

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Денисов Артём Александрович

**Обоснование эффективности и безопасности применения
полимерного матрикса, колонизированного дермальными
аутофибробластами для восстановления поврежденного
участка брюшины в эксперименте**

3.1.9. Хирургия,

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Липатов Вячеслав Александрович

кандидат медицинских наук, доцент

Мишина Екатерина Сергеевна

Курск – 2026

Список сокращений

СББ – спаечная болезнь брюшины

СПБП – спаечный процесс брюшной полости

КРС – крупный рогатый скот

СТ – скаффолд-технологии

ПО – программное обеспечение

СКМ – скаффолд на основе коллагена морского происхождения

СККРС – скаффолд на основе коллагена крупного рогатого скота

ТПБ – травма париетальной брюшины

Na-КМЦ – натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы

ПЖК – подкожно-жировая клетчатка

МФ – макрофаги

ФБ – фибробласты

ФЦ – фиброциты

М – макрофаги

Г – гранулоциты

Аг – агранулоциты

ГА – глутаровый альдегид

ГЛИО – глиоксаль (альдегид щавелевой кислоты)

ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России – федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ФГБОУ ВО КГУ – федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный университет»

НИИ ЭМ КГМУ – научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Курского государственного медицинского университета

ЛЭХиО НИИ ЭМ КГМУ – лаборатория экспериментальной хирургии и онкологии научно-исследовательского института экспериментальной медицины Курского государственного медицинского университета

ИЛМИ НИИ ЭМ КГМУ – испытательная лаборатория медицинских изделий научно-исследовательского института экспериментальной медицины Курского государственного медицинского университета

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	16
1.1. Характеристика процесса ранозаживления: сущность процесса, разновидности, механизмы реализации в послеоперационном периоде.	16
1.2. Скаффолд-технологии и тканевая инженерия в хирургии.....	28
1.3. Современные тканеинженерные конструкции и их применение в хирургии.....	36
1.4. Преимущества и недостатки применения тканеинженерных конструкций в хирургии.....	40
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	48
2.1. Материалы исследования.....	48
2.2. Дизайн исследования.....	50
2.3. Распределение материала по группам исследования и последовательность выполнения экспериментов.....	53
2.4. Методы исследования.....	54
Глава 3. Результаты исследования.....	74
3.1. Результаты сравнительного изучения физико-механических свойств полимерных матриксов.....	74
3.2. Результаты изучения структурных свойств полимерных матриксов.....	77
3.3. Результаты изучения функциональной и синтетической активности культур фибробластов в толще матрикса.....	79
3.4. Изучение реакции тканей при подкожной имплантации полимерных матриксов.....	81
3.5. Изучение уровня гидроксипролина перипротезных капсул.....	89
3.6. Изучение реакции тканей на экспериментальных моделях.....	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	125
ВЫВОДЫ.....	129
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	131

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Подавляющее большинство хирургических операций (свыше 7 млн. в мире ежегодно) приходится на вмешательства на органах брюшной полости, число которых неуклонно растет в результате ряда причин: естественный прирост населения и, как следствие, увеличение частоты абдоминальной хирургической патологии, а также коморбидность, иммунодефициты и др. Данные состояния приводят к ухудшению регенерации тканей и кратно повышают риск их инфицирования после проведенного лечения. Безусловно, проблема заживления послеоперационных ран имеет не только медицинское, но и социально-экономическое значение [35, 94].

Процесс регенерации тканей в послеоперационном периоде сложен и его нарушение может привести к ряду осложнений, среди которых: нагноение, нарушение функции органа и некроз тканей, распространение гнойно-воспалительного процесса на здоровые органы и ткани, спаечный процесс брюшной полости. Принимая во внимание вышеобозначенные проблемы, достижение быстрого восстановления поврежденных тканей является одной из важнейших задач, особенно в условиях коморбидной патологии (пожилой и старческий возраст, иммунодефицитные состояния, в том числе связанные с применением противоопухолевых средств, хронические заболевания, ассоциированные с повреждением эндотелия сосудов, перенесенные тяжелые вмешательства, в частности удаление органа или его резекция) [40, 88].

