после моделирования резорбции in vitro ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г					
	Дистиллированная вода, г		Фосфатный буфер, г		Реактив Фентона, г	
	до	после	до	после	до	после
1	0,0466	0,0455	0,0463	0,0424	0,0471	0,0179
2	0,0464	0,0453	0,0474	0,0425	0,0468	0,0172
3	0,0484	0,0448	0,0476	0,0406	0,047	0,0182
4	0,0479	0,0453	0,0467	0,0426	0,0485	0,0194
5	0,0479	0,044	0,0483	0,0437	0,049	0,0197
Сред. значение	0,0474	0,045	0,0472	0,0424	0,0476	0,0185

Средняя масса образцов 3 группы до выдерживания в дистиллированной воде составила 0,0474 г, после – 0,045 г. Средняя масса образцов до выдерживания в растворе фосфатного буфера составила 0,0472 г, после – 0,0424 г. Средняя масса образцов до выдерживания в реактиве Фентона составила 0,0476 г, после – 0,0185 г.

Таблица 6 – Масса образцов 4 группы до и после моделирования резорбции in vitro ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г					
	Дистиллированная вода, г		Фосфатный буфер, г		Реактив Фентона, г	
	до	после	до	после	до	после
1	0,0472	0,0451	0,0477	0,0423	0,0471	0,0207
2	0,0495	0,0445	0,0479	0,0403	0,0491	0,0202
3	0,0454	0,0444	0,0487	0,0439	0,0485	0,02
4	0,0453	0,0447	0,0463	0,0409	0,0465	0,0219
5	0,0466	0,0443	0,0468	0,043	0,047	0,0215
Сред. значение	0,0468	0,0448	0,0474	0,0421	0,0476	0,0209

Средняя масса образцов 4 группы до выдерживания в дистиллированной воде составила 0,0468 г, после – 0,0448 г. Средняя масса образцов до выдерживания в растворе фосфатного буфера составила 0,0474 г, после – 0,0421 г. Средняя масса образцов до выдерживания в реактиве Фентона составила 0,0476 г, после – 0,0209 г.

Остаточные массы образцов в процентном содержании от первоначальных значений представлены на рисунках 4 – 7.

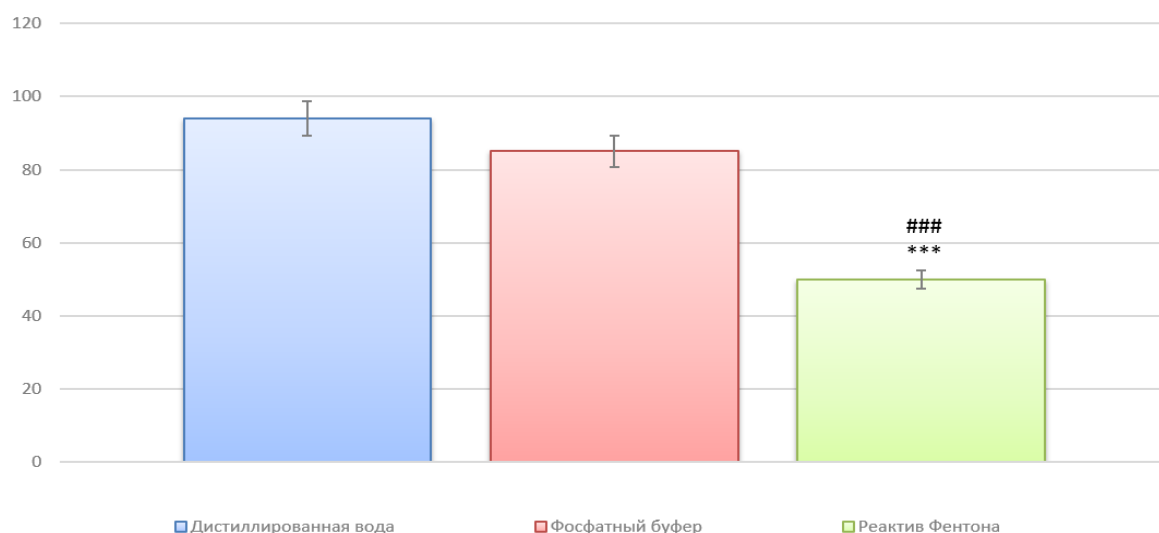


*Рисунок 4. Остаточные массы образцов 1 группы после инкубации в модельных средах (% , $M \pm t$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно образцов в дистиллированной воде, ### – $p < 0,005$ относительно образцов в фосфатном буфере*

На рисунке 5 можно увидеть, что достоверных отличий после выдерживания образцов в дистиллированной воде и растворе фосфатного буфера не обнаружено. После выдерживания образцов в реактиве Фентона мы наблюдаем значительное снижение массы. Аналогичную ситуацию можно наблюдать и в последующих группах образцов.

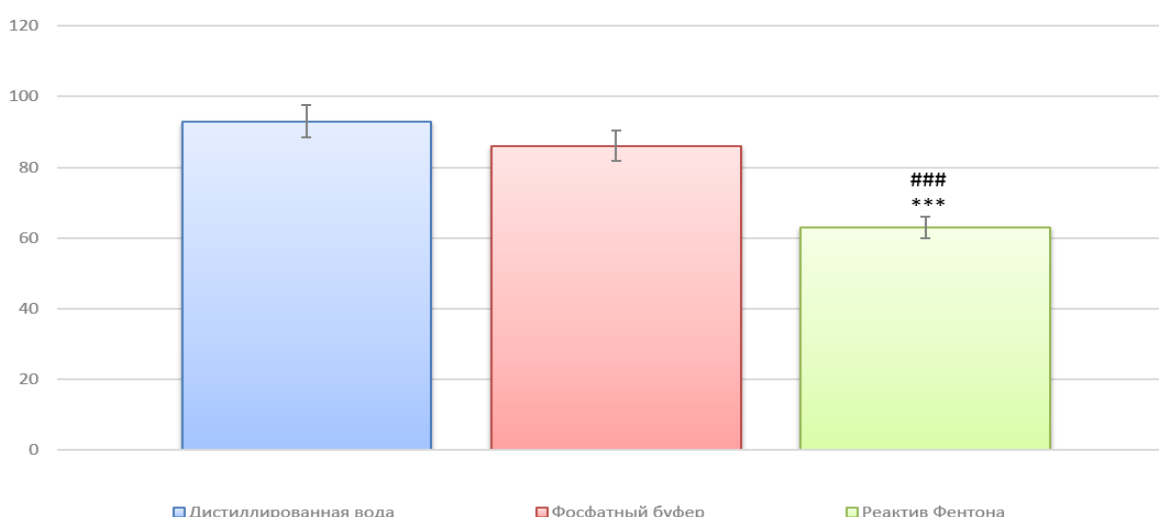


*Рисунок 5. Остаточные массы образцов 2 группы до и после инкубации в модельных средах (% , $M \pm t$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно*

образцов в дистиллированной воде, ### – $p < 0,005$ относительно образцов в фосфатном буфере

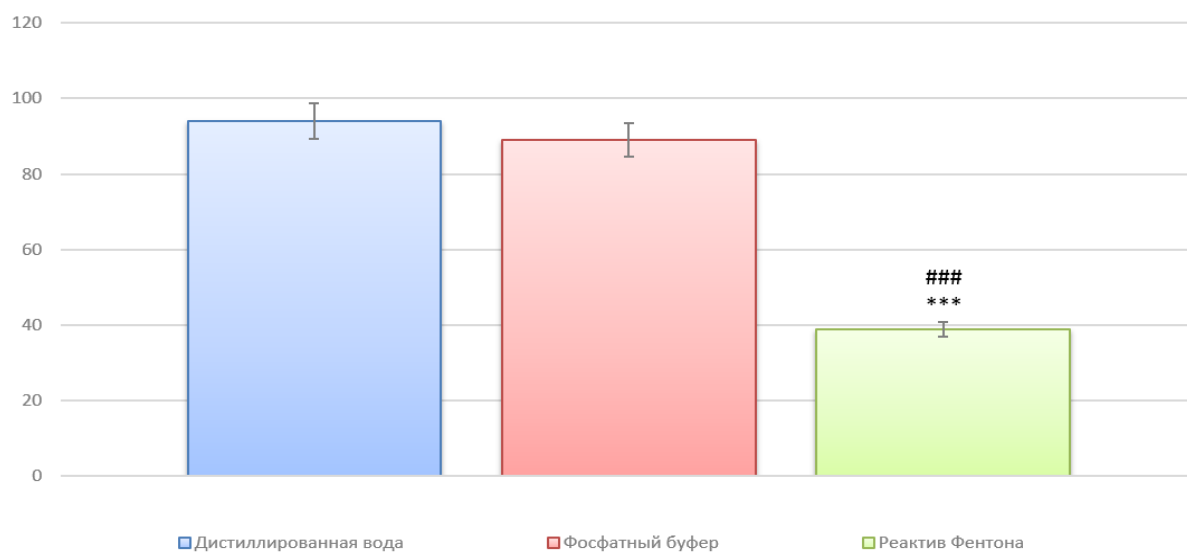


Рисунок 6. Остаточные массы образцов 3 группы до и после инкубации в модельных средах (% , $M \pm m$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно образцов в дистиллированной воде, ### – $p < 0,005$ относительно образцов в фосфатном буфере

