

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 ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПОВ ОБРАБОТКИ НА
СВОЙСТВА БИОМАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ПОДСЛИЗИСТОЙ
ТОНКОЙ КИШКИ»**

Студент  Скрипко Юлия Васильевна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр  Кручинина А.Д.

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

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 21.06.18 № 12)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Реконструктивные технологии в медицине	5
1.2 Полимерные материалы в медицине	6
1.3 Ксеноматериалы.....	8
1.4 Получение внеклеточного коллагенового матрикса.....	10
1.4.1 Децеллюляризация.....	11
1.4.2 Обработка сшивающими агентами	14
1.4.3 Лиофилизация.....	15
1.5 Основные свойства биоматериала	16
1.6 Основные параметры биомеханики	20
1.7 Ответная реакция на имплантацию	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Процесс обработки биоматериала	24
2.2 Методы гистологического исследования	25
2.2.1 Окраска гематоксилин-эозином.....	25
2.2.2 Окраска по Ван-Гизону-Вейгерту	26
2.3 Оценка физико-механических характеристик биоматериала.....	27
2.4 Оценка тканевой реакции на имплантат.....	28
2.5 Методы статистической обработки результатов	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Результаты гистологического исследования.....	33
3.2 Результаты исследования влияния разных этапов обработки на физико-механические свойства материала	36
3.3 Результаты исследования тканевой реакции на имплантацию	40
ВЫВОДЫ.....	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	48

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Главной целью тканевой инженерии является создание функциональных трансплантатов, что могут восстановить или заменить повреждённые либо изношенные ткани и органы. Все биоматериалы, имплантируемые внутрь тела будут вызывать ответные реакции организма, характер и степень которых зависят от биосовместимости и биоактивности материала. Биосовместимость и биоактивность являются основными характеристиками биоматериала и их изучение необходимо для усовершенствования имплантатов.

Именно компоненты в составе определяют различные свойства биоматериала, степень сохранности коллагена и эластина напрямую влияет на его физико-механические параметры. Необходимо подобрать достаточно мягкие условия обработки, совмещающие сохранение структуры ключевых белков внеклеточного коллагенового матрикса с высокой эффективностью удаления клеток. Важно изучить влияние каждой стадии обработки, так как каждый этап по-своему воздействует на различные компоненты биоматериала, а, следовательно, и на его свойства.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния различных этапов обработки на свойства биоматериала, полученного на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

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

1. Выполнить последовательную химико-биологическую обработку сырья, обработку сшивающим агентом и гистологический контроль полученного материала.
2. Провести испытание биомеханических свойств биоматериала после ключевых этапов обработки.

3. Провести подкожную имплантацию образцов и оценить тканевую реакцию организма реципиента.

4. Провести обработку результатов исследований с привлечением статистических методов и проанализировать полученные данные.

Бакалаврская работа написана на 53 листах, содержит 14 рисунков, 5 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 52 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Реконструктивные технологии в медицине

Регенеративная медицина является мультидисциплинарной и сочетает в себе принципы трансплантации клеток, материаловедения и тканевой инженерии. Она включает различные области тканевой инженерии с общими целями замены или регенерации человеческих клеток, тканей или органов, для восстановления или установления нормального функционирования [48]. В последние годы были разработаны и нашли применение ряд новых биоматериалов, различные изделия из них, системы и устройства биомедицинского назначения. Одним из путей регенерации либо замены повреждённых или изношенных тканей и органов является трансплантация.

Трансплантация - это замещение тканей или органов больного как его собственными тканями или органами, так и взятыми из другого организма или созданными искусственно. Трансплантатом принято считать сами пересаживаемые участки тканей или органы. Различают 5 видов трансплантации:

- Ауто трансплантация - пересадка собственных тканей и органов.
- Изотрансплантация - пересадка между генетически однородными организмами. Это пересадки между близнецами человека в клинической трансплантологии или между особями внутри генетически однородных линий животных в экспериментальной трансплантологии.
- Аллотрансплантация - пересадка между организмами одного и того же вида, но генетически разнородными. Это внутривидовая трансплантация, в медицине это пересадка от человека к человеку.
- Ксенотрансплантация – пересадка органов от одного вида к другому. В медицине – от животных к человеку [43].

• Эксплантация (протезирование) - пересадка неживого небиологического субстрата[8].

Аутоотрансплантация обеспечивает истинное приживание пересаживаемого субстрата. В таком случае не возникает иммунологического конфликта в виде реакции отторжения трансплантата. По этому признаку аутоотрансплантация на сегодняшний день является самым совершенным видом трансплантации. Для аллотрансплантации имеется два источника донорских тканей и органов: труп и живой донор-доброволец [6, 16].

В современной хирургии находят применение аллотрансплантаты кожи как от трупа, так и от доноров-добровольцев, различные соединительнотканые оболочки, фасции, хрящи, кости, консервированные сосуды [4].

Эксплантацию, или протезирование, можно рассматривать как вид трансплантации, альтернативный использованию живых биологических тканей и органов. При этом виде трансплантации в организм больного вживляются различные искусственные изделия и устройства из разнообразных материалов. Эксплантация - быстро развивающийся вид трансплантации, связанный с разработкой новых вживляемых устройств, использованием новых пластических материалов. В ее развитии большую роль играют технические науки: материаловедение, органическая химия, радиоэлектроника и др. Уже сейчас применяются искусственные тазобедренные суставы, сердечные клапаны, кровеносные сосуды и даже сложные части внутреннего уха[27,28].

1.2 Полимерные материалы в медицине

Коллаген и эластин - два самых распространенных белка в организме человека, и часто используются в качестве биоматериалов. Они обладают уникальными свойствами композитных биоматериалов. Коллаген,

один из основных внеклеточных компонентов соединительной ткани, является фибриллярным секреторным белком. Он обеспечивает им структурную прочность всем тканям и органам. В тканях коллаген в основном образует нити и фибриллы. Основные достоинства коллагена, а также эластичность, прочность на разрыв и гибкость[2].

Основными характеристиками коллагена и полученных на его основе коллагеновых материалов являются: отсутствие цитотоксических и канцерогенных свойств, высокая механическая прочность, слабая антигенность, регулируемая скорость лизиса в организме, устойчивость к тканевым ферментам, способность образовывать комплексы с биологически активными веществами, стимуляция регенерации собственных тканей организма. Появление **продуктов растворения коллагена (ПРК)** ещё больше расширило возможности применения коллагена в различных областях медицины.

Из ПРК получают коллагеновые пленки, губки, нити, трубки и др. Коллагеновые материалы можно применять при ранах, ожогах, трофических язвах, пульпитах, а также их используют в качестве шовного рассасывающегося материала и гемостатических средств и тампонов для заполнения костных полостей и т.д.[14]

Важными достижениями последнего времени являются синтез пленкообразующих составов из полимеров и конструирование распылителей для нанесения их на раны и ожоговые поверхности, а также создание медицинских клеев для тканей, сосудов, бронхов, кишечника и паренхиматозных органов.

Поликапролактон (ПКЛ) является одним из наиболее часто встречающихся синтетических полимеров, используемых в биомедицинской области. Этот полиэфир имеет низкую скорость разложения, хорошие механические свойства и биосовместимость; но из-за его гидрофобного характера и недостаточной функциональности за счет включения других

биомолекул разрабатываются гибридные материалы. Изменение его физико-химических и биологических свойств, осуществляется за счет модификации поверхности и прививки биомолекул[18, 44].

Так же в медицине широко используется **полиэтилен**. Он обладает большой прочностью, гибок и эластичен, не поддается органическим растворителям, щелочам и слабым кислотам, не токсичен. Обычно используются две полиэтиленовые пленки, между которыми расположена сетка из синтетических волокон, например, лавсана.

В последние годы разрабатываются новые **полимеры на основе эпоксидных смол**, обладающие высокими физико-механическими характеристиками. Современная реконструктивная медицина немыслима без полимеров. Они должны обладать так называемой «биологической инертностью», иметь желаемую физическую структуру, соответствующие прочностные характеристики, а главное - не вызывать образования тромбов на своей поверхности при контакте с кровью. Но идеальных в этом отношении сосудистых протезов пока нет [11].

1.3 Ксеноматериалы

В современной медицине пересадка органов и тканей животных человеку - наиболее проблемный вид трансплантации. С одной стороны, донорских органов и тканей от разных животных может быть заготовлено практически неограниченное количество. Иммунные реакции, протекающие после трансплантации ксеноматериалов, гораздо сильнее, чем при аллотрансплантации [25].

Пока не решена проблема тканевой несовместимости, клиническое применение ксенотрансплантатов ограничено. При ряде восстановительных операций используются особым образом обработанная костная ткань

животных, иногда кровеносные сосуды для комбинированной пластики, временные подсадки печени, селезенки свиньи - животного, генетически наиболее близкого человеку.

Попытки трансплантации человеку органов животных пока не привели к стойкому положительному результату. Тем не менее этот вид трансплантации можно считать перспективным после решения проблем тканевой несовместимости[8].

Основные свойства, которыми должно обладать биосовместимое изделие:

- не вызывать местной воспалительной реакции;
- не оказывать токсического и аллергического действия на организм;
- не обладать канцерогенным действием;
- не провоцировать развитие инфекции;
- сохранять функциональные свойства в течение предусмотренного срока эксплуатации[15].

Подслизистая тонкой кишки свиньи (ПТК) представляет собой слой рыхлой соединительной ткани, располагающийся между мышечной и слизистой оболочками. Она играет важную роль в обеспечении фиксации слизистой оболочки. Основными компонентами ПТК являются коллаген и эластин. Преимуществами биоматериала на основе ПТК являются: биodeградация, гемостатическая способность, высокая биоинтеграция, низкая скорость кальцификации по сравнению с синтетическими материалами[5].

Бычий перикард (БП) представляет собой богатую коллагеном соединительную ткань, широко используемую в качестве биоматериала при строительстве биопротезных клапанов сердца. Однако при его применении возникают такие осложнения как изменения в гемодинамической функции тромбообразование и кальцификация. Это связано с остатками клеток и использованием токсичного глутаральдегида[34, 47].

1.4 Получение внеклеточного коллагенового матрикса

Внеклеточный коллагеновый матрикс (ВКМ) является природным биологическим скаффолдом и матрицей для заселения клеток, который получают из различных соединительнотканых структур биологического происхождения [35]. Основными этапами получения являются: децеллюляризация, обработка сшивающими агентами, лиофилизация. Свойства полученного материала во многом зависят от способа удаления клеточных элементов и дальнейших этапов обработки исходного сырья.

В ткани внеклеточный коллагеновый матрикс регулирует клеточную адгезию, дифференцировку, пролиферацию и миграцию клеток. Биоматериал получен путем химико-биологической обработки сырья. Запатентованная технология химико-биологической обработки сырья (Патент РФ № 2197818) позволяет эффективно удалить клеточные элементы и сохранить компоненты ВКМ, которые необходимы для клеточной адгезии, роста и миграции клеток [13].