Несмотря на широкий перечень методик и средств, направленных на стимуляцию процесса регенерации тканей, интерес к данной проблеме не угасает. Существует ряд проблем, обусловленных отсутствием в арсенале хирургов ранозаживляющих средств с программируемым действием,

персонализированного подхода при лечении пациентов в послеоперационном периоде.

Среди существующих подходов к стимуляции процессов регенерации выделяются биологические, химические и физические методики. Биологический метод занимает лидирующую позицию благодаря эффективному применению коллагеновых материалов. Коллаген обладает уникальной способностью создавать структурированную матрицу непосредственно в зоне повреждения, стимулируя локальные иммунные реакции, активируя процессы пролиферации и миграции клеток иммунной системы (гранулоциты, макрофаги), обеспечивая миграцию фибробластов и улучшая доставку биологически активных молекул (факторов роста). Одновременно коллаген индуцирует формирование новых кровеносных сосудов (ангиогенез) [59].

Применение специально подготовленных коллагеновых матриц, заселенных аутологичными клеточными культурами пациента (фибробластами), позволяет значительно ускорить процесс восстановления поврежденных тканей и органов, особенно в послеоперационном периоде. Такой подход обеспечивает персонализированное лечение и минимизирует риски осложнений, характерные для традиционной терапии спаечного процесса брюшной полости, поскольку основывается на технологиях тканевой инженерии, способствующих целенаправленному персонализированному формированию зрелых рубцовых структур без избыточного образования патологической грануляционной ткани. [15, 59, 74].

Степень проработанности темы

Вопросы программируемой регенерации тканей обладают неоспоримой актуальностью на протяжении многих лет. Невозможно обойти вниманием и тот факт, что последние 10 лет во всем мире кратно возросло количество экспериментальных работ, посвященных разработке тканеинженерных 3D

конструкций, способных локально и персонализированно стимулировать восстановление тканей или заместить поврежденные участки органов и тканей. Большую популярность набирает объединение клеточных и аддитивных технологий. Все вышеперечисленные направления исследовательских работ направлены на сохранение и восстановление поврежденных органов и тканей, их функций и нивелирование вероятных осложнений, что напрямую влияет на социальные и психологические аспекты жизни пациента. В настоящее время активно прорабатываются этические и правовые вопросы культивирования клеток человека и их нанесение на трехмерные конструкции, разрабатывается и дополняется тактика ведения пациентов, которым показано применение биотехнологического лекарственного препарата.

В последние годы данную тему неоднократно освещали в своих трудах такие исследователи, как С.С. Дыдыкин (2024 г.), Д.И. Рябкин (2023 г.), Е.В. Блинова (2024 г.), Р.М. Бадыров (2024 г.). Кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии и лаборатории экспериментальной хирургии и онкологии НИИ экспериментальной медицины КГМУ работы, освещающие применение тканеинженерных конструкций с целью программируемой репарации поврежденных тканей, рассматриваются в качестве перспективного научного направления, которые до настоящего момента не прорабатывались. Однако технологический процесс разработки матриц, заключающийся в лиофильном высушивании полимерных растворов, лежал основе работ В.А. Липатова, С.В. Лазаренко, Д.А. Северинова, А.А. Панова. Предложенные методики испытания изделий *in vitro* универсальны и могут быть использованы для изучения порошков, гелей, губчатых изделий, материалов с добавленными свойствами [125].

В настоящее время нельзя утверждать, что достигнуты удовлетворительные результаты лечения пациентов с повреждениями стенок

серозных полостей организма, покрытых серозой органов и тканей уже имеющимися средствами.

Известно, что одним из важных свойств фибробластов, культуры которых наносят на трехмерные конструкции, является универсальность. Находясь на низком уровне дифференцировки, они способны сформировать соединительную ткань, характерную для области аппликации. Таким образом, актуальность исследования не вызывает сомнения, и несмотря на высокий интерес к скаффолд-технологиям со стороны исследователей, вопрос экспериментальной апробации эффективности применения данных изделий, а также их безопасности остается недостаточно изученным.