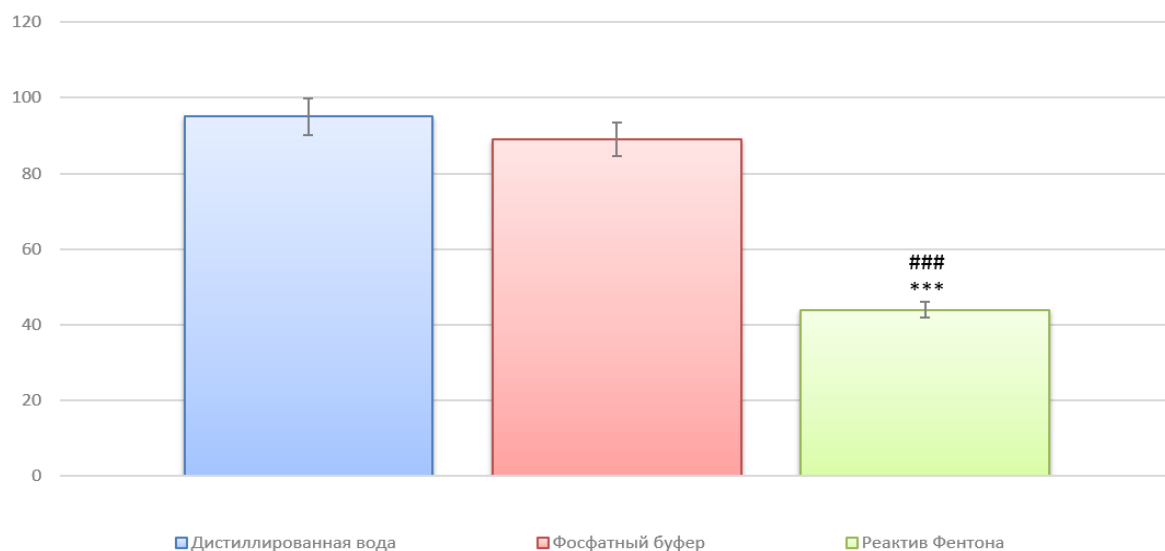


Рисунок 7. Остаточные массы образцов 4 группы до и после инкубации в модельных средах (% , $M \pm m$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно образцов в дистиллированной воде, ### – $p < 0,005$ относительно образцов в фосфатном буфере

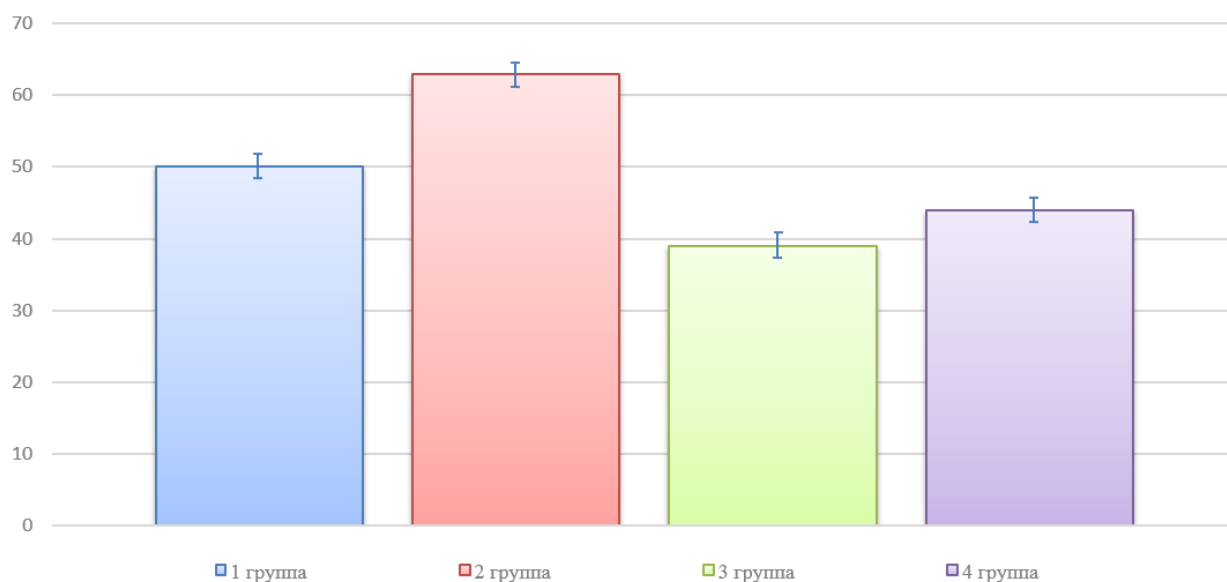


Рисунок 8. Потеря масс образцов после инкубации в модельной среде (% , $M \pm m$, $n=5$)

Исследования показали, что для 3 группы наблюдается максимальная потеря массы образцов, она составила 39%. Минимальная потеря массы образцов наблюдается у 2 группы, она составила 63%. 1 и 4 группа имели среднее значение в 50% и 44%.

При обработке раствором детергента наблюдалось более сильное разрушение матрикса. Рекомендуется обработка гипертоническими и гипотоническими растворами солей, так как она не приводит к значительным разрушениям матрикса. Но всё же выбор обработки будет зависеть от конкретных требований к материалу.

Для всех экспериментальных групп образцов проводили исследование скорости их резорбции и интенсивности кальцификации *in vitro*. С подслизистой тонкой кишки свиньи исследования *in vivo* затруднены, так как быстро происходит процесс резорбции, ткань прорастает и врастает в орган реципиента, в следствие чего ее трудно отсоединить, и потому она может найти своё применение в качестве заплаток, но не клапанов. Следовательно,

данные обработки для клапанов не подойдут, так как появится необходимость в их частой смене.

3.4 Результаты исследования влияния концентрации сшивающего агента на скорость резорбции

Для оценки влияния концентрации сшивающего агента, применяемого для стабилизации, на скорость резорбции биоматериала было подготовлено несколько групп образцов:

5 группа – без сшивающего агента

6 группа – обработка раствором 0,1 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида

7 группа – обработка раствором 0,25 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида

8 группа – обработка раствором 0,5 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида

Результаты исследования влияния концентрации сшивающего агента на скорость резорбции представлены в таблицах 7-10.

Таблица 7 – Масса образцов 5 группы до и после моделирования резорбции in vitro ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г					
	Дистиллированная вода, г		Фосфатный буфер, г		Реактив Фентона, г	
	до	после	до	после	до	после
1	0,0472	0,043	0,0471	0,0406	0,0467	0,023
2	0,0465	0,0407	0,0468	0,0396	0,0474	0,0209
3	0,0469	0,043	0,0474	0,0404	0,0473	0,023
4	0,0473	0,0414	0,0469	0,0408	0,0474	0,0232
5	0,0474	0,0421	0,0473	0,0403	0,0469	0,0216
Сред. значение	0,047	0,04204	0,0471	0,04034	0,0471	0,02234

Средняя масса образцов 5 группы до выдерживания в дистиллированной воде составила 0,04706 г, после – 0,04204 г. Средняя масса образцов до выдерживания в фосфатном буфере составила 0,0471 г, после – 0,04034 г. Средняя масса образцов до выдерживания в реактиве Фентона составила 0,0471 г, после – 0,02234 г.

Таблица 8 – Масса образцов 6 группы до и после моделирования резорбции in vitro ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г					
	Дистиллированная вода, г		Фосфатный буфер, г		Реактив Фентона, г	
	до	после	до	после	до	после
1	0,0479	0,0439	0,0467	0,0415	0,0476	0,0273
2	0,0456	0,0419	0,0476	0,0402	0,0483	0,0276
3	0,0451	0,0422	0,0468	0,0399	0,0457	0,0242
4	0,0486	0,0437	0,0482	0,0412	0,0475	0,0265
5	0,0484	0,0442	0,0483	0,0402	0,0468	0,0268
Сред. значение	0,0471	0,0432	0,0475	0,0406	0,0471	0,0265

Средняя масса образцов 6 группы до выдерживания в дистиллированной воде составила 0,0471 г, после – 0,0432 г. Средняя масса образцов до выдерживания в фосфатном буфере составила 0,0475 г, после – 0,0406 г. Средняя масса образцов до выдерживания в реактиве Фентона составила 0,0471 г, после – 0,0265 г.

Таблица 9 – Масса образцов 7 группы до и после моделирования резорбции in vitro ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г					
	Дистиллированная вода, г		Фосфатный буфер, г		Реактив Фентона, г	
	до	после	до	после	до	после
1	0,0492	0,043	0,048	0,0397	0,0483	0,0277
2	0,047	0,0446	0,0473	0,0405	0,0476	0,0272
3	0,0495	0,0401	0,047	0,041	0,0474	0,0276
4	0,0474	0,0431	0,0482	0,0417	0,0478	0,0273
5	0,0477	0,0429	0,0487	0,0392	0,0482	0,0278
Сред. значение	0,0482	0,0427	0,0478	0,0404	0,0478	0,0275

Средняя масса образцов 7 группы до выдерживания в дистиллированной воде составила 0,0482 г, после – 0,0427 г. Средняя масса образцов до выдерживания в фосфатном буфере составила 0,0478 г, после – 0,0404 г. Средняя масса образцов до выдерживания в реактиве Фентона составила 0,0478 г, после – 0,0275 г.

Таблица 10 – Масса образцов 8 группы до и после моделирования резорбции *in vitro* ($M \pm m$, $n=5$)

№ образца	Масса образца, г					
	Дистиллированная вода, г		Фосфатный буфер, г		Реактив Фентона, г	
	до	после	до	после	до	после
1	0,0489	0,0435	0,0484	0,0408	0,0467	0,0328
2	0,0462	0,0442	0,0474	0,0407	0,0487	0,0355
3	0,0483	0,0422	0,0475	0,039	0,0472	0,034
4	0,0487	0,0429	0,0488	0,0391	0,0477	0,0355
5	0,0461	0,0407	0,0472	0,041	0,0473	0,034
Сред. значение	0,0476	0,0427	0,0478	0,0401	0,0475	0,0344

Средняя масса образцов 8 группы до выдерживания в дистиллированной воде составила 0,0476 г, после – 0,0427 г. Средняя масса образцов до выдерживания в фосфатном буфере составила 0,0478 г, после – 0,0401 г. Средняя масса образцов до выдерживания в реактиве Фентона составила 0,0475 г, после – 0,0344 г.