Децеллюляризованный биоматериал широко используется в регенеративной медицине, так как является биорезорбируемым и обладает прекрасными биосовместимыми свойствами. Состоит из фибриллярных белков (коллаген и эластин), содержит в своем составе активные биологические молекулы, которые наделяют изделие биоактивными свойствами. Гликозаминогликаны (гиалуроновая кислота и хондроитин-сульфат А) уменьшают воспаление, обеспечивают связывание и прикрепление клеток. Протеогликаны (декорин и гепаран-сульфат) препятствуют образованию рубцовой ткани, участвуют в регуляции формирования коллагена, стимулируют ангиогенез [14].

1.4.1 Децеллюляризация

Децеллюляризация - это процесс удаления клеточных компонентов из ткани. Иммуное отторжение после трансплантации вызвано антигенами, которые находятся в донорских клетках или на их поверхности. Удаление клеток из ткани оставляет внеклеточный матрикс (ВКМ), который хорошо переносится даже ксеногенными реципиентами.

Децеллюляризация должна быть мягкой, чтобы различные компоненты ВКМ, которые необходимы для клеточной адгезии, роста и миграции, не были удалены. Так же внутриклеточные протеолитические ферменты, высвобождаемые клеточным лизисом, могут разлагать ВКМ. Чтобы ВКМ функционировал правильно, необходимые компоненты должны быть сохранены как можно лучше во время децеллюляции. Поскольку деградация ВКМ является химическим процессом, сокращение времени децеллюляции приведет к тому, что биомасса ВКМ будет меньше повреждена[36].

Еще одной основной проблемой тканевой инженерии твердых тканей остается недостаточная васкуляризация (формирование и разрастание кровеносных сосудов). Отсутствие васкуляризации приведет к некрозу образцов тканей диаметром более 400 мкм [20]. Использование децеллюляризованных тканей или органов в качестве матрицы тканевой инженерии может обеспечить решение этой проблемы. Правильно проведенная децеллюляризация без разрушения сосудистой сети сможет предоставить тканевой инженерии матрикс с присущим ему кровоснабжением. В последние годы идея децеллюляризации распространяется среди исследователей[51]. Оптимизированный метод децеллюляризации позволит сохранить структуру внеклеточного матрикса, убрав токсичные остатки и остатки клеток[45].

Для удаления клеточных элементов широко используется фермент **трипсин**[23]. Трипсин действует в узких температурных рамках (38-

40°C). Длительное воздействие трипсина может вызвать нежелательные изменения в структуре коллагена, эластина или гликозаминогликанов. Поэтому он применяется на короткие промежутки времени, чтобы предотвратить повреждение основных компонентов ВКМ[52].

Кислотная и щелочная обработка вызывает гидролиз цитоплазматических компонентов и деградацию нуклеиновых кислот; однако она может оказывать неблагоприятное воздействие на гликозаминогликаны ВКМ. **Перуксусная кислота** является часто используемым кислотным агентом, так как она наиболее эффективна при осуществлении перфузии липидных тканей без ее разрушения, а также сохранения любых существующих факторов роста в ткани. Кроме того, перуксусная кислота используется из-за ее антисептических свойств и также способна удалять ДНК из обработанной ткани. Щелочные агенты обычно сильнее воздействуют на обрабатываемую ткань и могут вызвать снижение её механических свойств. Поэтому их чаще используют для удаления волос из дермальных образцов перед началом процесса децеллюляции.

Использование гипотонических или гипертонических растворов способствует лизису клеток осмотическим шоком, а также приводит к нарушению взаимодействия ДНК-белок. Наиболее часто используемыми являются растворы **HCl**, **EDTA** и **NaCl**. Однако эти растворы не способны полностью исключить клетки из обработанной ткани. Сохранение исходного клеточного материала в каркасе может вызвать замедление процесса заживления трансплантата и его последующее отторжение. Для того чтобы добиться снижения присутствия клеточных остатков, обычно проводится промывание ткани гипер- или гипотоническими растворами в течение нескольких циклов.

Triton X-100 (octylphenol-9) является наиболее часто используемым неионным детергентом в децеллюлярных протоколах и применяется в основном для тонких тканей, таких как клапаны сердца, кровеносные сосуды

и связи. Неионогенные детергенты широко используются в децеллюлярных протоколах из-за их мягкого воздействия на тканевую архитектуру и высокую эффективность удаления клеток. Они нарушают взаимодействия липид-липид и липид-белок, сохраняя при этом белок-белковые взаимодействия. Triton X-100 вызывает минимальные изменения в составе ВКМ, но уменьшает количество гликозаминогликанов [22].

SDS (додецилсульфат натрия) является наиболее часто применяемым ионным детергентом. Он солюбилизирует клеточные мембраны, но денатурирует белки, нарушая их взаимодействия. SDS, как агент децеллюларизации, является более эффективным, чем Triton X-100, поскольку его эффективность выше, особенно с плотными органами. С другой стороны, SDS оказывает пагубное влияние на количество гликозаминогликанов в ВКМ. Это само по себе снижает механическую устойчивость скаффолдов [46].

CHAPS или 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate объединяет свойства неионных и ионных детергентов (цивиттерионный детергент). Как подтверждено гистологическим анализом, CHAPS идеально подходит для тонких тканей, таких как периферические нервы, кровеносные сосуды или легкие. Он также оказался невосприимчивым к структурам коллагена и эластина. Тем не менее, он также способствует снижению механических свойств скаффолда, которые сопоставимы с теми, которые были вызваны обработками Triton X-100 или гипертоническими растворами.

Наиболее эффективные процессы децеллюляции включают сочетание физических, химических и ферментативных процессов [28].

1.4.2 Обработка сшивающими агентами

Ряд материалов подвергается дополнительной обработке сшивающим агентом для улучшения стабильности, а также устойчивости против ферментативной деградации. Существующие сшивающие агенты, такие как формальдегид, глутаральдегид и эпоксидные соединения, все идентифицированы как цитотоксические, что ограничивает клинические применения и провоцирует научное сообщество искать альтернативные природные сшивающие / стабилизирующие агенты[49].

Глутаральдегид является наиболее широко используемым реагентом для сшивания первичных аминогрупп, главным образом подвергается действию коллаген. Однако было выявлено цитотоксическое действие. В протеогликанах аминогруппы в основном ацетилированы и, следовательно, не подвергаются сшиванию глутаральдегидом.

Водорастворимые карбодиимиды активируют карбоксильные группы белков, таких как коллаген, что приводит к образованию поперечных связей амидного типа без каких-либо остаточных реакционноспособных групп. Кроме того, обнаружено, что карбодиимиды сшивают молекулы гиалуроновой кислоты путем образования сложноэфирных связей между гидроксильными и карбоксильными группами. Показано, что карбодиимидный метод превосходит глутаровый альдегид в аспектах цито- и биосовместимости.

Другим предпочтительным сшивающим агентом для первичных аминогрупп является природный реагент **генипин**, который, как сообщается, значительно менее цитотоксичен, чем глутаровый альдегид.

Трансглутаминаза, фермент в хондроцитах млекопитающих, экспрессия которых сильно коррелирует с клеточной дифференциацией, также использовалась в качестве коллагенового сшивающего реагента. Взятые вместе глутаральдегид, карбодиимиды, генипин и трансглутаминаза -

все поперечные функциональные группы компонентов внеклеточного матрикса. Поэтому такие реагенты могут также использоваться для сшивания открытых функциональных групп на поверхности трещины суставного хряща после травмы или трансплантации [24].

1.4.3 Лиофилизация

Лиофилизация – это процесс, при котором вода (или другой компонент) выделяется путем сублимации из замороженной системы или фазы. Переход от твердого состояния к газообразному происходит без появления воды (или другого растворителя) в жидком состоянии [21]. Лиофилизация является способом консервации материала.

Вакуумная сублимация быстрее, мягче, часто более бережливая и технологически более контролируема, чем сублимация при нормальном (или атмосферном) давлении. Лиофилизация представляет собой процесс дегидратации в условиях низкой температуры и пониженного давления. Фактически, процесс работает за счет замораживания соответствующего вещества и также известен как сублимационная сушка. Процесс лиофилизации энергозатратный и требует специального аппарата, называемого замораживающим устройством [29,31].

На первом этапе замерзание происходит при нормальном давлении, и осуществляется с помощью морозильной машины. Конечная температура замораживания обычно устанавливается где-то в диапазоне от -15 до -50 °C. Скорость замораживания тоже очень важна. Большие кристаллы получают медленным замораживанием и легче замораживаются. Однако более крупные кристаллы оказывают более разрушительное воздействие на материал, чем более мелкие. Поэтому этап замораживания является самым критичным во всем процессе.

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

На последнем этапе происходит удаление жидких частиц воды. Этот этап обусловлен сорбционными изотермами конкретного материала. Температура повышается и может быть даже выше 0 ° C, однако давление в сушилке обычно остается постоянным. После этого последнего процесса окончательное содержание остаточной воды в материале составляет от 1% до 4% [33,40].

1.5 Основные свойства биоматериала

Биодеградация - процесс разложения нежизнеспособных материалов при контакте *in vivo*. Механизм биодеградации может быть самый разнообразный - от коррозии металлов, фагоцитоза кальцийфосфатов и коллагена, до химического замещения кораллов на гидроксиапатит. Биодеградируемые материалы и устройства могут частично или полностью растворяться, поглощаться макрофагами, включаться в метаболические и биохимические процессы и заменяться живой тканью. Противоположным биодеградации свойством является биоустойчивость, которая характеризует способность материала противостоять в расчетном интервале времени комплексному воздействию окружающей среды и тканей, сохраняя при этом свои исходные физико-химические, механические и биологические, а также функциональные свойства.

Под биоактивными материалами подразумевают биоматериалы, предназначенные для связывания их с биологическими системами с целью

повышения эффективности лечения, образования или замещения любой ткани, органа, выполнения тех или иных функций организма. В настоящее время среди семейства биоактивных материалов выделяют 5 основных категорий:

- Кальцийфосфатная керамика.
- Стекло и стеклокерамика.
- Биоактивные полимеры.
- Биоактивные гели.
- Композиты[9].

Под **биорезорбирующимися** материалами понимают такие полимерные материалы, которые распадаются *in vivo*, а затем резорбируются, т.е. элементируются естественным путем фильтрации или путем метаболизма продуктов распада. Таким образом, биорезорбция - это полное выведение чужеродного материала и продуктов его распада с низким молекулярным весом без следовых эффектов. Имплантаты обладают различной скоростью биорезорбции после имплантации в зависимости от вида замещающей ткани. После имплантации материала в ткани животных, он может подвергнуться воздействию агрессивной окисляющей среды, которая формируется при развитии клеточного ответа, например, вызванного развитием реакции на инородное тело. Химия реакций клеточного ответа может описываться реакцией Фентона и сопровождаться внутриклеточным накоплением избытка ионов железа (один из компонентов реактива Фентона). Быстрая резорбция материала в условиях *in vitro* предполагает и быструю биорезорбцию биоматериала в условиях выраженного клеточного ответа или при развитии воспалительных процессов в организме человека[3].

Биосовместимость - это обеспечение желаемой реакции живых тканей на нежизнеспособные биоматериалы. Биосовместимым является материал, который обладает способностью вырабатывать соответствующий отклик

организма при специфическом его использовании. Требования к биосовместимым материалам:

- биоматериалы не должны вызывать местной воспалительной реакции;
- биоматериалы не должны оказывать токсического и аллергического действия на организм;
- биоматериалы не должны обладать канцерогенным действием;
- биоматериалы не должны провоцировать развитие инфекции;
- биоматериалы должны сохранять функциональные свойства в течение предусмотренного срока эксплуатации[15].