Цель исследования:

Обосновать эффективность применения ранозаживляющего матрикса, заполненного культурами дермальных аутофибробластов при операциях на органах брюшной полости и для восстановления дефекта брюшины в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Оценить физико-механические и химические свойства разработанных образцов полимерных матриксов;
2. Изучить структурные свойства разработанных полимерных матриксов;
3. Разработать способ и изучить темпы заполнения полимерных матриксов колониями дермальных фибробластов;
4. Оценить ранозаживляющее действие коллагеновых матриксов, заполненных колониями дермальных аутофибробластов на модели механической травмы брюшины;

5. Изучить реакцию тканей на имплантацию в подкожно-жировую клетчатку прекондиционированных культурами клеток и непрекондиционированных матриксов в сравнительном аспекте.

6. Изучить динамику интеграции импланта в тканевые структуры слепой кишки и брюшины при использовании коллагеновых матриксов, заполненных дермальными аутофибробластами.

Научная новизна исследования

Предложены два варианта полимерных матриксов на основе коллагена морского происхождения: способ получения пористого коллагенового матрикса (патент на изобретение №2023110131 от 20.04.2023); способ получения пористого коллагенового матрикса на основе морского коллагена с использованием глутарового альдегида (патент на изобретение № 2023131023 от 24.06.2024), отличающихся использованием сшивающего агента (кросслинкера) и режимами лиофильной сублимации.

Предложен способ заполнения матриксов культурами фибробластов (приоритет по заявке № 2025107800 от 31.03.2025 г. на выдачу Патента РФ на изобретение).

Предложен матрикс на основе коллагена морского происхождения, который обладает позитивными физико-механическими, химическими и структурными свойствами, благодаря короткой молекулярной цепи, что дает ему преимущество перед рутинно применяемым коллагеном КРС для изготовления медицинских изделий и ЛС.

Предложена технология изготовления и применения индивидуального биомедицинского клеточного препарата на экспериментальных моделях абдоминальной хирургической патологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Важным преимуществом применения тканеинженерных конструкций для восстановления поврежденных тканей является персонализированное использование (на матрикс наносятся культуры фибробластов этого же пациента, что сводит к минимуму побочные действия биогенного характера и ускоряют интеграцию). Применение новых матриксов, колонизированных культурами фибробластов, позволят эффективно решить вопросы, связанные с длительно заживающими повреждениями внутренних органов и тканей.

Использование коллагена морского происхождения в качестве основы для изготовления матрикса позволит в будущем получать новые биологически инертные, эффективные и безопасные изделия медицинского назначения, а также лекарственные препараты.

Предлагаемое в работе решение открывает возможность разработки целого ряда 3D полимерных структур, предполагающих их непосредственное использование при проведении хирургических вмешательствах на органах и тканях.

Исследование проведено в рамках совместных проектов в смежных областях науки: экспериментальной хирургии, морфологии, химии, фармакологии и биотехнологии. Разработка и испытание матриксов реализованы на базе НИИ экспериментальной медицины (лаборатория экспериментальной хирургии и онкологии и испытательная лаборатория медицинских изделий) Курского государственного медицинского университета с привлечением ведущих специалистов и консультантов России и ближнего зарубежья.

Разработанный способ заполнения матриксов культурами клеток позволит в дальнейшем продолжить изготовления более сложных конструкций, имитирующих стенку полого органа, трубчатых структур (сосуды, протоки и др.).

Методология и методы диссертационного исследования

Диссертационная работа производилась в соответствии с основными методологическими принципами и правилами доказательной медицины. В рамках написания работы были использованы экспериментальные, лабораторные и математические методы исследования.

Объект исследования – экспериментальные образцы полимерных матриц, культуры клеток, биологические ткани и жидкости лабораторных животных (крыс), и их препараты, цифровые изображения макро-, микро- и ультрамикроскопии.