Остаточные массы образцов в процентном содержании от первоначальных значений представлены на рисунках 9 – 12.

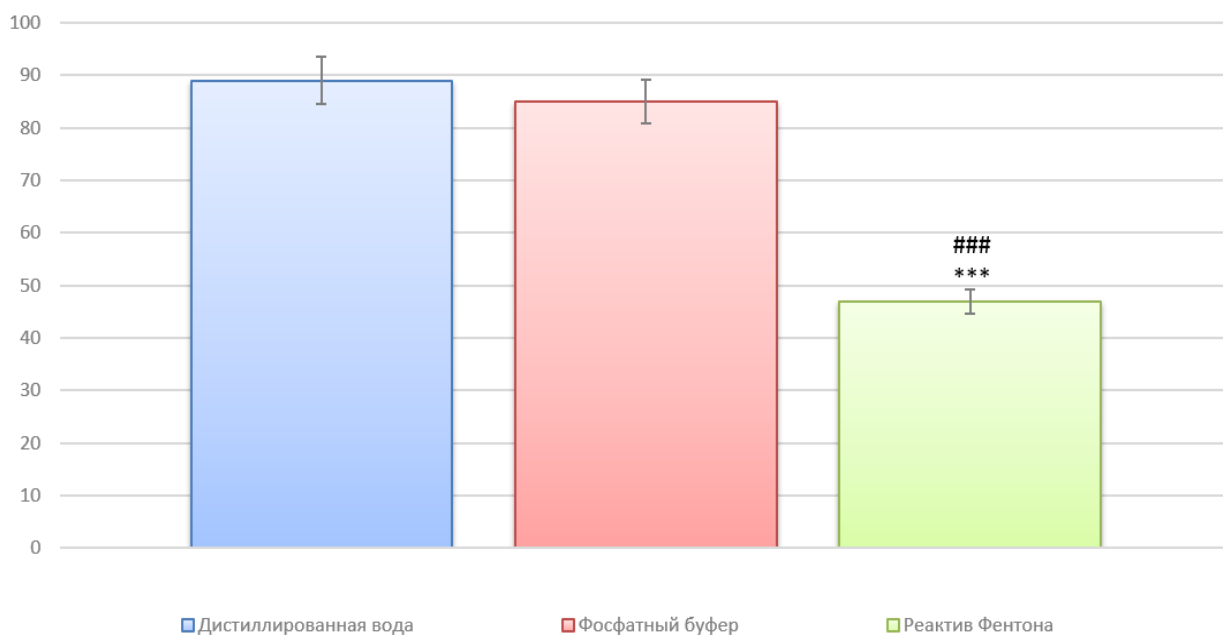


*Рисунок 9. Остаточные массы образцов 5 группы до и после инкубации в модельных средах (% , $M \pm m$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно образцов в дистиллированной воде, ### – $p < 0,005$ относительно образцов в фосфатном буфере*

На рисунке 9 можно увидеть, что достоверных отличий после выдерживания образцов в дистиллированной воде и растворе фосфатного буфера не обнаружено. После выдерживания образцов в реактиве Фентона мы наблюдаем значительное снижение массы. Аналогичную ситуацию можно наблюдать и в последующих группах образцов.

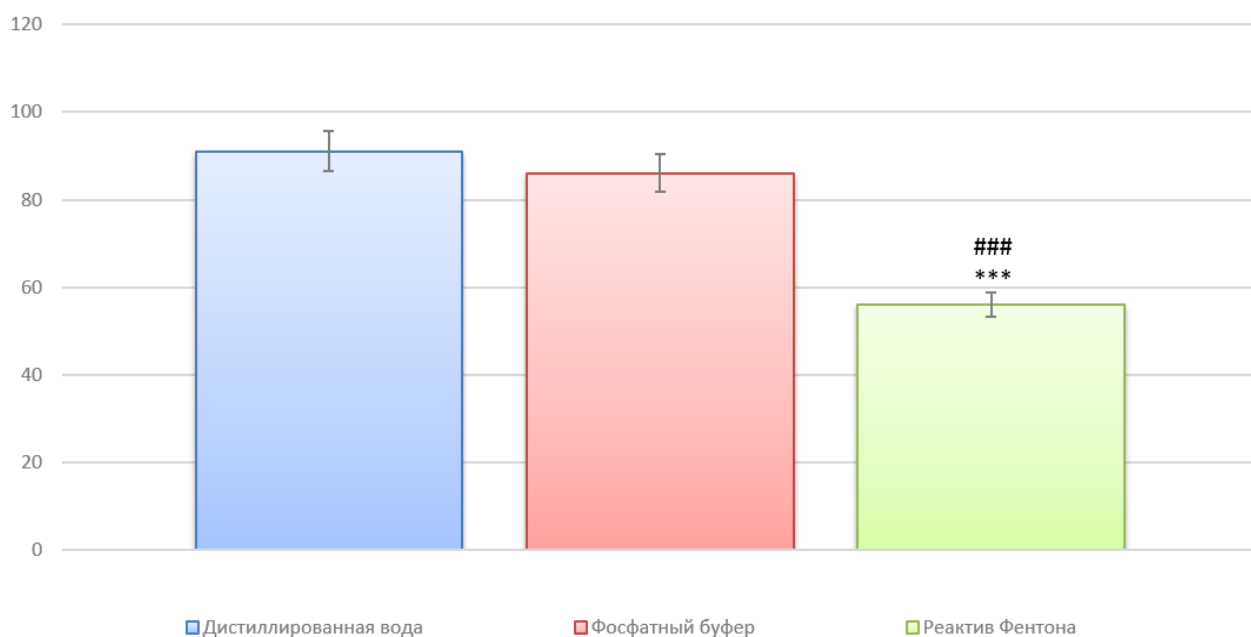


Рисунок 10. Остаточные массы образцов 6 группы до и после инкубации в модельных средах (% , $M \pm t$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно образцов в дистиллированной воде, ### – $p < 0,005$ относительно образцов в фосфатном буфере

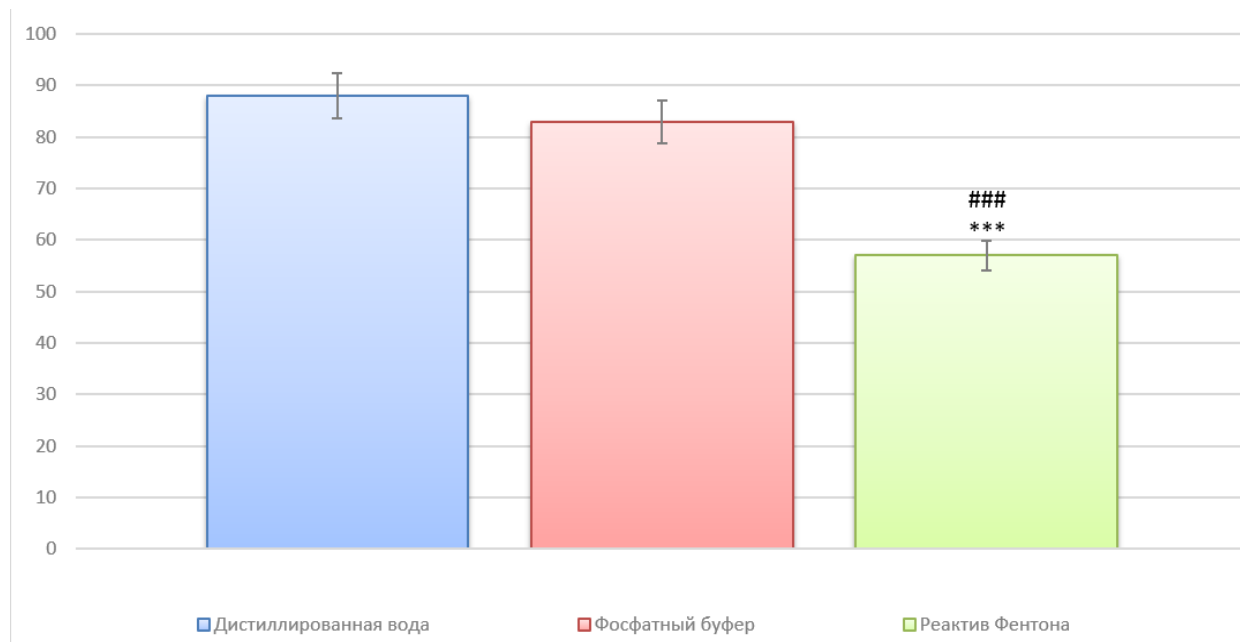


Рисунок 11. Остаточные массы образцов 7 группы до и после инкубации в модельных средах (% , $M \pm t$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно образцов в дистиллированной воде, ### – $p < 0,005$ относительно образцов в фосфатном буфере