Гемосовместимость является важным качеством для материалов, контактирующих с кровью, в медицине. Биоматериалы, контактирующие с кровью, не должны инициировать свертывание крови при выполнении своих функций. Существует давняя тенденция использовать гепаринизированные или гепариноподобные структуры в материалах для матриц, контактирующих с кровью. Однако такие структуры могут приводить к ограничениям механических свойств из-за разрыва связей на скелете или разделении фаз в случае смешивания. Кроме того, методы, включая синтез плазмы и трансплантации, ограничены из-за их высоких затрат и трудностей в промышленном применении [32, 42].

Применение аппарата «сердце – легкие» или искусственной почки сразу же вызывает необходимость отвода крови из организма и создания вне органной циркуляционной цепи, а это чревато опасностью свертывания крови в той или иной части цепи. Так, катетеризация кровеносных сосудов (для исследования состояния их поверхности или измерения кровяного давления) часто сопровождается образованием тромбов, которые облепляют катетер и, в конечном счёте закупоривают сосуд.

Биосовместимыми могут быть и такие материалы, которые способствуют быстрому свертыванию крови, и такие, которые, наоборот,

антитромбогенны, т. е. материалы диаметрально противоположного назначения.

Инородные материалы, находящиеся в контакте с кровью, могут оказывать на нее вредное воздействие. Наиболее сильное – тромбообразование, или гемокоагуляция. Возможно также снижение срока жизни красных кровяных телец, разрушение тромбоцитов и абсорбция или денатурация белков. Некоторые из реакций взаимодействия инородной поверхности и крови также являются стадиями тромбообразования (рис.1).

У большинства материалов время тромбообразования изменяется от 8 до 13 мин. Силиконовая резина менее тромбогенна – время тромбообразования составляет около 20 мин. Отметим, что изучение процессов тромбообразования чрезвычайно затруднительно, поскольку очень сложно изучать явление в динамике. Поэтому реальные условия тромбообразования на поверхности материалов исчерпывающим образом еще не истолкованы.



Рисунок. 1. Механизм тромбообразования на чужеродной поверхности

Имеется три категории тромборезистентных поверхностей:

- 1) гепаринизированные поверхности;
- 2) поверхности с анионным радикалом;
- 3) поверхности относительно инертных материалов.

1.6 Основные параметры биомеханики

Основными параметрами в биомеханике являются нагрузка, напряжение, модуль упругости, относительное (процентное) удлинение до разрушения.

Когда к любому твёрдому телу прикладываются силы, объект деформируется относительно своих исходных размеров. В то же самое время внутри объекта возникают внутренние силы (напряжения). Относительные деформации в любой точке, указываются как относительные деформации в этой точке. Интенсивности внутренних сил определяются как напряжение: $\sigma = F / S$, где F – приложенная сила, S – площадь поперечного сечения.

Максимальное напряжение, приводящее к разрушению, называется пределом прочности σ_b .

Материал разрушается при уровне напряжения известном как предел прочности на растяжение (единицы МПа). Предел упругости указывается следующим образом – $\sigma_{0.05}$.

Модуль упругости – отношение напряжения к соответствующей относительной деформации ниже предела пропорциональности. Если испытание производится при растяжении или сжатии, отношение напряжение/ относительная деформация определяется как модуль Юнга[17].

В динамических задачах механики модуль Юнга рассматривается в более общем смысле — как функционал деформируемой среды и процесса.

В Международной системе единиц (СИ) измеряется в ньютонах на квадратный метр или в паскалях. Является одним из модулей упругости.

Модуль Юнга рассчитывается следующим образом:

$$E = \frac{F/S}{\Delta l/l} = \frac{Fl}{S\Delta l}$$

где:

F — нормальная составляющая силы,

S — площадь поверхности, по которой распределено действие силы,

l — длина деформируемого стержня,

Δl — модуль изменения длины стержня в результате упругой деформации (измеренного в тех же единицах, что и длина l)[1].

За физико-механические свойства ВКМ отвечают фибриллярные белки (коллагены типов I, III, IV, VI, эластин). Коллаген типа I является очень прочным белком, поэтому он стал хорошим материалом для инженерных скаффолдов. Другие типы коллагена, такие как коллаген VI, обуславливают физические свойства ВКМ.

Фибронектин играет основную роль в клеточной адгезии, его используют в качестве белка покрытия синтетического каркасного материала. Ламинин так же улучшает адгезию к скаффолду. ВКМ является источником нескольких типов коллагена и других белков, которые способны обеспечить надлежащую среду для реконструкции тканей [28].

При децеллюляризации додецилсульфатом натрия дестабилизируется тройной спиральный домен коллагена и происходит набухание сетчатой структуры эластина. Это приводит к изменению свойств биоматериала: повышается растяжимость, изменяется форма кривой эластиновой и коллагеновой фаз при тесте растяжение-сжатие[41]. При использовании

трипсина может возникнуть массовая деструкция коллагена и эластина [12,39].

При обработке сшивающим агентом происходит поперечная сшивка коллагеновых волокон, что повышает механическую прочность биоматериала [37].

1.7 Ответная реакция на имплантацию

Трансплантация реципиенту даже аллотрансплантата, вызывает отторжение. Это является сильным ответом иммунной системы реципиента, что приводит к необратимому повреждению трансплантата. В зависимости от временных рамок, при которых происходит отторжение, выделяют «острые» отторжения и «хронические». Острый отказ развивается в первые несколько недель или месяцев после трансплантации и вызывается клеточными и молекулярными механизмами, которые могут частично отличаться от тех, которые приводят в течение многих месяцев или лет к хроническому отторжению [26, 50].

При пересадке ксенотрансплантатов антитела могут играть ключевую роль в отторжении. Однако это не иммунные, а естественные антитела входят в состав мембранных гликопротеинов клеток большинства животных, но отсутствуют у человека. В результате развивается быстрая реакция, сопровождающаяся спазмом сосудов, напоминающая реакцию second-set на аллотрансплантат.

Лимфоидная инфильтрация — одно из самых типичных морфологических проявлений трансплантационной реакции.

Острое отторжение — это нормальный первичный иммунный ответ на трансплантат при отсутствии медикаментозной иммуносупрессии. В

деструкцию трансплантата могут быть вовлечены все известные эффекторные механизмы иммунного воспаления.

Отсроченное отторжение по механизмам аналогично острому, но только в результате эффективной иммуносупрессии индукция иммунного ответа откладывается на несколько лет[15].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Процесс обработки биоматериала

Описание процесса: процесс обработки биоматериала для изготовления ВКМ состоит из следующих этапов:

- первичная обработка солевыми растворами
- ферментативная обработка
- вторичная обработка солевыми растворами
- получение многослойного конструкта
- обработка сшивающим агентом
- лиофилизация
- стерилизация

Первичная обработка солевыми растворами. Проводят механическую очистку и помещают биоматериал в солевые растворы с повышением концентрации. Материал хранится в холодильнике. Первичную обработку проводят в течение 1-3 суток.

Ферментативная обработка. В качестве фермента используется трипсин. Ферментация проводится при 37-38°C в течение 43 – 45 минут. Проводится инактивация фермента путем изменения pH. Материал помещается в кислотный раствор на 20 минут. Проводится нейтрализация 0,1М раствором гидрокарбоната натрия в течение 20 минут.

Вторичная обработка солевыми растворами. Помещают биоматериал в солевые растворы с повышением концентрации. Материал хранится в холодильнике. Вторичную обработку проводят в течение 1-3 суток.

Получение многослойного конструкта. На оргстекло последовательно накладывают несколько лоскутов биоматериала, сушку проводят в течение не менее 24 часов.

Обработка сшивающим агентом. В качестве сшивающего агента используется 0,1мМ 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид гидрохлорид, выдержка в растворе не менее 24 часов.

Лиофилизация. Процесс сублимационного высушивания осуществляется в четыре стадии:

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

Стерилизация. Химически сшитые биоматериалы на основе коллагена стерилизуют после сшивания и хранят в стерильной упаковке вплоть до имплантации. Стерилизация проводится неальдегидным агентом (газообразной окисью этилена).

2.2 Методы гистологического исследования

2.2.1 Окраска гематоксилин-эозином

Окраска гематоксилин-эозином — наиболее распространённый метод окрашивания срезов. Эта окраска является двойной: гематоксилин — основной краситель — окрашивает ядра клеток, эозин — кислый краситель — красит протоплазму клеток и в меньшей степени — различные неклеточные структуры. Подготовка срезов к окраске заключается в их кратковременной обработке спиртом. Поскольку при заливке в парафин или целлоидин материал обезвоживается в спиртах, срезы, полученные при этих способах заливки, в особой подготовке для окраски гематоксилин-эозином не нуждаются. Обрабатывать необходимо замороженные срезы. При этом происходит их обезжиривание и другие изменения в структуре, что значительно улучшает окрашивание гематоксилин-эозином. Срезы

обрабатывают в 96° спирте не более 3-5 минут. Из спирта срезы переносят обратно в дистиллированную воду. Окраску производят сначала гематоксилином.

Депарафинировали срезы в ксилоле в течение 2 минут. Удалили ксилол 96° спиртом в течение 2 минут. Затем стекло со срезами поместили в дистиллированную на 2 минуты. Окрашивали гематоксилином 2-3 минуты. Промывали дистиллированной водой в течение 10 минут. Окрашивали эозином 1 минуту. Трижды ополаскивали срезы дистиллированной водой. Для удаления воды ополаскивали в 96% этаноле дважды. Окончательное обезвоживание срезов проводили промыванием ксилолом в течение 2 минут. Для просветления дважды промывали срезы карбол-ксилолом.

2.2.2 Окраска по Ван-Гизону-Вейгерту

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

2.3 Оценка физико-механических характеристик биоматериала

Изучение физико-механических характеристик образцов внеклеточного коллагенового матрикса проводилось на испытательной установке INSTRON-5944 BIO PULS (рис. 2). Биоматериал оценивали по трем параметрам: модуль упругости, максимальная нагрузка и напряжение при растяжении при максимальной нагрузке. Измерения проводили на 20 образцах каждой группы, для этого вырезать полоски размером 5x30 мм. Определение механических свойств образцов проходило следующим образом. Противоположные концы образца помещали между зажимами испытательной машины, затем определяли геометрию образца, снимали размеры (длину, ширину, толщину или радиус) и задавали скорость перемещения траверсы. После запуска испытания траверса с верхним зажимом перемещалась с заданной скоростью, растягивая образец. На экране монитора машины отображался график полициклических нагрузок – кривая «нагрузка – растяжение». По окончании всей серии испытаний машина высчитывала окончательный график средних значений «нагрузки – растяжения» и средние значения измеряемых параметров (максимальная нагрузка, максимальное напряжение при растяжении и модуль упругости).



Рисунок 2. Испытательная установка INSTRON-5944 BIO PULS

2.4 Оценка тканевой реакции на имплантат

Образцы многослойного бесклеточного матрикса на основе подслизистой тонкой кишки имплантировали в организм животного по методу Fishbein M. et al., 1982 [25]. Перед операцией животных в течение 7 дней содержали в виварии. Содержание животных и условия проведения экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2-2015«Требования к обращению с животными»[7].