Предмет исследования – экспериментальные характеристики разработанных образцов, клинико-лабораторные характеристики лабораторных животных, биологических жидкостей и тканей, принявших участие в острых и хронических опытах.

Для статистической обработки результатов исследования применялись методы описательной и вариационной статистики. В качестве критерия статистической значимости результатов был установлен порог $p \leq 0,05$. Обработка и анализ данных выполнялись с применением специализированного программного обеспечения: пакета Statistica версии 13.0 (Dell Software Company, Round Rock, Texas, США) и программы GraphPad Prism версии 9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, California, США).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Матрикс на основе коллагена морского происхождения с добавлением глутарового альдегида обладает большей стабильностью, достаточным диаметром пор, чем аналогичный матрикс с добавлением глиоксаля.

2. Структура матрикса на основе коллагена морского происхождения с добавлением глутарового альдегида способствует эффективному культивированию дермальных аутофибробластов.

3. Прекондиционированный матрикс статистически значимо способствует снижению выраженности местной реакции тканей лабораторных животных в ответ на имплантацию.

Личный вклад автора

Диссертационная работа подготовлена автором лично, вклад автора определяется непосредственным участием на всех этапах исследования: разработка дизайна, работа с образцами по изучению их физико-механических и структурных характеристик, исследование ранозаживляющей активности опытных образцов, моделирование травм брюшины и слепой кишки животных в эксперименте, первичная обработка полученного материала, систематизация, статистическая обработка, анализ результатов.

Внедрение результатов научных исследований

Выполненное исследование расширяет сферу показаний для использования коллагена морского происхождения для клинического применения. Результаты диссертационного исследования внедрены в научную деятельность и учебный процесс (лекции и практические занятия) кафедр хирургического профиля и НИИ ЭМ КГМУ (г. Курск), ФГАОУ ВО БелГУ (г. Белгород), кафедры химии КГУ (г. Курск), учтены в производственном процессе ООО «АС РС» (г. Калининград).

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов подтверждается репрезентативным объемом выборки, достаточным количеством исследуемых параметров, применением современных методов лабораторно-инструментального тестирования медицинских изделий и биологических материалов, адекватным выбором инструментов статистической обработки данных. Исследование проводилось под наблюдением Регионального этического комитета при

ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России (протокол №4 от 15.12.2022 г.).

Основные результаты диссертационного исследования доложены на следующих мероприятиях: I Всероссийский научно-практический конгресс с международным участием «Биотехнология и устойчивое развитие» (г. Москва, 24.10.2023-26.10.2023 г.), Международная научно-практическая конференция «Эксперимент в хирургии и онкологии» (г. Курск, 13.09.2024 г., 19.09.2025 г.), III Международная научно-практическая конференция «Клеточные технологии в экспериментальной медицине» (г. Курск, 04.10.2024 г.), «МЕДИЦИНА МОЛОДАЯ» питч-сессия Северо-Западного и Центрального Федеральных округов (г. Санкт-Петербург, 17.04.2025 г.), XXIV научно-практической конкурс-конференции студентов с международным участием «Молодёжное научное творчество – эффективный путь подготовки медико-биологических кадров», посвященной 80-летию Победы в Великой Отечественной войне (г. Бишкек, Кыргызстан, 26.04.2025 г.), XI Всероссийская с международным участием научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов посвящённая 75-летию университета на Рязанской земле (г. Рязань, 16.10.2025 г.).

Апробация диссертационного исследования состоялась на совместном заседании кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии им. А.Д. Мясникова, хирургических болезней № 1, хирургических болезней № 2, хирургических болезней ИНО, общей хирургии, хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, гистологии, цитологии, эмбриологии, лабораторий НИИ экспериментальной медицины ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, протокол № 5 от «18» декабря 2025 года.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 3.1.9. Хирургия, так как направлениями ее исследований являются экспериментальная и клиническая разработка методов лечения хирургических болезней (п. 4) и

экспериментальная и клиническая разработка современных методов хирургического лечения (п. 6).