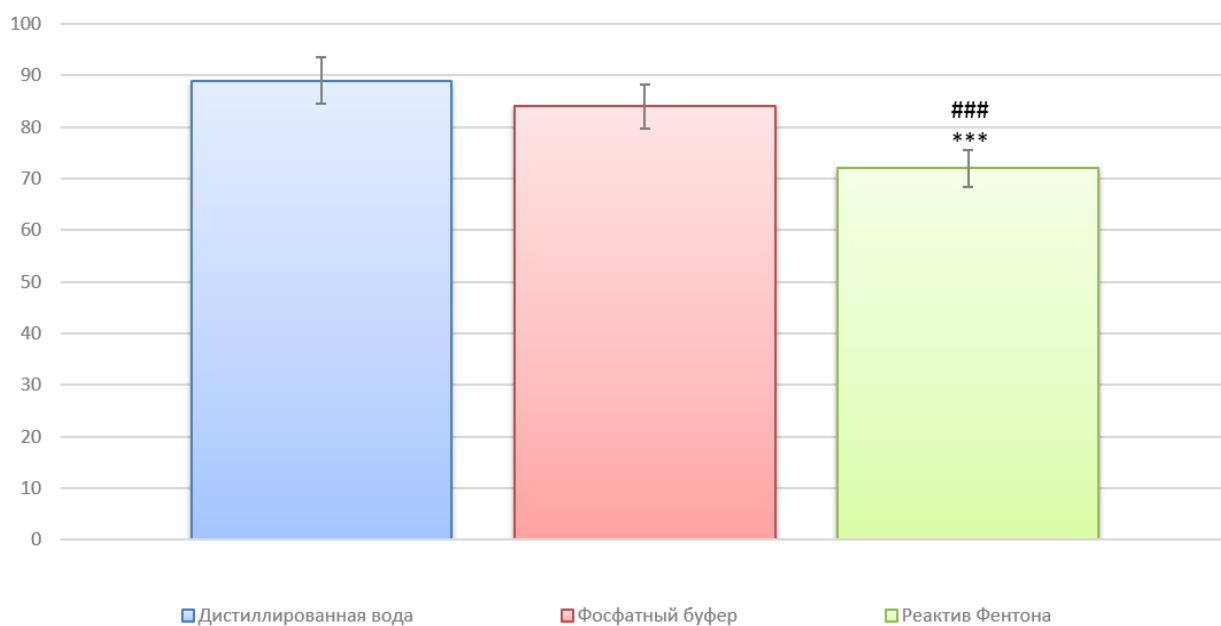


Рисунок 12. Остаточные массы образцов 8 группы до и после инкубации в модельных средах (% , $M \pm m$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно образцов в дистиллированной воде, ### – $p < 0,005$ относительно образцов в фосфатном буфере

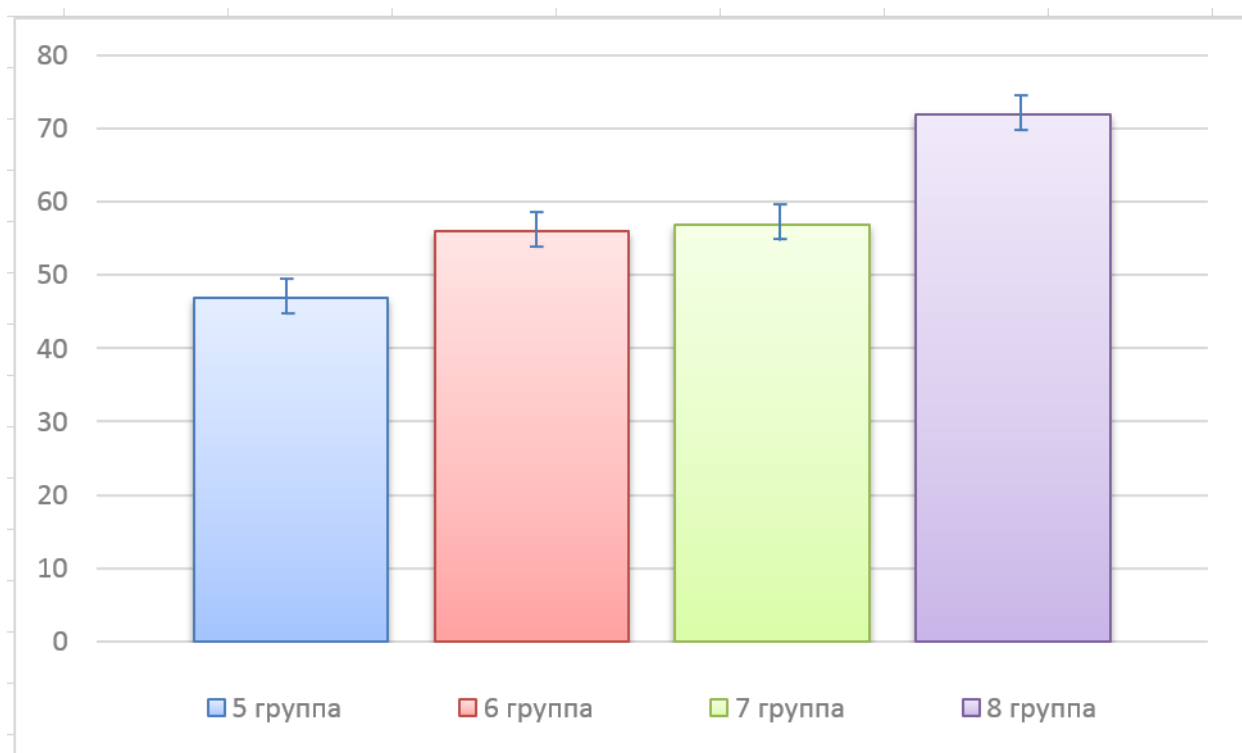


Рисунок 13. Потеря масс образцов после инкубации в модельной среде (% , $M \pm m$, $n=5$)

Исследования показали, что для 5 группы наблюдается максимальная потеря массы образцов, она составила 47%. Минимальная потеря массы образцов наблюдается у 8 группы, она составила 72%. 6 и 7 группа имели среднее значение в 56% и 57%.

При обработке раствором без сшивающего агента наблюдалось более сильное разрушение матрикса. Рекомендуется обработка раствором 0,5 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида, так как она не приводит к значительным разрушениям матрикса. Но всё же выбор обработки будет зависеть от конкретных требований к материалу.

3.5 Результаты моделирования кальцификации *in vitro*.

Под кальцификацией образцов понималось образование кальцийсодержащих отложений на поверхности или в объеме имплантируемых изделий. Исследование кальцификации является актуальным в связи с тем, что избыточное накопление кальция приводит к потере функциональных свойств клапанов и необходимости их замены, а также тромбообразованию и его последствиям. В нашем случае необходимо подобрать такой метод обработки материала, который позволил бы минимизировать образование кальцийсодержащих образований. Также наличие кальцификации служит индикатором токсичности материала – чем более токсичный материал, тем выше кальцификация.

На накопление кальция влияют не только такие факторы как состав кальцийсодержащих отложений, физико-химические свойства материала, локализация отложений, но и наличие клеток. Гибель клеток приводит к изменению концентрации кальция, фосфора, липидов, белков и ферментов. Такое изменение приводит к отложению растворимых форм фосфатов кальция и при определенных условиях они становятся нерастворимыми. За счет гибели клеток в среде фрагментов появляются клеточные мембраны, которые образуют везикулы. Внутри полученной структуры образуются

кристаллы фосфатов. Места адсорбции кристаллов фосфатов и служат центрами последующего образования кальцификации.

Результаты определения содержания кальция и фосфора в образцах до и после инкубации представлены в таблицах 10-11.

Таблица 11 – Содержание кальция в образцах биоматериала до и после моделирования кальцификации in vitro (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$)

Группа	До инкубации, мг на г ткани	Инкубация 4 недели, мг на г ткани
1 группа	$12,73 \pm 0,47$	$36,24 \pm 1,84$
2 группа	$11,38 \pm 0,68$	$35,26 \pm 1,96$
3 группа	$11,45 \pm 0,75$	$36,75 \pm 1,76$
4 группа	$10,98 \pm 0,5$	$35,36 \pm 1,93$

Таблица 12 – Содержание фосфора в образцах биоматериала до и после моделирования кальцификации in vitro (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$)

Группа	До инкубации, мг на г ткани	Инкубация 4 недели, мг на г ткани
1 группа	$9,18 \pm 0,41$	$23,49 \pm 1,31$
2 группа	$8,97 \pm 0,36$	$25,27 \pm 1,25$
3 группа	$8,53 \pm 0,47$	$24,51 \pm 1,33$
4 группа	$9,8 \pm 0,48$	$24,74 \pm 1,27$

Результаты исследования содержания кальция и фосфора в образцах биоматериала до и после моделирования кальцификации in vitro представлены на рисунках 14 – 15.