При проведении операции животных наркотизировали растворами золетила (6 мг/кг, Zoletil 100, Italia) и рометара (0,5 мл/кг, Rometar, Spofa, Praha). Оперативное вмешательство проводилось в стерильных условиях. С операционного поля удаляли шерсть, участок кожи в месте разреза обрабатывали антисептиком 0,05 % раствором хлоргексидина, излишки антисептика удаляли стерильными салфетками. Имплантацию образцов экспериментальным животным осуществляли под кожу в карманы, сформированные в области межлопаточного пространства. Такая область характеризуется малой подвижностью и недоступностью для самого животного, что сводит к минимуму вероятность его вмешательства в экспериментальный процесс. В контрольной группе сформированный подкожный карман ушивали без имплантации материала. Животные выводились из эксперимента путем передозировки золетила на 7, 14, 30 сутки. Область имплантации иссекали, полученные ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин.

Тканевую реакцию и изменение структуры биоматериала после имплантации изучали методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилин-эозином и по Вейгер-Ван-Гизону.

2.5 Методы статистической обработки результатов

Методами статистической обработки результатов называются математические приемы, формулы, способы количественных расчетов, с помощью которых показатели, получаемые в ходе эксперимента, можно обобщать, приводить в систему, выявляя скрытые в них закономерности. Речь идет о таких закономерностях статистического характера, которые существуют между изучаемыми в эксперименте переменными величинами.

Полученные данные обрабатывали статистически с привлечением $3s$ критерия и t критерия Стьюдента.

Критерий $3s$ применяется для результатов измерений, распределенных по нормальному закону. По этому критерию считается, что результат, возникающий с вероятностью $P = 0,0027$, маловероятен, и его можно считать промахом, если

$$x_{\min} < \bar{X} - 3s$$

$$x_{\max} > \bar{X} + s$$

где

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}$$

$\bar{X}$ – среднее арифметическое результатов измерения; s – среднее квадратичное отклонение.

Данный критерий дает достаточно надежные результаты только при $n > 30$.

t-критерий Стьюдента – общее название для статистических тестов, в которых статистика критерия имеет распределение Стьюдента. Наиболее часто t -критерии применяются для проверки равенства средних значений в двух выборках. Нулевая гипотеза предполагает, что средние равны (отрицание этого предположения называют гипотезой сдвига).

Для применения t-критерия Стьюдента необходимо, чтобы исходные данные имели нормальное распределение.

Нормальное распределение, также называемое распределением Гаусса или Гаусса-Лапласа – распределение вероятностей, которое в одномерном случае задаётся функцией плотности вероятности, совпадающей с функцией Гаусса:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Где параметр μ – математическое ожидание (среднее значение), медиана и мода распределения, а параметр σ – среднее квадратическое отклонение (σ^2 – дисперсия) распределения.

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

где M_1 – средняя арифметическая первой сравниваемой совокупности (группы), M_2 – средняя арифметическая второй сравниваемой совокупности (группы), m_1 – средняя ошибка первой средней арифметической, m_2 – средняя ошибка второй средней арифметической [10].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения биосовместимого материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи было необходимо подобрать режимы обработок сырья ксеногенного происхождения с целью удаления клеток и их компонентов. На эффективность обработки влияют такие параметры как концентрация, температура и время экспозиции в растворе. После проведения различных вариантов обработки с помощью гистологических техник определяли следующие параметры: наличие клеток в поле зрения, состояние коллагеновых и эластиновых волокон (табл. 1-3).

Таблица 1 – Влияние протеолитической активности на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

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

Согласно результатам наиболее оптимальной протеолитической активностью фермента, при которой отсутствуют клеточные элементы и повреждённые волокна коллагена и эластина, будет 10 ПЕ. При более низких значениях наблюдаются клеточные элементы, что может вызвать резкий иммунный ответ. При более высоких значениях наблюдается повреждение фибриллярных белков, что вызовет снижение механической прочности.

Таблица 2 – Влияние температуры при ферментации на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

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

Согласно результатам наиболее оптимальной температурой для эффективной работы фермента является температура 37°C. При этом наблюдается отсутствие клеточных элементов и повреждённых волокон коллагена и эластина. При более низких температурах трипсин не начинает работать, а при более высоких – прекращает действие.

Таблица 3 – Влияние времени экспозиции в растворе на наличие клеток и состояние волокон в подслизистой тонкой кишки

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

Согласно результатам наиболее оптимальным временем экспозиции биоматериала в растворе для эффективной работы фермента будет 40 минут. При этом наблюдается отсутствие клеточных элементов и поврежденных волокон коллагена и эластина. При менее длительном воздействии не все клеточные элементы успевают разрушиться, а при более длительном – повреждаются фибриллярные белки.

3.1 Результаты гистологического исследования

Для анализа образцов после децеллюляризации проводился ряд стандартных окрашиваний: окраска гематоксилин-эозином и окраска по Ван-Гизону-Вейгерту. (рис. 3-5).

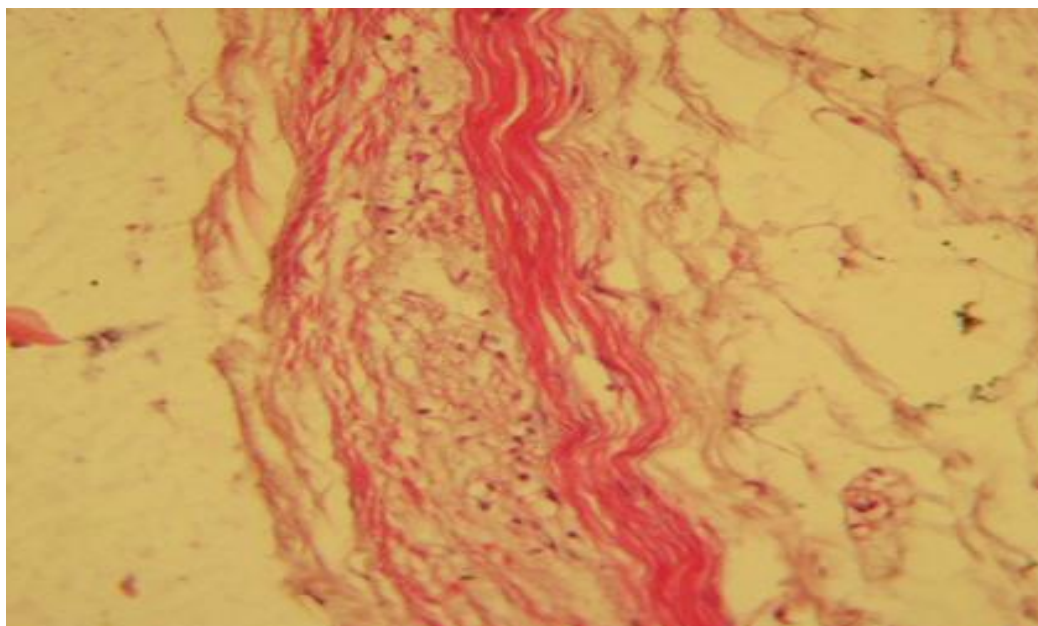


Рисунок 3. Результаты гистологического исследования внеклеточного коллагенового матрикса до обработки. Окрашка гематоксилин-эозин, x200

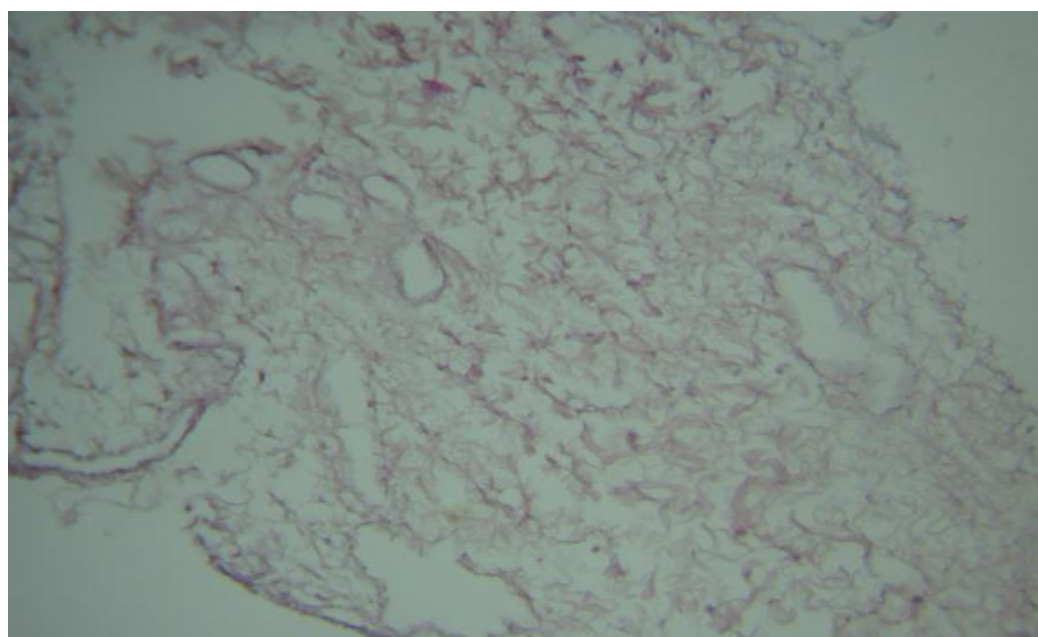


Рисунок 4. Результаты гистологического исследования внеклеточного коллагенового матрикса после обработки. Окрашка гематоксилин-эозин, x200

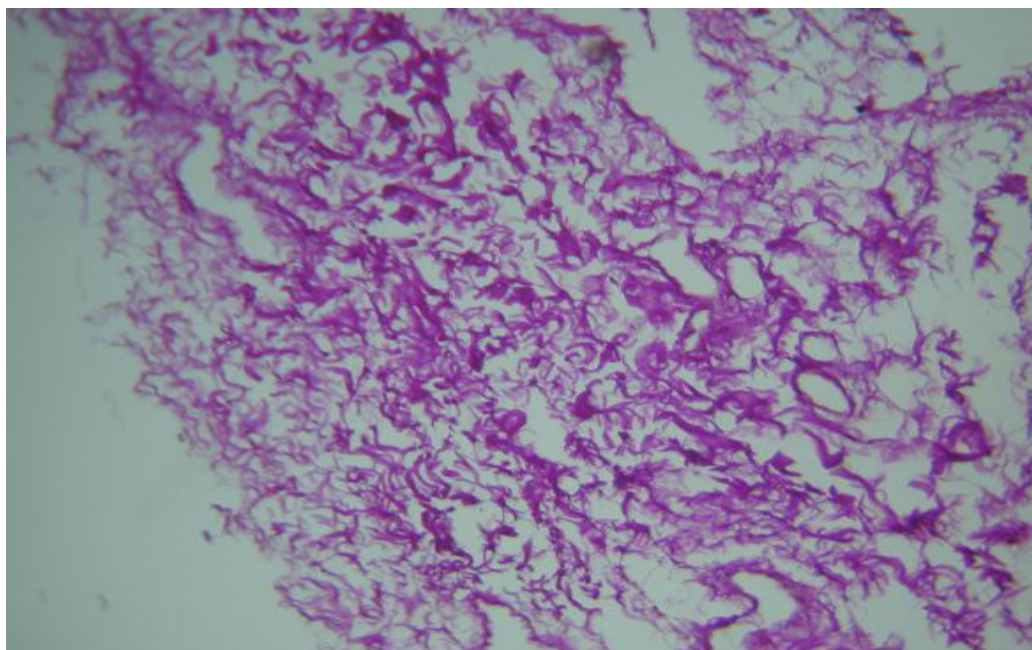


Рисунок 5. Результаты гистологического исследования внеклеточного коллагенового матрикса после обработки. Окраска Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

Результаты гистологического исследования образцов внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, проведенного до имплантации, свидетельствуют об отсутствии клеточных элементов, сохранности коллагеновых и эластиновых волокон после ферментативной обработки.