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.22. Клеточная биология, так как направлениями ее исследований являются изучение закономерностей изменения структурной и цитохимической организации клеток при культивировании их вне организма, определение условий для получения клеток с заданными свойствами, изучение особенностей формирования тканей *in vitro* (п. 11), клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий (п. 19).

Публикации

По материалам исследования опубликовано 9 научных статей, 4 из которых входят в категорию 2 ВАК РФ и 1 в категорию 3. Среди них 1 статья размещена в научной базе RSCI, 3 в международной наукометрической базе Scopus, 2 из которых относятся к хирургии, а 2 к клеточной биологии. Помимо этого, получено 3 патента Российской Федерации на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 158 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций. Библиографический список содержит 199 источников, из них 138 – отечественные публикации, 61 – иностранная литература. Работа иллюстрирована таблицами (16) и рисунками (48).

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Характеристика процесса ранозаживления: сущность процесса, разновидности, механизмы реализации в послеоперационном периоде

Согласно ряду исследований, ограниченная результативность классических подходов к лечению может объясняться формированием локального патологического гомеостаза в области раневого дефекта, который обеспечивается собственными регенеративными клетки организма [65]. В связи с чем в качестве перспективного направления в комплексной терапии подобных состояний рассматривается локальное использование клеточных технологий, направленных на стимуляции репаративной регенерации [14].

Ранозаживляющая активность – это способность ткани к регенеративному процессу, при котором происходит её восстановление после повреждений.

Выделяют несколько видов ранозаживления:

1) заживление первичным натяжением – наблюдается при ранах с ровными жизнеспособными краями, находящимися на расстоянии до 1 см относительно друг друга. В этом случае восстановление тканей происходит без гнойного воспаления, с минимальным образованием межучной (грануляционной) ткани и формированием тонкого линейного рубца. Классическим примером служат послеоперационные раны, у которых края сопоставлены и фиксированы первичными швами;

2) заживление вторичным натяжением – происходит при значительных тканевых дефектах, когда сближение краев раны невозможно, либо при присоединении инфекции. Процесс сопровождается гнойным воспалением, образованием грануляционной ткани, которая заполняет раневой дефект, и

завершается формированием выраженного, часто гипертрофированного рубца;

3) заживление под струпом представляет собой физиологический процесс регенерации поверхностных ран, протекающий под защитным слоем коагулированных белков крови и некротизированных тканей (струпом). Под ним последовательно происходят этапы воспаления, пролиферации и ремоделирования: активируются клетки иммунной системы, мигрируют фибробласты, синтезируется внеклеточный матрикс, формируется новая сосудистая сеть и эпителизация. Струп предотвращает вторичное инфицирование и поддерживает оптимальные условия для регенеративных процессов. заживление без рубца, возникающее при поверхностных ранах без повреждения росткового слоя кожи [30].

Повреждение тканей может возникать по различным механизмам. К факторам хирургического генеза относят денудацию (утрату эпителиального покрова кожи или слизистых вследствие механической травмы, химического воздействия, термического ожога или воспаления), компрессию тканей, продолжительное и травмоопасное хирургическое вмешательство, чрезмерное применение электрокоагуляции, использование агрессивных хирургических приёмов, внесение инородных материалов в рану, наложение шовного материала, обладающего выраженной реактогенностью (например, кетгута или хромированных нитей), избыточное натяжение краёв раны при ушивании, формирование послеоперационных гематом в зоне вмешательства [30].

Особо чувствительными к воздействию повреждающих агентов является серозные оболочки, в частности. Реакция её на любое раздражение в конечном итоге приводит к спайкообразованию. Спаечные тяжи представляют собой соединительнотканые структуры, основу которых составляют коллагеновые и фибриновые волокна. Термин «спайка» (от лат. *adhaesio* — прилипание) подразумевает сращение поверхностей ранее разобщённых структур. С биологической точки зрения, формирование спаек выполняет защитную функцию, а именно локализует очаг патологического воздействия,

предотвращая распространение воспалительного или инфекционного процесса в брюшной полости, а также способствует васкуляризации участков ишемизированных тканей. Поэтому при заживлении повреждений брюшины нередко происходит развитие спаечного процесса, который является актуальной и насущной проблемой современной медицины, так как консервативные методы лечения спаечной болезни брюшины (СББ) не имеют должной эффективности, а хирургическое лечение с рассечением элементов спаечного процесса брюшной полости (СПБП) зачастую приводит к рецидиву спайкообразования, который имеет большую выраженность [1].