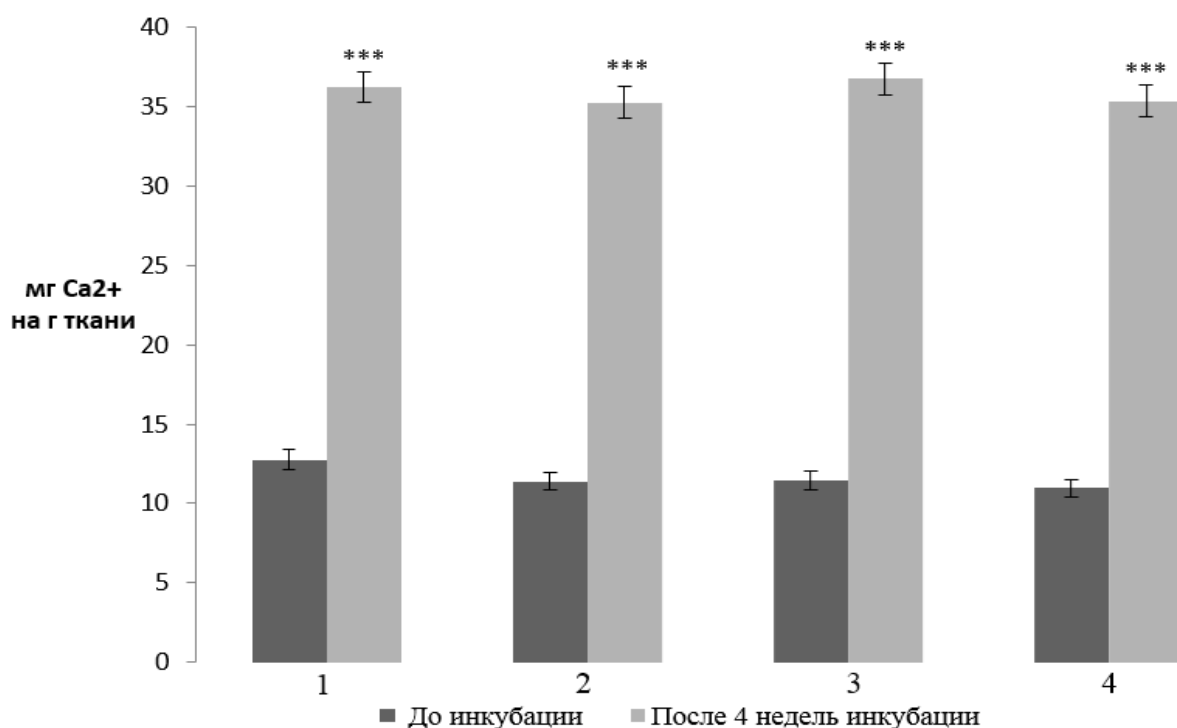


*Рисунок 14. Содержание кальция в образцах биоматериала до и после моделирования кальцификации in vitro (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации*

Группы 1, 2, 3 и 4 отличались между собой разными способами децеллюляризации. Через 4 недели после инкубации наблюдалось увеличение содержание кальция. Достоверных отличий в количественном содержании кальция между группами до инкубации не наблюдалось. Достоверных отличий в содержании кальция в образцах 1,2,3 и 4 групп после инкубации также не обнаружено.

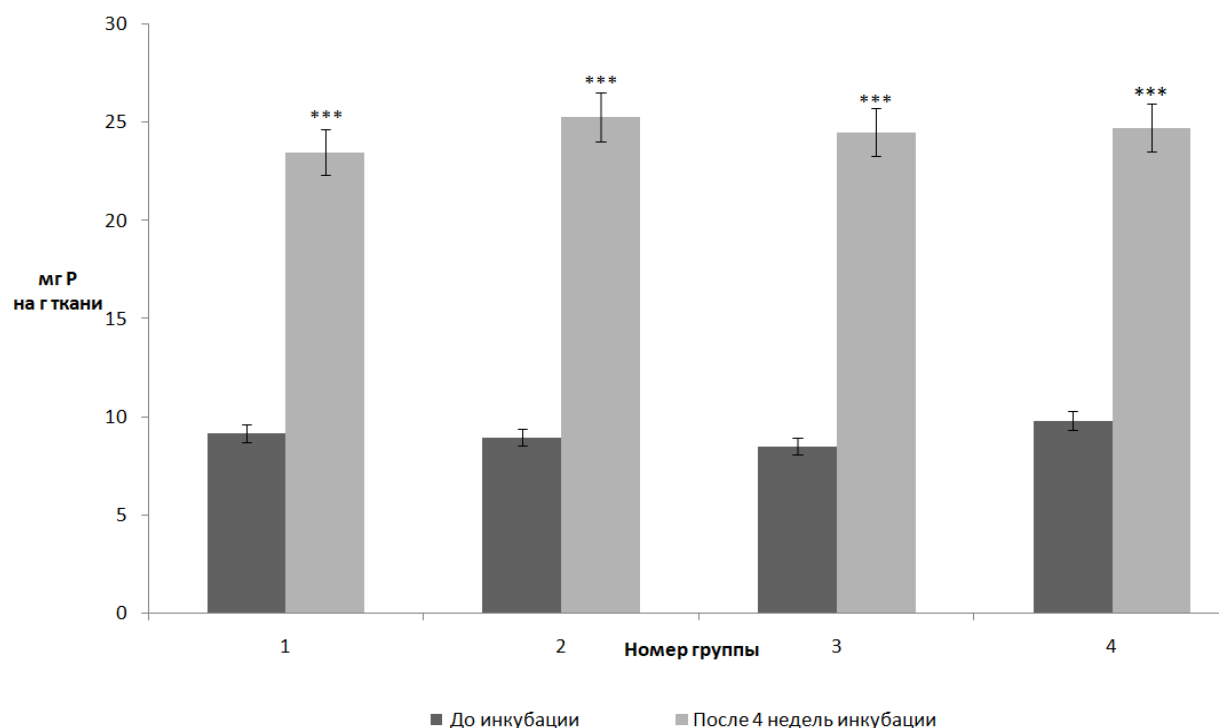


Рисунок 15. Содержание фосфора в образцах биоматериала до и после моделирования кальцификации *in vitro* (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации

Группы 1, 2, 3 и 4 отличались между собой разными способами децеллюляризации. Через 4 недели после инкубации наблюдалось увеличение содержания фосфора. Достоверных отличий в количественном содержании фосфора между группами до инкубации не наблюдалось. Достоверных отличий в содержании фосфора в образцах 1, 2, 3 и 4 групп после инкубации также не обнаружено.

Поскольку на накопление кальция влияют такие факторы как состав кальцийсодержащих отложений, физико-химические свойства материала, локализация отложений, важно изучить влияние различных параметров, а в нашем случае способа децеллюляризации на кальцификацию материала. По результатам исследования выявлено, что тип децеллюляризации не влияет на интенсивность кальцификации в условиях *in vitro*.

Результаты исследования влияния концентрации сшивающего агента на накопление кальция и фосфора в образцах представлены в таблицах 13 – 14.

Таблица 13 – Результаты исследования влияния концентрации сшивающего агента на накопление кальция (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$)

Группа	До инкубации, мг на г ткани	Инкубация 4 недели, мг на г ткани
5 группа	$10,94 \pm 0,5$	$39,34 \pm 1,81$
6 группа	$12,04 \pm 0,64$	$35,33 \pm 1,97$
7 группа	$11,23 \pm 0,64$	$30,26 \pm 1,84$
8 группа	$10,78 \pm 0,58$	$28,77 \pm 1,89$

Таблица 14 – Результаты исследования влияния концентрации сшивающего агента на накопление фосфора (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$)

Группа	До инкубации, мг на г ткани	Инкубация 4 недели, мг на г ткани
5 группа	$9,54 \pm 0,41$	$25,69 \pm 1,26$
6 группа	$7,43 \pm 0,42$	$21,17 \pm 1,27$
7 группа	$7,25 \pm 0,37$	$17,31 \pm 1,28$
8 группа	$8,43 \pm 0,36$	$15,54 \pm 1,23$

Результаты исследования влияния концентрации сшивающего агента на накопление кальция и фосфора в образцах биоматериала представлены на рисунках 16 – 17.

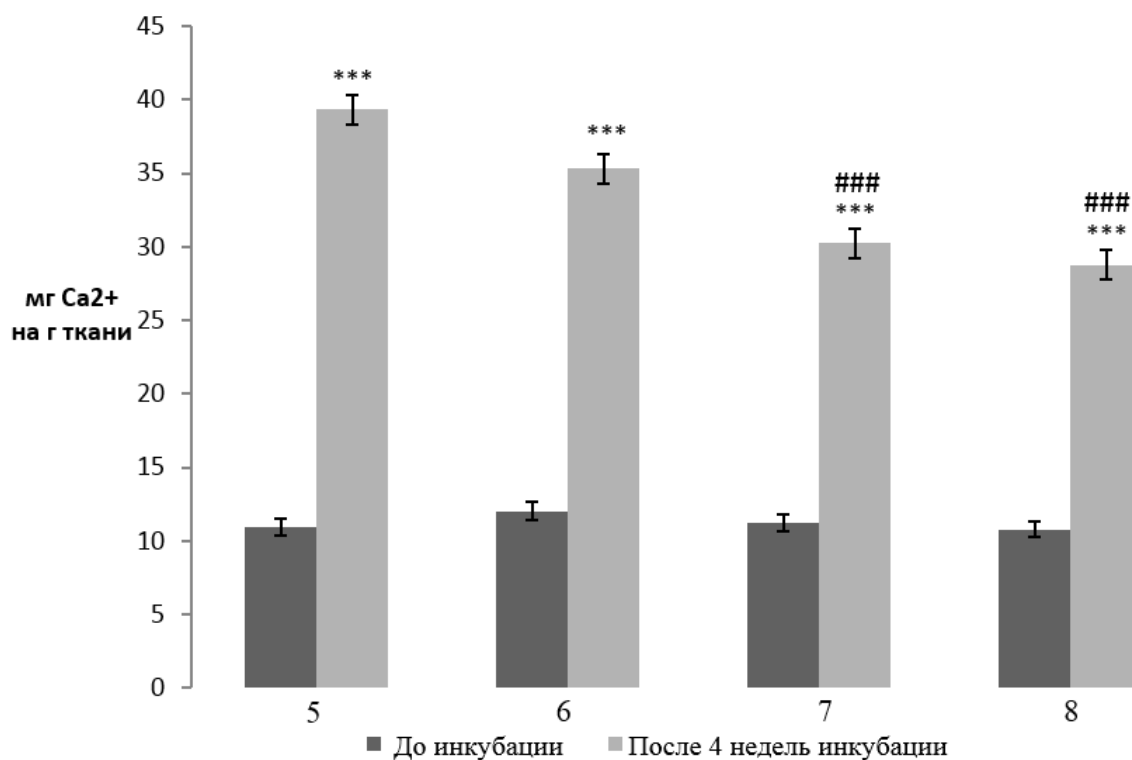


Рисунок 16. Влияние концентрации сшивающего агента на накопление кальция (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно содержания кальция до инкубации. ### – относительное содержание кальция без сшивающего агента относительно 5 группы

Данные группы, отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Достоверных отличий в количественном содержании кальция до инкубации не обнаружено. После инкубации наблюдалось снижение содержания кальция в 6 группе на 16%, в 7 группе на 32%, в 8 группе на 40% относительно 5 группы соответственно.