Внеклеточный коллагеновый матрикс на основе подслизистой тонкой кишки свиньи в своём составе имеет сложный комплекс фибриллярных белков [19]. Присутствует коллаген I, III, IV, VI и VII типов, именно коллаген I обеспечивает механическую прочность ВКМ. Эластические волокна способны растягиваться и сжиматься в разных направлениях, придавая ткани свойство эластичности. Фибронектин обладает способностью к связыванию коллагена, протеогликанов, гиалуроновой кислоты, углеводов плазмалеммы, гепарина. Способностью к клеточной адгезии обладает ламинин.

Функциональные свойства основных компонентов внеклеточного коллагенового матрикса после обработки и стерилизации представлены в табл. 4.

Таблица 4 – Основные компоненты внеклеточного коллагенового матрикса и их функции

Компоненты	Функции
Фибриллярные белки	
Коллагены типов I, III, IV, VI, эластин	пространственная архитектура, механическая прочность, эластичность
Гликопротеины и протеогликаны	
Фибринонектин, ламинин	клеточная адгезия, миграция, пролиферация
Гликозаминогликаны: гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, гепарансульфат, гепарин	связывание клеток и факторов роста, усиление миграции клеток к месту повреждения, ангиогенез, клеточная дифференциация и пролиферация, контроль размера и ориентации коллагеновых волокон
Цитокины, факторы роста	биологическая активность, клеточная сигнализация, ремоделирование в организме реципиента

3.2 Результаты исследования влияния разных этапов обработки на физико-механические свойства материала

Результаты, полученные при изучении физико-механических характеристик образцов внеклеточного коллагенового матрикса на испытательной установке INSTRON-5944 BIO PULS, представлены на рис. 6-

8.Измерения проводились на трёх группах образцов: до обработки, после удаления клеточных элементов и после стабилизации сшивающим агентом.

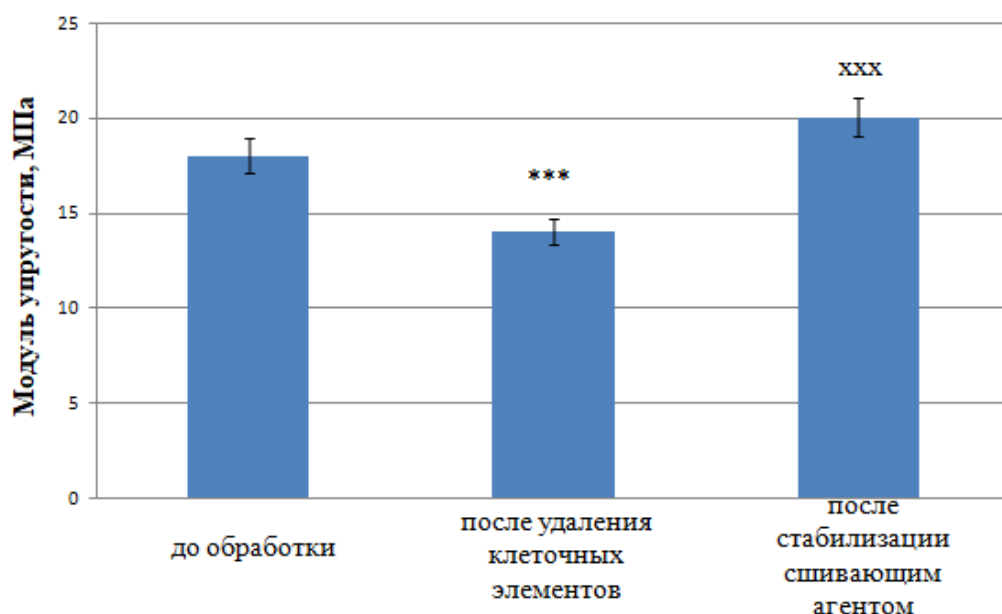


Рисунок 6. Результаты исследования модулей упругости (МПа, $M \pm m$, $n=30$).
Здесь: *** $p < 0,005$ относительно образцов до обработки. Здесь: xxx $p < 0,005$ относительно образцов после удаления клеточных элементов

Согласно результатам модуль упругости после удаления клеточных элементов в 1,28 раза ниже, чем до обработки. Это может быть связано с негативным воздействием трипсина на фибриллярные белки. Волокна эластина обладают способностью растягиваться упругим образом, он допускает деформацию в 200-300%. Под действием трипсина эластин подвергается деструкции.

Модуль упругости после стабилизации сшивающим агентом в 1,42 раза выше, чем после удаления клеточных элементов. Это может быть связано со стабилизирующим воздействием сшивающего агента на коллаген. При обработке сшивающим агентом происходит поперечная сшивка коллагеновых волокон, что повышает механическую прочность биоматериала.

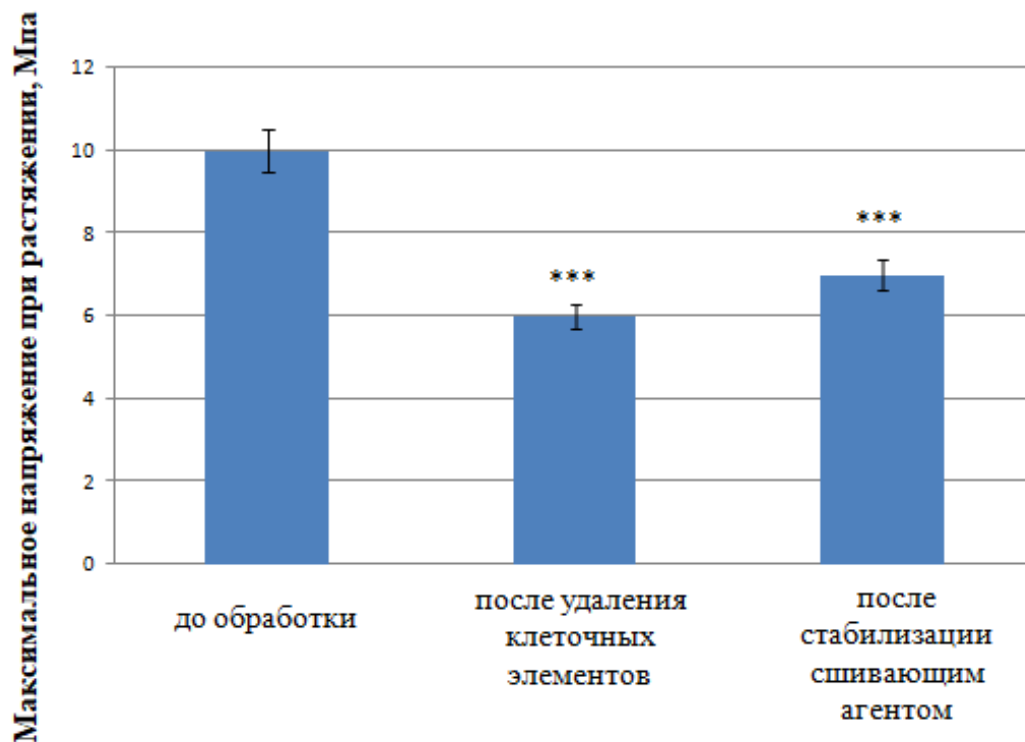


Рисунок 7. Результаты исследования выдерживаемого напряжения при растяжении при максимальной нагрузке (МПа, $M \pm m$, $n=30$). Здесь:*** $p < 0,005$ относительно образцов до обработки

Согласно результатам максимальное напряжение при растяжении после удаления клеточных элементов в 1,67 раза ниже, чем, до обработки, а после стабилизации сшивающим агентом в 1,43 раза ниже, чем до обработки. Между показателями после удаления клеточных элементов и после стабилизации сшивающим агентом достоверных отличий нет. Стабилизация не приводит к достоверному повышению показателей. Это может быть связано с тем, что при обработке сшивающим агентом происходит только поперечная сшивка коллагеновых волокон. Она положительно сказывается на пространственной архитектонике материала, но не добавляет прочности самим волокнам коллагена.

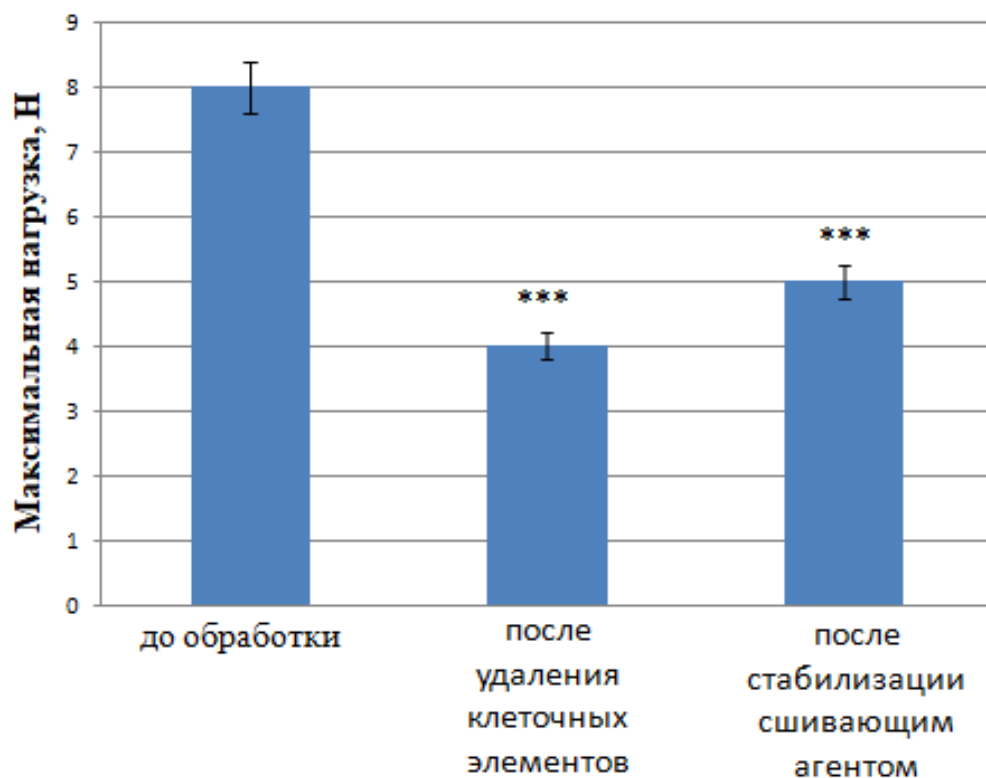


*Рисунок 8. Результаты исследования выдерживаемой максимальной нагрузки (H , $M \pm m$, $n=30$). Здесь:*** $p < 0,005$ относительно образцов до обработки*

Согласно результатам максимальная нагрузка после удаления клеточных элементов в 2 раза ниже, чем до обработки, а после стабилизации сшивающим агентом в 1,6 раза ниже, чем до обработки. Между показателями после удаления клеточных элементов и после стабилизации сшивающим агентом достоверных отличий нет.