При анализе существующих классификаций спаечного процесса следует учитывать, что подходы к их разработке варьируются в зависимости от хирургической специальности. Абдоминальные хирурги, гинекологи, а также хирурги-исследователи придерживаются различных концептуальных взглядов относительно систематизации спаек, что обусловило создание отраслевых классификационных шкал, адаптированных к специфике той или иной области хирургии. На протяжении многих десятилетий в отечественной хирургической практике широко применялась классификация спаечного процесса, предложенная Д.Н. Блащенко в 1956 году [68], структура которой представлена ниже.

I. По течению:

1) бессимптомные;

2) осложненные: а) требующие консервативного лечения; б) требующие повторных вмешательств.

II. По форме: плоскостные; тяжевые: а) шнуровидные; б) нитевидные; в) тракционные; пленчатые; паутинные; смешанные.

III. По структуре: рыхлые; паутинные; смешанные.

IV. По протяженности: одиночные, или ограниченные; множественные, или распространенные; сплошные.

V. В зависимости от вовлечения в процесс того или иного листка брюшины: париетальные; висцеропариетальные; висцеро-висцеральные; смешанные.

VI. По локализации: спайки верхнего отдела брюшной полости; спайки нижнего отдела брюшной полости; спайки всей брюшной полости.

VII. В зависимости от вызываемых патологоанатомических изменений органов брюшной полости: деформирующие; не деформирующие.

Данная номенклатура не обладает точными характеристиками выраженности процесса, что затрудняет использование в практике врачей [114].

В настоящее время Андреевым А.А., Глуховым А.А., Черных А.В. [и др.] (2024) предложена «Интегральная шкала оценки спаечной болезни» ROC-TPVS. Она состоит из двух блоков. Блок клинико-этиологической оценки спаечной болезни (ROC) включает в себя следующие оцениваемые показатели: число рецидивов (Relap); происхождение спаек (Origin); выраженность клинической картины (Clinical). Блок интраоперационной оценки спаечной болезни (TPVS) включает в себя показатели, оцениваемые во время оперативного вмешательства у больных со спаечной болезнью брюшной полости: топографический тип спаек (Topographic); распространенность спаек (Prevalence); васкуляризация (Vascularization); возможность разделения (Separation). В данной шкале каждому показателю при-своена обозначающая его буква и цифровой индекс, показывающие степень выраженности признака [121].

В современной хирургии применяется ряд подходов к количественной оценке спаечного процесса. Так, О.А. Мынбаевым разработана балльная шкала, позволяющая оценивать выраженность спайкообразования в брюшной полости и малом тазу с учётом их структурных особенностей. Оценка проводится по пятибалльной системе (от 0 до 4 баллов). При этом сращение органов малого таза со стенкой или органами брюшной полости трактуется как проявление спаечного процесса в брюшной полости [86].

Для объективизации оценки выраженности спаечного процесса профессором В.А. Липатовым был предложен метод семантического дифференциала совместно с расчётом площади плоскостных сращений. Данный подход обеспечивает количественную характеристику патоморфологических изменений брюшины, обусловленных спаечной болезнью брюшной полости (СПБП), и позволяет дифференцированно оценивать степень их выраженности [64].

С патогенетической точки зрения формирование спаек традиционно рассматривается как локальная реакция брюшины на воздействие повреждающего агента. В патологический процесс вовлекаются перитонеальная поверхность, мезотелиальные клетки, базальная мембрана и субмезотелиальная соединительная ткань. Совокупность этих реакций запускает каскад биохимических и клеточных реакций, которые при сбалансированном течении заживления ран завершаются регенерацией брюшины, тогда как при дисбалансе восстановительных механизмов наблюдается формирование патологических спаек [1].