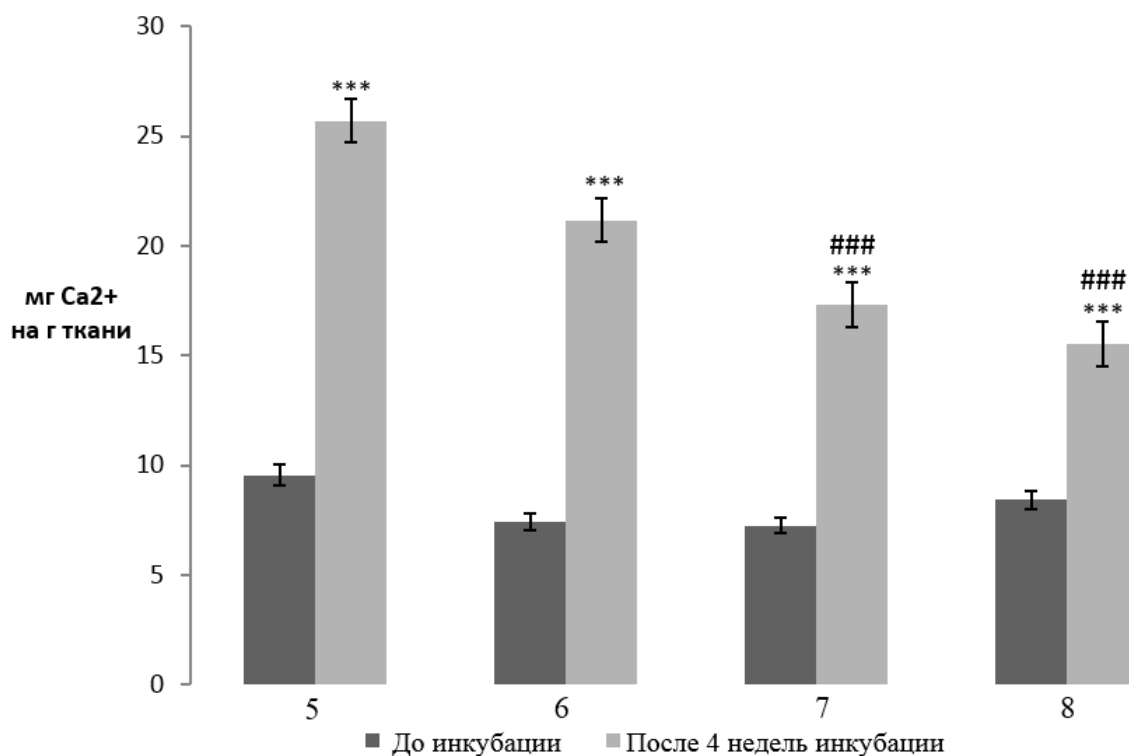


Рисунок 17. Влияние концентрации сшивающего агента на накопление фосфора (мг на г ткани, $M \pm m$, $n=5$). Здесь: *** – $p < 0,005$ относительно содержания фосфора до инкубации. ### – относительное содержание кальция без сшивающего агента относительно 5 группы

Данные группы, также отличались между собой концентрацией сшивающего агента, используемого для стабилизации биоматериала. Достоверных отличий в количественном содержании кальция до инкубации не обнаружено. После инкубации наблюдалось снижение содержания кальция в 6 группе на 11%, в 7 группе на 24%, в 8 группе на 29% относительно 5 группы соответственно.

Также важно изучить влияние концентрации сшивающего агента на кальцификацию материала. Исследования показали, что применение обработки раствором 0,5 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида приводит к снижению кальцификации образцов.

ВЫВОДЫ

1. Были получены экспериментальные образцы внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи с применением разных способов удаления клеток и разных концентраций сшивающего агента;

2. По результатам гистологического исследования материала методами световой и электронной микроскопии установлено отсутствие клеток и сохранность коллагеново-эластиновой структуры;

3. Выявлено, что обработка гипотоническим и гипертоническим растворами солей, а также обработка раствором 0,5 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида ведет к снижению резорбции;

4. Выявлено, что тип децеллюляризации не влияет на интенсивность кальцификации в условиях *in vitro*, а обработка раствором 0,5 мМ 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида приводит к снижению кальцификации образцов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ePTFE – политетрафторэтилен

MSC – мезенхимальные стволовые клетки

PU – полиуретан

ВКМ – внеклеточный коллагеновый матрикс

ИМ – инфаркт миокарда

ПТК – подслизистая тонкой кишки

ПЭТ – терефталат полиэтилена

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009 – 262 с.
2. Елисеев, Ю. Ю. Анализы. Полный справочник / Ю. Ю. Елисеев, Г. Р. Колоколов, Е. В. Герасина, О. Л. Ананьев, С. Ю. Шашлова, В. Н. Шилов, О. В. Ананьева, А. Ю. Полянина. – М.: Эксмо, 2009. – 768 с.
3. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – Спб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
4. Лакин, Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 312 с.
5. 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
6. Ando, M Ten-year experience with handmade trileaflet polytetrafluoroethylene valved conduit used for pulmonary reconstruction / M. Ando, Y. J. Takahashi // Thorac Cardiovasc Surg. – 2009. – № 137. – P. 124 – 131.
7. Androjna, C. Oxygen diffusion through natural extracellular matrices: implications for estimating "critical thickness" values in tendon tissue engineering / C. Androjna, J. E. Gatica, J. M. Belovich, K.A. Derwin // Tissue Eng Part A. – 2008. – № 14(4). – P. 559-569.
8. Apte, S.S. Current developments in the tissue engineering of autologous heart valves: moving towards clinical use / S.S. Apte, A. Paul, S. Prakash, D. Shum-Tim // Future Cardiol. – 2011. – №7(1). – P. 77-97.

9. ASM International. Materials and Coatings for Medical Devices: Cardiovascular. ASM International; OH, USA. – 2009. – P. 12-18.
10. Aumsuwan, N. Covalent attachment of multilayers on poly (tetrafluoroethylene) surfaces / N. Aumsuwan, S.H. Ye, W.R. Wagner, M.W. Urban // *Langmuir*. – 2011. – № 27. – P. 11106.
11. Badylak, S.F. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog // S.F.Badylak, G.C. Lantz, A. Coffey, L.A. Geddes // *J Surg Res*. – 1989. – № 47. – P. 74-80.
12. Badylak, S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Provides an in-depth description of the small intestine submucosa material that is emerging with high potential and few disadvantages for cardiovascular application / S.F. Badylak // *Biomaterials*. – 2007. – № 28(25). – P. 3587–3593.
13. Baum, C.L. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events / C.L. Baum, C.J. Arpey // *DermatolSurg*. – 2005. – № 31. – P. 674-686.
14. 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.
15. Braga-Vilela, A.S. Extracellular matrix of porcine pericardium: biochemistry and collagen architecture / A.S. Braga-Vilela, E.R. Pimentel, S. Marangoni, M.H. Toyama // *J Membr Biol*. – 2008. – № 221(1). – P. 15–25.
16. Braile, M.C. In vitro properties and performance of glutaraldehyde-crosslinked bovine pericardial bioprostheses treated with glutamic acid / M.C. Braile, N.C. Carnevalli, G. Goissis, V.A. Ramirez, D.M. Braile // *Artif Organs*. – 2011. – № 35(5). – P. 497–501.
17. Brown-Etris, M. A New Biomaterial Derived From Small Intestine Submucosa and Developed Into a Wound Matrix Device / M. Brown-Etris, D. William, C. Hiles // *Wounds*. – 2002. – № 14(4). – P. 150-166.

18. Byrne, G.W. Cardiac xenotransplantation: progress and challenges / G.W. Byrne, C.G. McGregor // *Curr Opin Organ Transplant.* – 2012. – № 17(2). – P. 148–154.
19. Cashman, T. J. Mesenchymal stem cells for cardiac therapy: practical challenges and potential mechanisms / T. J. Cashman, V. Gouon-Evans, K.D. Costa // *Stem Cell Rev.* – 2013. – № 9. – P. 254–265.
20. Chikwe, J. Prosthetic valve selection for middle-aged patients with aortic stenosis / J. Chikwe, F. Filsoufi, A.F. Carpentier // *Nat Rev Cardiol.* – 2010. – № 7(12). – P. 711–719.
21. Chiu, L.L. Engineering of oriented myocardium on three-dimensional micropatterned collagen–chitosan hydrogel / L.L. Chiu, K. Janic, M. Radisic // *Int J Artif Organs.* – 2012. – № 35(4). – P. 237–250.
22. Chiu, L.L. Controlled release of thymosin β 4 using collagen–chitosan composite hydrogels promotes epicardial cell migration and angiogenesis / L.L. Chiu, M. Radisic // *J Control Release.* – 2011. – № 155(3). – P. 376–385.
23. Cigliano, A. Fine structure of glycosaminoglycans from fresh and decellularized porcine cardiac valves and pericardium / A. Cigliano, A. Gandaglia, A.J. Lepedda // *Biochem Res Int.* – 2012. – № 20. – P. 979.
24. Klinkmann, H. Consensus conference on biocompatibility / H. Klinkmann, A.M. Davison // *Nephrol. Dial. Transplant., Oxford, Oxford University.* – 1994. – № 9(2). – P. 32–40.
25. Dainese, L. Heart valve engineering: decellularized aortic homograft seeded with human cardiac stromal cells / L. Dainese, A. Guarino, I. Burba // *J Heart Valve Dis.* – 2012. – № 21(1). – P. 125–134.
26. Dalmau, M.J. Hemodynamic performance of the Medtronic Mosaic and Perimount Magna aortic bioprostheses: five-year results of a prospectively randomized study / M.J. Dalmau, J.M. González-Santos, J.A. Blázquez // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2011. – № 39(6). – P. 844–852.
27. Deng, C. Vascularization of collagen–chitosan scaffolds with circulating progenitor cells as potential site for islet transplantation / C. Deng, B. Vulesevic,

C. Ellis, G.S. Korbitt, E.J. Suuronen // J Control Release. – 2011. – № 152(1). – P. 196–198.

28. Doble, M. Analysis of explanted ePTFE cardiovascular grafts (modified BT shunt) / M. Doble, N. Makadia, S. Pavithran, R.S. Kumar // Biomed Mater. – 2008. – № 3. – P. 118.