После проведения исследования физико-механических свойств биоматериала на различных этапах обработки мы можем сделать вывод, что биоматериал после стабилизации сшивающим агентом уступает материалу до обработки по двум параметрам (максимальная нагрузка и максимальное напряжение при растяжении); биоматериал после удаления клеточных элементов уступает материалу до обработки по всем параметрам; между

показателями после удаления клеточных элементов и после стабилизации сшивающим агентом, по двум параметрам (максимальная нагрузка и максимальное напряжение при растяжении) достоверных отличий нет. Можно сделать вывод, что децеллюляризация ферментом трипсином негативно воздействует на физико-механические параметры биоматериала, а стабилизация сшивающим агентом практически не изменяет их.

3.3 Результаты исследования тканевой реакции на имплантацию

При тестировании имплантируемого изделия на биосовместимость важно учитывать тканевую реакцию в зоне имплантации.

Модели гетеротопической имплантации широко применяются для оценки биосовместимых свойств медицинских изделий, скоростей биоинтеграции и биodeградации материалов, изучения тканевой реакции на имплантат.

При имплантации в организм чужеродного материала неизбежно возникает клеточная реакция, которую обычно расценивают как асептическое воспаление. Ответная реакция со стороны собственных тканей организма возникает по типу реакции на инородное тело.

На интенсивность воспалительного процесса в ране влияет степень травматизации ткани, обусловленная оперативным вмешательством. Выделяют следующие фазы течения раневого процесса: альтерацию (повреждение), экссудацию и пролиферацию.

Экссудативную и пролиферативную стадию иногда подразделяют на нейтрофильную, макрофагальную и фибробластическую фазы.

Пусковым механизмом процесса воспаления является травматическое повреждение тканей, после чего клетки начинают продуцировать воспалительные медиаторы — цитокины. Кроме цитокинов стимулятором воспалительной реакции является кровотечение. В результате из крови в

близлежащие ткани выходят факторы гемостаза, которые выполняют функцию хемоаттрактантов, т.е. способствуют миграции лейкоцитов из окружающих тканей и сосудов в рану.

В качестве маркеров успешного приживления или, напротив, биодеструкции трансплантата использовали следующие морфологические показатели: интенсивность и продолжительность воспалительной реакции со стороны тканей реципиента, скорость биоинтеграции; степень биодеградации (табл. 5). Очень важно, сохраняет ли трансплантат структурную целостность или подвергается фрагментации и резорбции. Эти факторы определяют, насколько быстрыми будут васкуляризация и смена клеточных ассоциаций с полиморфноклеточной на лимфо-макрофагальную, а затем и на фибробластическую. Тем самым определяется время и скорость формирования коллагеновых волокон капсулы, которая является барьером и связующим звеном между трансплантатом и тканями реципиента.

Таблица 5 – Результаты гистологического исследования на разных сроках после имплантации

Признак сравнения	Внеклеточный коллагеновый матрикс
Срок имплантации – 7 дней	
Воспалительная реакция	выраженная лимфогистоцитарная инфильтрация по краю образца
Биоинтеграция	формирование коллагеновых волокон вокруг образца
Биодеградация	не выявлено
Васкуляризация	формирование одиночных кровеносных сосудов
Срок имплантации – 14 дней	
Воспалительная реакция	выраженная лимфогистоцитарная инфильтрация по всему образцу

Таблица 5 – (продолжение)

Биодеградация	по всему образцу
Васкуляризация	множественное формирование сосудов
Срок имплантации – 30 дней	
Воспалительная реакция	замещение образца фиброзированной грануляционной тканью
Биоинтеграция	
Биодеградация	
Васкуляризация	ткань реципиента по месту имплантации восстанавливает свою структуру

Для рутинного гистологического исследования готовили микротомные срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином, пиррофуксином по Ван-Гизону и фукселином на эластические волокна, полученные препараты изучали с помощью светового микроскопа. Результаты гистологического исследования представлены на рис. 9-14.

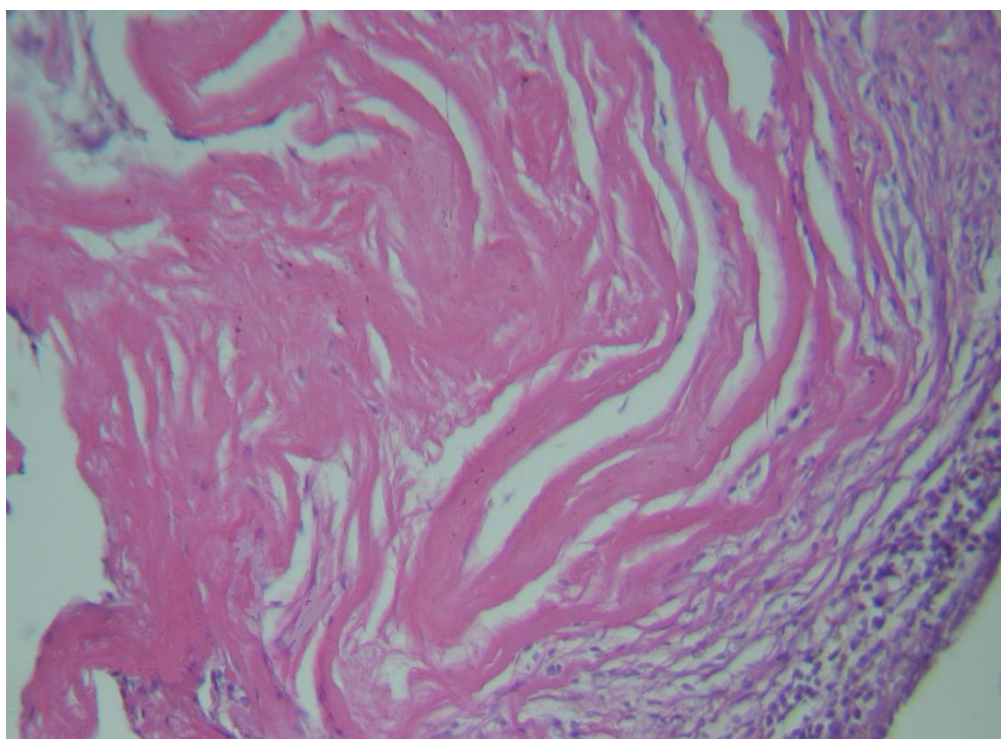


Рисунок 9. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию. Срок имплантации 7 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200

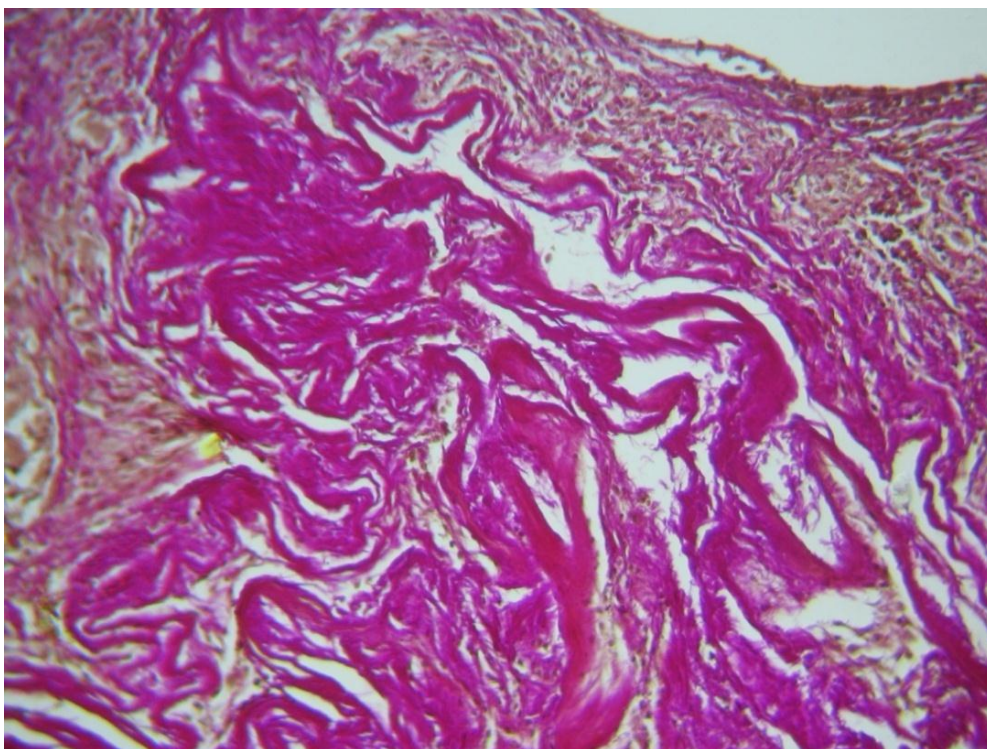


Рисунок 10. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию. Срок имплантации 7 дней. Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

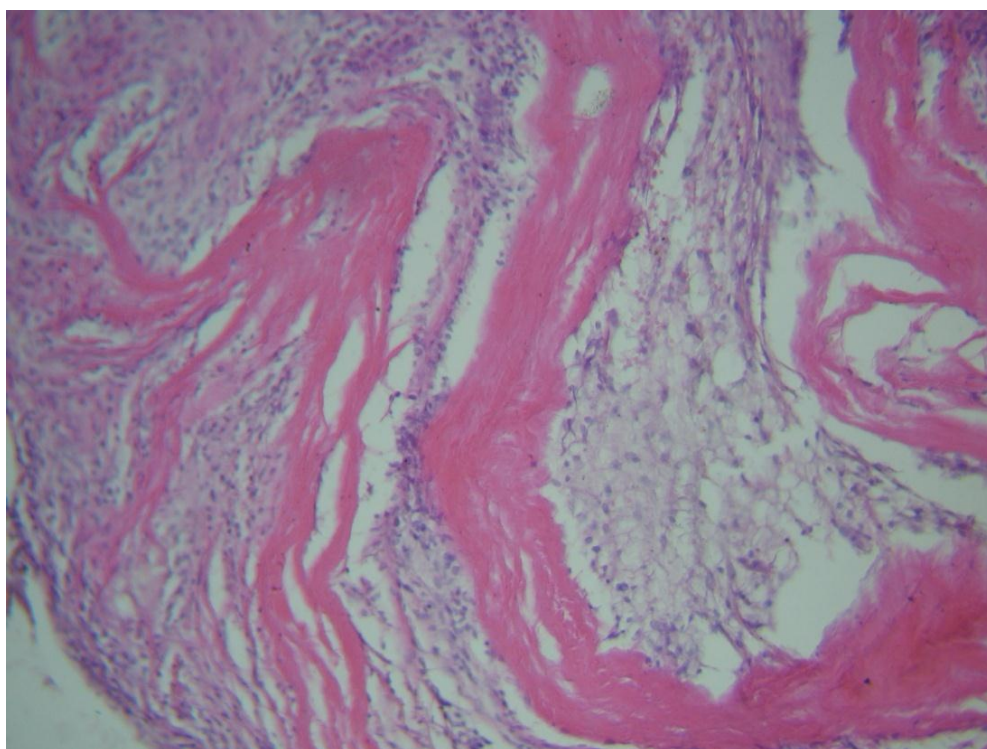


Рисунок 11. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию. Срок имплантации 14 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200