Ключевое значение в патогенезе спаек имеет ишемическое звено, ключевыми этапами которого являются:

Механическое воздействие, в частности натяжение тканей, их компрессия, лигирование, нарушения анатомической структуры при оперативном вмешательстве, а также патологические процессы нехирургического генеза. Воздействие данных факторов вызывает сужение просвета капилляров, что в свою очередь приводит к снижению оксигенации тканей и органов.

Гипоксия тканей стимулирует образование активных форм кислорода — свободных радикалов.

Свободные радикалы выступают в качестве мощного триггера пролиферации и активации фибробластов.

Усиленная активность фибробластов сопровождается повышенным синтезом коллагена и других компонентов соединительнотканного матрикса, что в конечном итоге приводит к формированию спаек.

Развитие спаечной болезни брюшной полости протекает закономерно по описанному сценарию, что подтверждается рядом экспериментальных исследований. Так, работы R. Howlett и N. Fletcher совместно с соавторами продемонстрировали, что падение уровня кислорода внутри клеток напрямую коррелирует с механическим воздействием на капилляры — их компрессией, спазмом или растяжением. Также было установлено, что состояние гипоксии клетки стимулирует образование активных форм кислорода. Дополнительные исследования G. Murrell и соавторов показали, что сочетание компонента гипоксии и окислительного стресса выступает триггером, обеспечивающим ускорение темпов деления фибробластов. Более того, непосредственно сами фибробласты оказывают воздействие на данный патологический цикл. Так, взаимодействуя со свободными радикалами, фибробласты стимулируют собственную пролиферацию, что обеспечивает условия для последующего формирования грубых фиброзных спаек [166, 174, 186].

Ведущим звеном патогенеза образования как брюшинных спаек, так и келоидных рубцов кожи является индуцированный гипоксией ангиогенез, подразумевающий процесс формирования новых микрососудов из уже существующих капиллярных сетей. Данный механизм запускается при условии увеличения дистанции между клетками и ближайшими капиллярами до критической, при которой нарушается эффективная транспортировка кислорода и тканевых метаболитов [94].

Неоангиогенез протекает в несколько последовательных фаз:

Повышение сосудистой проницаемости и деградация базальной мембраны эндотелия;

Миграция эндотелиальных клеток к зоне гипоксии;

Активная пролиферация эндотелиальных клеток;

«Созревание» эндотелия и ремоделирование новообразованных сосудов.

При интраоперационном повреждении тканей начальная фаза неоангиогенеза протекает атипично. Повреждение мезотелиального слоя брюшины изменяет классическую картину неоангиогенеза. Так, роль ведущих регуляторов ангиогенеза играют проангиогенные медиаторы, которые выделяются клетками микроокружения, в первую очередь эндотелиоцитами, тучными клетками и макрофагами. Под влиянием проангиогенных факторов эндотелиальные клетки, локализованные в посткапиллярных венулах, активируются. Нарушается их связывание с базальной мембраной, эндотелиоциты мигрируют в межклеточное пространство, где формируют зачатки новой микрососудистой сети. Миграция клеток индуцируется за счёт экспрессии молекул адгезии на поверхности эндотелия, в частности E-селектина. В физиологических условиях эндотелиоциты находятся в состоянии покоя и крайне редко делятся митозом (примерно раз в 7–10 лет). Однако под воздействием ангиогенных цитокинов и факторов роста стимулируется их активная пролиферация, которая в конечном итоге завершается ремоделированием сосудистой сети [16].

Интенсивность формирования новых сосудов определяется динамическим равновесием между про- и антиангиогенными факторами. При преобладании ингибиторов или низком количестве стимулирующих факторов ангиогенез может полностью подавляться либо же протекать с малой интенсивностью. Напротив, превалирование факторов стимуляции ангиогенеза инициирует выраженный ангиогенный ответ.