29. Dohmen, P.M. Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve / P.M. Dohmen, A. Lembcke, S. Holinski, A. Pruss, W. Konertz // Ann Thorac Surg. – 2011. – № 92(4). – P.1308–1314.

30. Eschenhagen, T. Physiological aspects of cardiac tissue engineering / T. Eschenhagen, A. Eder, I. Vollert, A. Hansen // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2012. – № 303(2). – P.133–143.

31. Gallo, R.L. Proteoglycans and cutaneous vascular defense and repair / R.L. Gallo // J Invest Dermatol Symp Proc. – 2000. – №5. – P. 55-60.

32. Goissis, G. Preparation and characterization of an acellular bovine pericardium intended for manufacture of valve bioprostheses / G. Goissis, Ade F. Giglioti, D.M. Braile // Artif Organs. – 2011. – № 35(5). – P. 484–489.

33. Guldner, N.W. Nanocoating with titanium reduces iC3b- and granulocyte-activating immune response against glutaraldehyde-fixed bovine pericardium: a new technique to improve biologic heart valve prosthesis durability? / N.W. Guldner, F. Bastian, G.J. Weigel // Thorac Cardiovasc Surg. – 2012. – № 143(5). –P. 1152–1159.

34. Gupta, V. Synthesis of glycosaminoglycans in differently loaded regions of collagen gels seeded with valvular interstitial cells / V. Gupta, J.A. Werdenberg, T.L. Blevins, K.J. Grande-Allen // Tissue Eng. – 2007. – № 13(1). – P. 41–49.

35. Haraguchi, Y. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro / Y. Haraguchi, T. Shimizu, T. Sasagawa // Nat Protoc. – 2012. – № 7(5). – P. 850–858.

36. Hodde, J.P. Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement / J.P. Hodde, S.F. Badylak, A.O. Brightman, S.L. Voytik-Harbin // Tissue Eng. – 1996. – № 2. – P. 209-217.

37. Hodges, A.M. Late antibody-mediated rejection after heart transplantation following the development of de novo donor-specific human leukocyte antigen antibody / A.M. Hodges, H. Lyster, A. McDermott // Transplantation. – 2012. – №93(6). – P. 650–656.

38. Hughes, C.S. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture / C.S. Hughes, L.M. Postovit, G.A. Lajoie // Proteomics. – 2010. – № 10(9). – P. 1886–1890.

39. Hurst, R. E. Mapping of the distribution of significant proteins and proteoglycans in small intestinal submucosa by fluorescence microscopy / R. E. Hurst, R. B. Bonner // J Biomater Sci Polym Ed. – 2001. – № 12. – P. 1267-1279.

40. Inoue, H. Right hemi-reconstruction of the left atrium using two equine pericardial patches for recurrent malignant fibrous histiocytoma: report of a case / H. Inoue, Y. Iguro, H. Matsumoto, M. Ueno, A. Higashi, R. Sakata // Surg Today. – 2009. – № 39(8). – P. 710–712.

41. Jensen, N. Endothelial cell seeded dacron aortobifurcated grafts: platelet deposition and long-term follow-up / N. Jensen, B. Lindblad, D. Bergqvist // J Cardiovasc Surg (Torino). –1994. – № 35(5). – P. 425–429.

42. Karam, J.P. Combining adult stem cells and polymeric devices for tissue engineering in infarcted myocardium / J.P. Karam, C. Muscari, C.N. Montero-Menei// Biomaterials. – 2012. – № 33(23). – P. 5683–5695.

43. Kin, H. Experimental study on effective application of fibrin glue / H. Kin, T. Nakajima, H. Okabayashi // Gen Thorac Cardiovasc Surg. –2012. – № 60(3). –P. 140–144.

44. Knoll, L. D. Use of porcine small intestinal submucosal graft in the surgical management of Peyronie's disease / L. D. Knoll // Urology. – 2001. – № 57. – P. 753-757.

45. Konertz, W. Right ventricular outflow tract reconstruction with decellularized porcine xenografts in patients with congenital heart disease / W. Konertz, E. Angeli, G. Tarusinov // J Heart Valve Dis. – 2011. – № 20(3). – P. 341–347.

46. Kütting, M. Polyurethane heart valves: past, present and future / M. Kütting, J. Roggenkamp, U. Urban, T. Schmitz-Rode, U. Steinseifer // Expert Rev Med Devices. – 2011. – № 8(2). – P. 227–233.

47. Laflamme, M.A. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts / M.A. Laflamme, K.Y. Chen, A.V. Naumova // Nat Biotechnol. – 2007. – № 25(9). – P. 1015–1024.

48. Law, K.B. Pulmonary valve-in-valve implants: how long do they prolong reintervention and what causes them to fail? / K.B. Law, K.R. Phillips, J. Butany // Cardiovasc Pathol. – 2012. – №10. – P. 1016.

49. Liao, K. Bovine pericardium versus porcine aortic valve: comparison of tissue biological properties as prosthetic valves / K. Liao, E. Seifter, D. Hoffman, E.L. Yellin, R.W. Frater // Artif Organs. – 1992. – №16(4). – P. 361–365.

50. Lindberg, K. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins / K. Lindberg, S. F. Badylak // Burns. – 2001. – № 27(3). – P. 254-266.

51. Liu, Y. Preparation and evaluation of oleoyl–carboxymethy–chitosan (OCMCS) nanoparticles as oral protein carriers / Y. Liu, X.J. Cheng, Q.F. Dang // J Mater Sci Mater Med. –2012. – № 23(2). – P. 375–384.

52. Liu, Z. The influence of chitosan hydrogel on stem cell engraftment, survival and homing in the ischemic myocardial microenvironment / Z. Liu, H. Wang, Y. Wang // Biomaterials. – 2012. – № 33(11). – P. 3093–3106.

53. Maya, I.D. Increased risk of infection associated with polyurethane dialysis grafts / I.D. Maya, J. Weatherspoon, C.J. Young, J. Barker, M. Allon // Semin Dial. –2007. – № 20(6). – P. 616–620.

54. McDevitt, C. A. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa / C. A. McDevitt, G. M. Wildey, R.M. Cutrone // J Biomed Mater Res A. – 2003. – № 67. – P. 637-640.

55. McGregor, C.G. Cardiac xenotransplantation technology provides materials for improved bioprosthetic heart valves / C.G. McGregor, A. Carpentier, N. Lila, J.S. Logan, G.W. Byrne // J Thorac Cardiovasc Surg. – 2011. – № 141(1). – P. 269–275.

56. Mewaldt, R. Enzymatic degradation study of single layer and multi-layer small intestinal submucosa (SIS) matrices / R. Mewaldt, L. Shi, D. Carson // Poster presented as part of the Wound Healing Society Annual Meeting, Dallas, TX. – 2011. – № 15(3). – P. 14-17.

57. Miyazaki, T. Expanded polytetrafluoroethylene conduits and patches with bulging sinuses and fan-shaped valves in right ventricular outflow tract reconstruction: multicenter study in Japan / T. Miyazaki, M. Yamagishi, Y. Maeda // J Thorac Cardiovasc Surg. – 2011. – № 142(5). – P. 1122–1129.

58. Miyazaki, T. Expanded polytetrafluoroethylene valved conduit and patch with bulging sinuses in right ventricular outflow tract reconstruction / T. Miyazaki, M. Yamagishi, A. Nakashima // J Thorac Cardiovasc Surg. – 2007. – № 134(2). – P. 327–332.

59. Mostow, E.N. Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial / E.N. Mostow, G.D. Haraway, M. Dalsing, J.P. Hodde, D. King // J Vasc Surg. – 2005. – № 41. – P. 837-843.

60. Mulloy, B. Cytokines and proteoglycans: an introductory overview / B. Mulloy, C.C. Rider // BiochemSoc Trans. – 2006. – № 34. – P. 409-413.

61. Nagano, N. Mechanical properties and microscopic findings of a Dacron graft explanted 27 years after coarctation repair / N. Nagano, R. Cartier, T. Zigras, R. Mongrain, R.L. Leask // J Thorac Cardiovasc Surg. – 2007. – № 134(6). – P. 1577–1578.

62. Nihsen, E. S. Bioactivity of small intestinal submucosa and oxidized regenerated cellulose/collagen / E. S. Nihsen, C. E. Johnson, M. C. Hiles // Adv Skin Wound Care. – 2008. – № 21(10). – P. 479-486.