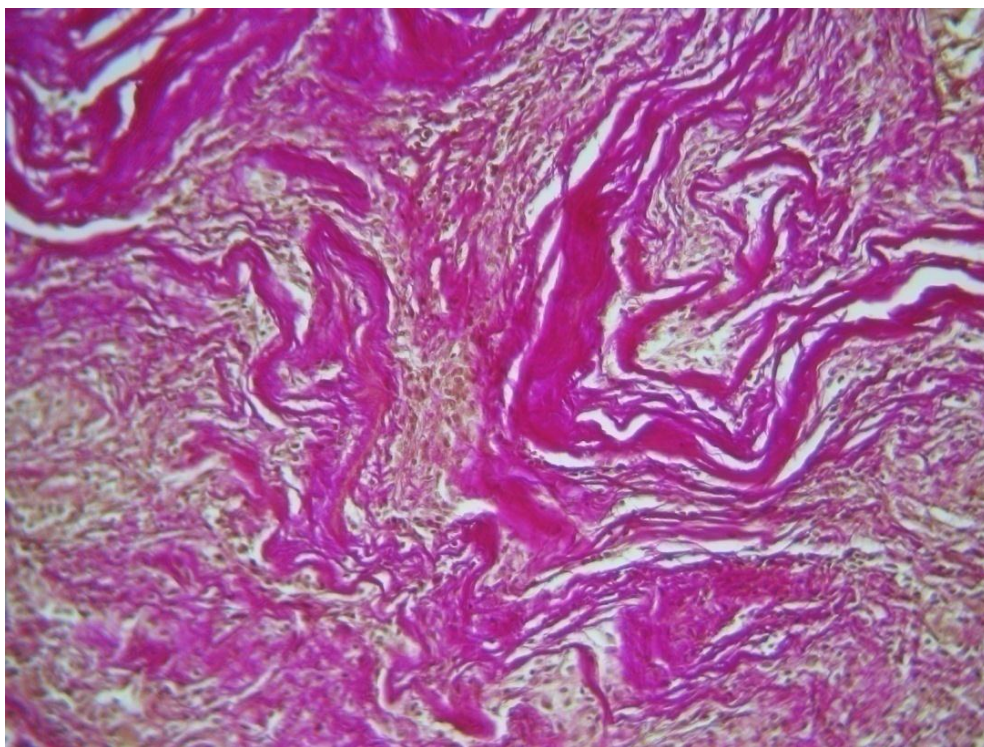


Рисунок 12. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию. Срок имплантации 14 дней. Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

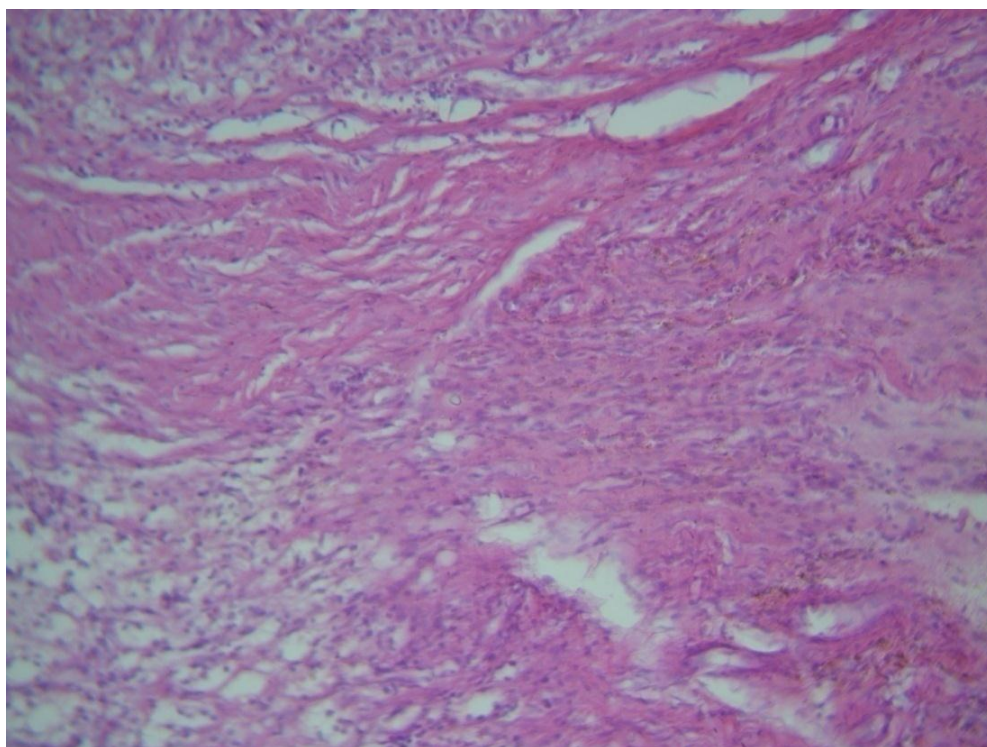


Рисунок 13. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию. Срок имплантации 30 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200

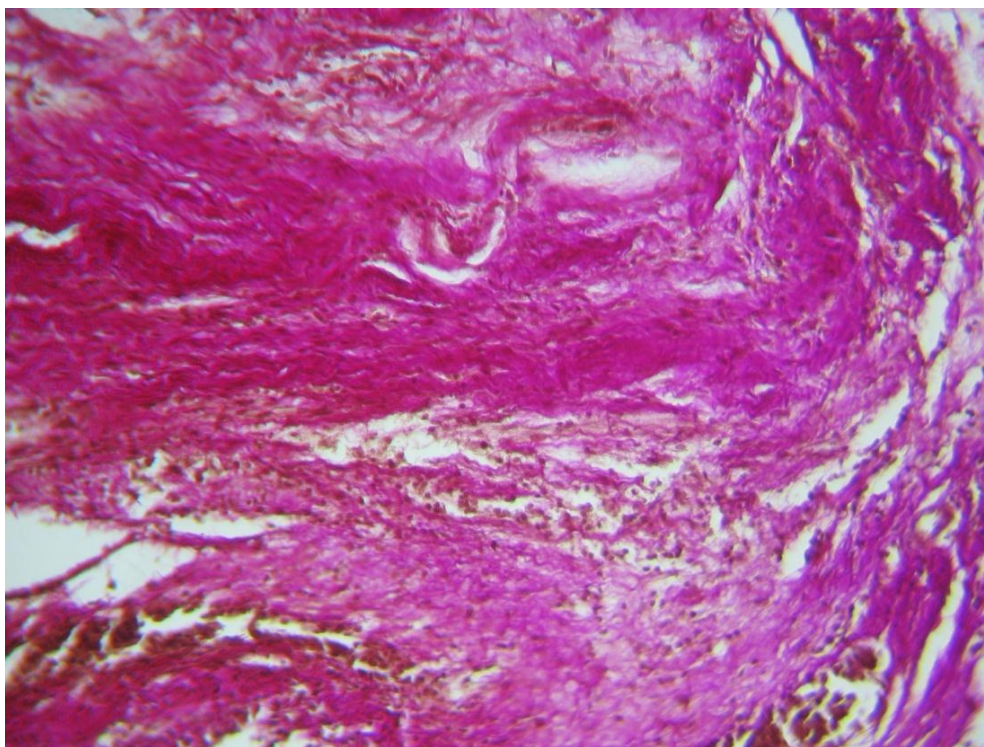


Рисунок 14. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию. Срок имплантации 30 дней. Окраска по Вейгерту-Ван-Гизону, x200.

На образцах ВКМ после 7 дневной имплантации (рис 9-10) можно наблюдать ярко выраженную лимфогистоцитарную инфильтрацию по краю образца, формирование коллагеновых волокон вокруг образца, отсутствие следов биodeградации, слабо выраженную васкуляризацию (формирование одиночных кровеносных сосудов).

На образцах ВКМ после 14 дневной имплантации (рис 11-12) можно наблюдать выраженную лимфогистоцитарную инфильтрацию по всему образцу, формирование коллагеновых волокон вокруг образца и между его волокнами, биodeградацию по всему образцу, ярко выраженную васкуляризацию (множественное формирование сосудов).

На образцах ВКМ после 30 дневной имплантации (рис 13-14) можно наблюдать замещение образца фиброзированной грануляционной тканью и восстановление собственной структуры ткани реципиента по месту

имплантации. На более поздних сроках после имплантации наблюдается полная замена образца собственной тканью реципиента. Данный материал потенциально может быть использован в качестве медицинского изделия.

ВЫВОДЫ

1. Выполнена химико-биологическая обработка сырья, обработка сшивающим агентом, гистологический контроль полученного материала выявил отсутствие клеточных элементов и сохранность коллагеновых и эластиновых волокон.

2. Отмечено снижение физико-механических параметров биоматериала после химико-биологической обработки, что обуславливается негативным воздействием децеллюляризирующего агента на фибриллярные белки.

3. Установлено, что биоматериал после подкожной имплантации не вызывает острой воспалительной реакции и отторжения, способен к биоинтеграции и биодеградации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анурьев, В. И. Справочник конструктора-машиностроителя в 3т. И. Анурьев; 8-е изд., перераб и доп. Под ред. И. Н. Жестковой — М.: Машиностроение, 2001. — Т.1 — С. 34.
2. Барашков, Г. К. Медицинская бионеорганика. Основы, аналитика, клиника./ Г. К. Барашков. — М.: Бином, 2011. — 512 с.
3. Венедиктов, А.А. Разработка биоматериалов для реконструктивной хирургии на основе ксеноперикардальной ткани: диссертация ... кандидата медицинских наук / А.А. Венедиктов.— Москва, 2014.— 126 с.
4. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс] : электрон.учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. Красноярск : ИПК СФУ, 2009.
5. Гайворонский, И. В. Нормальная анатомия человека / И. В. Гайворонский. — СПб. : СпецЛит, 2013. — Т. 1 — 561 с.
6. Глузман, А.М. Справочник хирургических операций./ А.М. Глузман, И.М.Матяш. — Киев: "Здоровье", 1979. — 309с.
7. ГОСТ Р ИСО 10993-2-2015 "Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными".
8. Каган, И.И. Топографическая анатомия и оперативная хирургия: учебник / И.И.Каган, С.В. Чемезов. —М.: "ГЭОТАР-Медиа". — 2009. — 672 с.
9. Карлов, А. В. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики/ А. В. Карлов, В.П. Шахов.- Томск: STT, 2001. — 480с.
10. Кобзарь, А.И. Прикладная математическая статистика. /А. И. Кобзарь. — М.: Физматлит, 2006. — 816 с.
11. Кованов, В. В. Эксперимент в хирургии. —М: Молодая гвардия, 1989. — 240 с.