63. O'Brien, B.J. A platinum–chromium steel for cardiovascular stents / B.J. O'Brien, J.S. Stinson, S.R. Larsen, M.J. Eppihimer, W.M. Carroll // *Biomaterials*. – 2010. – № 31(14). – P. 3755–3761.
64. Oda, T. Alternative to pulmonary allograft for reconstruction of right ventricular outflow tract in small patients undergoing the Ross procedure / T. Oda, T. Hoashi, K. Kagisaki, I. Shiraishi, T. Yagihara, H. Ichikawa // *Eur J Cardiothorac Surg*. – 2012. – № 42(2). – P. 226–232.
65. Parrag, I.C. Fiber alignment and coculture with fibroblasts improves the differentiated phenotype of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for cardiac tissue engineering / I.C. Parrag, P.W. Zandstra, K.A. Woodhouse // *Biotechnol Bioeng*. – 2012. – № 109(3). – P. 813–822.
66. Pok, S. Biomaterials advances in patches for congenital heart defect repair/ S. Pok, J.G. Jacot // *J Cardiovasc Transl Res*. – 2011. – № 4(5). – P. 646–654.
67. Polizzotti, B.D. Intrapericardial delivery of gelfoam enables the targeted delivery of periostin peptide after myocardial infarction by inducing fibrin clot formation / B.D. Polizzotti, S. Arab, B. Kühn // *PLoS ONE*. – 2012. – №7 (5). –P. 788.
68. Pozzobon, M. Human bone marrow-derived CD133(+) cells delivered to a collagen patch on cryoinjured rat heart promote angiogenesis and arteriogenesis / M. Pozzobon, S. Bollini, L. Iop // *Cell Transplant*. – 2010. – № 19(10). – P. 1247–1260.
69. Rane, A.A. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction: a 5-year update / A.A. Rane, K.L. Christman // *J Am Coll Cardiol*. – 2011. – № 58(25). – P. 2615–2629.
70. Ravichandran, R. Expression of cardiac proteins in neonatal cardiomyocytes on PGS/fibrinogen core/shell substrate for cardiac tissue engineering / R. Ravichandran, J.R. Venugopal, S. Sundarrajan, S. Mukherjee, R. Sridhar, S. Ramakrishna // *Int J Cardiol*. – 2012. – № 10(2). – P. 45-48.

71. Robinson, P.S. Functional tissue-engineered valves from cell-remodeled fibrin with commissural alignment of cell-produced collagen / P.S. Robinson, S.L. Johnson, M.C. Evans, V.H. Barocas, R.T. Tranquillo // *Tissue Eng Part A*. – 2008. – № 14(1). – P. 83–95.

72. Roll, S. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery – systematic review and meta-analysis / S. Roll, J. Müller-Nordhorn, T. Keil// *BMC Surg*. – 2008. – № 8. – P. 22.

73. Romanelli, M. OASIS wound matrix versus Hyaloskin in the treatment of difficult-to-heal wounds of mixed arterial/venous aetiology / M. Romanelli, V. Dini, M. Bertone, S. Barbanera, C. Brilli // *Int Wound J*. – 2007. – №4. – P. 3-7.

74. Ruvinov, E. Bioengineering the infarcted heart by applying bio-inspired materials / E. Ruvinov, T. Harel-Adar, S. Cohen // *J Cardiovasc Transl Res*. – 2011. – № 4(5). – P. 559–574.

75. Sacks, M.S. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering/ M.S. Sacks, F.J. Schoen, J.E. Mayer // *Annu Rev Biomed Eng*. – 2009. – № 11. – P. 289–313.

76. Saha, S.P. Use of fibrin sealant as a hemostatic agent in expanded polytetrafluoroethylene graft placement surgery / S.P. Saha, S. Muluk, W. Schenk // *Ann Vasc Surg*. – 2011. – № 25(6). – P. 813–822.

77. Segers, V.F. Biomaterials to enhance stem cell function in the heart / V.F. Segers, R.T. Lee // *Circ Res*. – 2011. – № 109(8). – P. 910–922.

78. Shayani, V. Optimization of recombinant t-PA secretion from seeded vascular grafts / V. Shayani, K.D. Newman, D.A. Dichek // *J Surg Res*. – 1994. – № 57(4). – P. 495–504.

79. Shinn, S.H. Results of annular reconstruction with a pericardial patch in active infective endocarditis / S.H. Shinn, K. Sung, P.W. Park // *J Heart Valve Dis*. – 2009. – № 18(3). – P. 315–320.

80. Shinoka, T. Tissue-engineered blood vessels in pediatric cardiac surgery / T. Shinoka, C. Breuer // *Yale J Biol Med*. – 2008. – № 81(4). – P. 161–166.

81. Simpson, D. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling / D. Simpson, H. Liu, T.H. Fan, R. Nerem, S.C. Dudley // Jr. Stem Cells. – 2007. – № 25(9). – P. 2350–2357.

82. Sinha, P. Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification / P. Sinha, D. Zurakowski, T.K. Kumar, D. He, C. Rossi, R.A. Jonas // J Thorac Cardiovasc Surg. – 2012. – № 143(1). – P. 224–227.

83. Spadaccio, C. Drug releasing systems in cardiovascular tissue engineering. C. Spadaccio, M. Chello, M. Trombetta, A. Rainer, Y. Toyoda, J.A. Genovese // J Cell Mol Med. – 2009. – № 13(3). – P. 422–439.

84. Stachelek, S.J. Biological stability of polyurethane modified with covalent attachment of di-tert-butyl-phenol / S.J. Stachelek, I. Alferiev, J. Fulmer, H. Ischiropoulos, R.J. Levy // J Biomed Mater Res A. – 2007. – № 82(4). – P. 1004–1011.

85. Tous, E. Tunable hydrogel–microsphere composites that modulate local inflammation and collagen bulking / E. Tous, H.M. Weber, M.H. Lee // Acta Biomater. – 2012. – № 8(9). – P. 3218–3227.

86. US Pharmacopoeia, Inc. USP Monographs: Small Intestinal Submucosa Wound Matrix. – 2011. – P. 455.

87. Van Putte, B.P. Ozturk S, Siddiqi S, Schepens MA, Heijmen RH, Morshuis WJ. Early and late outcome after aortic root replacement with a mechanical valve prosthesis in a series of 528 patients / B.P. Van Putte, S. Ozturk, S. Siddiqi, M.A. Schepens, R.H. Heijmen, W.J. Morshuis // Ann Thorac Surg. – 2012. – № 93(2). – P. 503–509.

88. Venugopal, J.R. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction / J.R. Venugopal, M.P. Prabhakaran, S. Mukherjee, R. Ravichandran, K. Dan, S. Ramakrishna // J R Soc Interface. – 2012. – № 9(66). – P. 17– 19.

89. Verbelen, T.O. Off-label use of stretchable polytetrafluoroethylene: overexpansion of synthetic shunts / T.O. Verbelen, N. Famaey, M. Gewillig, F.R. Rega, B. Meyns // *Int J Artif Organs*. – 2010. – № 33(5). – P. 263–270.

90. Voytik-Harbin, S.L. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa / S.L. Voytik-Harbin, A.O. Brightman, M.R. Kraine, B. Waisner, S.F. Badylak // *J Cell Biochem*. – 1997. – №67. – P. 478-491.

91. Wang, B. Structural and biomechanical characterizations of porcine myocardial extracellular matrix / B. Wang, M.E. Tedder, C.E. Perez // *J Mater Sci Mater Med*. – 2012. – № 23(8). – P. 1835–1847.

92. Weber, A. Ten-year comparison of pericardial tissue valves versus mechanical prostheses for aortic valve replacement in patients younger than 60 years of age / A. Weber, H. Noureddine, L. Englberger // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2012. – №10(4). – P. 224-227.

93. Yashiro, B. Long-term results of a cardiovascular implantable electronic device wrapped with an expanded polytetrafluoroethylene sheet / B. Yashiro, M. Shoda, Y. Tomizawa, T. Manaka, N. Hagiwara // *J Artif Organs*. – 2012. – № 17(10). – P. 147-150.

94. Zantop, T. Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction / T. Zantop, T.W. Gilbert, M.C. Yoder, S.F. Badylak // *J Orthop Res*. – 2006. – № 24(6). – P.1299–1309.

95. Zhang, G. Matrices and scaffolds for drug delivery in vascular tissue engineering / G. Zhang, L. J. Suggs // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2007. – № 59(4–5). –P. 360–373.

96. 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
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
Карпова Г.А. Карпова
«01» 11 2018 г.

Задание

По ВКР студента Мироновой Екатерины Сергеевны

Тема работы: «Изучение кальцификации внеклеточного коллагенового
матрикса, полученного различными способами децеллюляризации».

Утверждена приказом по Университету от «31» 10 2017 г. № 1096а/п

Срок сдачи студентом законченной работы «15» мая 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	ноябрь – 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 к выполнению эксперимента	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
8.	Подготовка образцов биоматериалов, полученных различными способами децеллюляризации	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
9.	Моделирование кальцификации образцов биоматериалов in vitro	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
10.	Сжигание образцов после инкубации в модельной среде и подготовка проб к анализу	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
11.	Определение содержания кальция и фосфора в образцах биоматериала	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
12.	Обработка и анализ полученных результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
13.	Оформление результатов исследования в виде графиков	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
14.	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
15.	Итоговое оформление ВКР	декабрь - март 2017 - 2018	выполнено
16.	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	май 2018	выполнено

Дата выдачи задания « 01 » 11 2017г.

Руководитель Ильин / А. Д. Крыжовенко

Задание принял к исполнению Миронова