12. Курапеев, Д. И. Тканевая инженерия клапанов сердца: децеллюляризация алло- и ксенографтов /Д. И. Курапеев, А. В. Лаврешин, С. В. Анисимов // Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург. – 2012. – Vol. 1. – P. 34-39.
13. Патент РФ № 2197818 Способ подготовки биоткани для ксенопротезирования.
14. Платэ, Н.А. Физиологически активные полимеры/ Н.А. Платэ, А. Е.Васильев – М.: Химия, 1986. — 296 с.
15. Севастьянов, В. И. Биосовместимые материалы/ В. И. Севастьянов, М. Т. Кирпичникова. – М.: «МИА», 2011. – 544 с.
16. Филатов, А.Н. Пересадка и замещение тканей и органов./ А. Н. Филатов, Ю. В.Берингер. – Л.: Медицина, 1990. – 324с.
17. Хлусов, И.А. Основы биомеханики биосовместимых материалов и биологических тканей: учебное пособие/ И. А. Хлусов, В. Ф. Пичугин, М. А. Рябцева– Томск: Издательство Томского политехнического университета, 2007. – 149 с.
18. Aguirre-Chagala, Y. E. Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning / Y. E. Aguirre-Chagala, V. M. Altuzar-Aguilar, E. León-Sarabia, J. C. Tinoco-Magaña, J. M. Yañez-Limón, C. O. Mendoza-Barrera // Materials Science & Engineering C. – 2017. –Vol. 76. – P. 897-907.
19. Badylak, S. F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction/S. F. Badylak //Semin Cell Dev Biol. – 2002. – Vol. 13(5) . – P. 77-83.
20. Carmeliet, P. Angiogenesis in cancer and other diseases/ P. Carmeliet, R.K. Jain// Nature. – 2000. – Vol 407. – P. 49–57.
21. De Castro, L. Lyophilization: a useful approach to the automation of analytical processes?/ L. de Castro, A. Izquierdo// Journal of Automatic Chemistry. – 1990. – Vol 12. –P. 267-279.

22. Courtman, D. W. Development of a pericardial cellular matrix biomaterial: Biochemical and mechanical effects of cell extraction/D. W. Courtman, C. A. Pereira, V. Kashef, D. McComb, J. M. Lee, G. J. Wilson // *J Biomed Mater Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 55-66.
23. Clark, J. N. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminium chloride/ J. N. Clark, M. F. Ogle, P. Ashworth, R. W. Bianco, R. J. Levy // *Ann Thorac Surg.* – 2005. – Vol. 79(3). – P. 897- 904.
24. Englert, C. Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking/C. Englert, T. Blunk, R. Mueller, S. Schulze von Glasser, J. Baumer, J. Fierlbeck, I. Heid, M. Nerlich, J. Hammer // *Arthritis Research & Therapy.* – 2007. – Vol. 9. – P. 1-11.
25. Fishbein, M.C. Calcifications of cardiac valve bioprostheses. Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system / M.C. Fishbein, R.J. Levy, V.J. Ferrans, L.C. Dearden, A. Nashef, A.P. Goodman, A. Carpentier // *J. Thorac Cardiovasc Surg.* – 1982. – Vol. 83, N.4. – P. 602-609.
26. De Gaetano, A. Modeling rejection immunity / A. de Gaetano, A. Matone, A. Agnes, P. Palumbo, F. Ria, S. Magalini // *Theoretical Biology and Medical Modelling.* – 2012. – Vol. 9. – P. 18.
27. Haseltine, W. A. The Emergence of Regenerative Medicine: A New Field and a New Society/ W. A. Haseltine // *The Journal of Regenerative Medicine.* – 2001. – Vol. 2. – P. 17-23.
28. Hrebikova, H. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix/ H. Hrebikova, D. Diaz, J. Mokry // *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky.* – 2013. – Vol. 159(1). – P. 12-17.
29. Jennings T. A. Lyophilization: introduction and basic principles // *Englewood. CO : Interpharm Press.* – 1999 – P. 62

30. Kotaki, Ma. Z. Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering/Ma. Z.Kotaki, M. Yong, T. He, S. Ramakrishna, //Biomaterials. – 2005. – Vol. 26 . – P. 2527–2536
31. Kyncl, J. Modeling of Dielectric Heating within Lyophilization Process/ J. Kyncl, J. Doubek, L.Musálek// 10th International Conference on Mathematical Problems in Engineering, Aerospace and Sciences · ICNPAA. – 2014.
32. Lee, W. K. Heparinized bovine pericardium asa novel cardiovascular bioprosthesis/W. K. Lee, K. D. Park, D. K. Han, H. Suh, J. C. Park, Y. H. Kim // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21. – P. 23-30.
33. Liapis, A. I. A theory for the primary and secondary drying stages of the freeze-drying of pharmaceutical crystalline and amorphous solutes: comparison between experimental data and theory/ A. I. Liapis, R. Bruttini// Separations Technology. – 1994. – Vol. 4(3). – P. 144–155.
34. Mendoza-Novelo, B. The effect of surfactants, crosslinking agents and L-cystein on the stabilization and mechanical properties of bovinepericardium/B. Mendoza-Novelo, J.V. Cauich-Rodríguez//Centro de Investigación Científica de Yucatán. – 2009. – Vol 7. – P. 123 – 131.
35. De Mel, A. A potential platform for developing 3D tubular scaffolds for paediatric organ development/A. de Mel, T. Yap, G. Cittadella, L. Hale, P. Maghsoudlou, P. de Coppi, M. Birchall, A. Seifalian, // Mater Sci: Mater Med. – 2015. – Vol. 26 (3). –P. 1-8.
36. Park, S. M.Effect of pulsatile flow perfusion on decellularization/ Sung Min Park, Seran Yang, Se-Min Rye Seong Wook Choi// BioMedical Engineering OnLine. – 2018.
37. Radhakrishnan, N. S.Bioinformatics in crosslinking chemistry of collagen with selective cross linkers/N. S. Radhakrishnan, A. Gnanamani, S. Shanmugasamy,R. K. Gopal, A.B. Mandal//BMC Research Notes. – 2011. – Vol. 4 . – P. 335-339.

38. Rowe, T.W.G. Freeze-drying of biological materials: some physical and engineering aspects/ T.W.G Rowe // *Current Trends in Cryobiology*. – 1970 – P. 61-13.
39. Rieder, E. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells/ E. Rieder, G. Seebacher, M. Kasimir// *Thorac Cardiovasc Surg*. – 2004. – Vol. 127(2) . – P. 399–405.
40. Sadikoglu, H. Optimal control of the primary and secondary drying stages of bulk solution freeze drying in trays/ H. Sadikoglu, A. I. Liapis, O. K. Grosser// *Drying Technology*. – 1998. – Vol. 16 (5). – P. 399–431.
41. Samouillan, V. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprotheses/ V. Samouillan, J. Dandurand-Lods, A. Lamure, E. Maurel, C. Lacabanne, G. Gerosa, A. Venturini, D. Casarotto, L. Gherardini, M. Spina// *Biomed Mater Res*. – 1999. – Vol. 46. – P. 531–538.
42. Sezer, U. A design achieved by coaxial electrospinning of polysulfone and sulfonated polysulfone as a core-shell structure to optimize mechanical strength and hemocompatibility/ U. A. Sezer, K. Ozturk, B. Aru, G. Y. Demirel, S. Sezer// *Surfaces and Interfaces*. – 2018. – Vol 10. – P. 176-187.
43. Skjöld, R. Xenotransplantation – View of the Transplanted Patient/ R. Skjöld// *Proceedings of the 16th Internordic Symposium of the Nordic Committee for Veterinary Scientific Cooperation (NKVet)*. – 2004.
44. Shen, Z.Q. Comparison of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends as carbon source for biological denitrification/ Z. Q. Shen, J. Hu, J. L. Wang, Y. X. Zhou// *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2014. – Vol. 12 (4). – P. 1235-1242.
45. Schmitt, A. Optimized protocol for whole organ decellularization/ A. Schmitt, R. Csiki, A. Tron, B. Saldamli, J. Tübel, K. Florian, S. Siebenlist, E. Balmayor, R. Burgkart// *European Journal of Medical Research*. – 2017. – Vol 8. – P. 22-31.

46. Schmidt, C. E. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering/C. E. Schmidt, J. M. Baier// Biomaterials. – 2000. – Vol. 21. – P. 15-31.
47. Schoen, F. J. Tissue heart valves: Current challenges and future research perspectives/F. J. Schoen, R. J. Levy // J Biomed Mater Res. – 1999. – Vol. 47. – P. 39-65.
48. Subramaniam, R. Regenerative Medicine in Bladder Reconstructive Surgery/ R. Subramaniam//European Urology Supplements. – 2017. – Vol. 16. – P. 23-29.
49. Swamy, R. N. Bioinformatics in crosslinking chemistry of collagen with selective cross linkers/ R. N. Swamy, A. Gnanamani, S. Shanmugasamy, R. K. Gopal, A. B. Mandal//BMC Research Notes. – 2011. – Vol 4. – P. 28-39.
50. Taylor, A. L. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy/A. L. Taylor, C. J. Watson, J. A. Bradley //Crit Rev Oncol Hematol. – 2005. – Vol. 56 (1). – P. 23-46.
51. Water, J. J. Three-dimensional printing of drug-eluting implants: preparation of an antimicrobial polylactide feedstock material/ J. J. Water, A. Bohr, J. Boetker, J. Aho, N. Sandler, H. M. Nielsen, J. Rantanen// Journal of pharmaceutical sciences. – 2015. – Vol. 104 (3). – P. 1099-1107.
52. Yang, B. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. / B. Yang, Y. Zhang, L. Zhou, Z. Sun, J. Zheng, Y. Chen, Y. Dai //Tissue Eng Part C Methods. – 2010. – Vol. 16(5) . – P. 1-11.

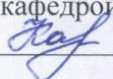
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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
 Г.А. Карпова
« 23 » 01 2018 г.

Задание

По ВКР студента Скрипко Юлии Васильевны

Тема работы: «Изучение влияния различных этапов обработки на свойства биоматериала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи».

Утверждена приказом по Университету от «04» 04 2018 г. № 276/0

Срок сдачи студентом законченной работы « 25 » 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	январь 2018	выполнено
2.	Поиск научной, справочной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	январь 2018	выполнено
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	январь - 2018	выполнено
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР	январь 2018	выполнено
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	январь - февраль 2018	выполнено
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	январь - февраль 2018	выполнено
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	февраль - март 2018	выполнено
8.	Проведение последовательной химико-биологической обработки сырья.	февраль - март 2018	выполнено
9.	Обработка биоматериала сшивающим агентом.	февраль - март 2018	выполнено
10.	Проведение гистологического контроля полученного материала.	февраль - март 2018	выполнено
11.	Проведение испытания биомеханических свойств биоматериала после ключевых этапов обработки.	февраль - март 2018	выполнено
12.	Проведение подкожной имплантации образцов и оценка тканевой реакции организма реципиента.	февраль - март 2018	выполнено
13.	Обработка и анализ полученных результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	февраль- март 2018	выполнено
14.	Оформление результатов исследования в виде графиков	февраль - март 2018	выполнено
15.	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	февраль- март 2018	выполнено
16.	Итоговое оформление ВКР	апрель - май 2018	выполнено
17.	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	май 2018	выполнено

Дата выдачи задания « 23 » 01 2018г.

Руководитель Н.В. / А.Д. Кручинина
Задание принял к исполнению [подпись]