К числу основных стимуляторов неоангиогенеза относятся: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), ангиогенин, эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующие ростовые факторы α и β (TGF- α , TGF- β), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), оксид азота (NO), интерлейкин-8, а также неспецифические модуляторы — матриксные металлопротеиназы

(MMP). Среди ингибиторов ангиогенеза выделяют: эндостатин, растворимые рецепторы VEGF (sVEGFR), тромбоспондин, ангиостатин (продукт расщепления плазминогена), вазостатин, рестин, тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP-1, TIMP-2) [164].

В современных концепциях репарации эпителиальных тканей и патогенеза спаечной болезни брюшной полости значительно возросло внимание к функциональной роли мезотелиальных клеток как активных участников процессов регенерации.

Воспалительный ответ, развивающийся после повреждения брюшины, контролируется мезотелиальными клетками, которые продуцируют эндогенные химические медиаторы. Эти вещества активируют кининовую систему, систему комплемента, а также гуморальные и клеточные компоненты иммунитета: иммунокомпетентные клетки, провоспалительные белки и биологически активные молекулы. В результате нарушается целостность брюшины, что сопровождается выходом серозно-геморрагического экссудата в брюшную полость, угнетением фибринолиза, усилением антифибринолитической активности перитонеальной жидкости, коагуляцией белков и формированием фибринозных сращений между органами [166].

Восстановление повреждённого мезотелиального слоя может происходить по нескольким путям:

- трансформация недифференцированных мезенхимальных клеток стромы с формированием новой мезотелиальной выстилки;

- трансформация периваскулярных клеток в мезотелиоциты;

- миграция мезотелиальных клеток с неповреждённых участков брюшины соседних органов;

- превращение клеток перитонеальной жидкости в функциональные мезотелиальные клетки;

- пролиферация и рост клеток с краёв дефекта;

- комбинация нескольких из перечисленных механизмов [183].

Полная регенерация брюшины в норме завершается примерно к 8 суткам после травмы. Уже через 12 часов после операции в ране обнаруживается значительное количество полиморфноядерных лейкоцитов, расположенных в сетях фибрина. К 24–36 часам число клеток в поверхностных слоях резко возрастает за счёт притока макрофагов. К 48 часам раневая поверхность покрывается монослоем макрофагов, удерживаемых матриксом, сформированным нитями фибрина. На 3–4 сутки при отсутствии инфекции полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги, фибробласты и мезотелиальные клетки активно мигрируют и пролиферируют, после чего не определяются в ране. Макрофаги сохраняются в фибриноидном сгустке дольше — до 5–7 дней. При нормальной фибринолитической функции брюшины в течение 24–72 часов происходит рассасывание фибриновых сращений и нормальное заживление. При сниженном фибринолизе в промежуток 4–10 суток фибриновые спайки подвергаются организации: в них прорастают фибробласты и эндотелиальные клетки, формируются капилляры, откладывается коллаген. Данный процесс стимулируется цитокинами и факторами роста.

Ключевую роль в спаечном процессе играют провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-1 (ИЛ-1) и фактор некроза опухоли (ФНО). Поскольку любое воспаление, будь то инфекционное или травматическое, сопровождается повышением продукции вышеназванных цитокинов, их концентрация в перитонеальной жидкости коррелирует со степенью тяжести спаечного процесса [137]. Острое воспаление запускается активированными тканевыми макрофагами, секретирующими ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α , среди которых ИЛ-1 выступает в качестве ведущего медиатора локального воспалительного ответа [19]. Данный цитокин стимулирует синтез белков острой фазы, компонентов комплемента, факторов коагуляции и ингибиторов протеаз, а также индуцирует функциональные изменения в эндотелиальных клетках и фибробластах, определяющих исход репарации. С одной стороны, ИЛ-1 способствует заживлению за счёт стимуляции пролиферации

вышеупомянутых клеток, с другой — способен вызывать патологические изменения в фибробластах, ведущие к избыточному коллагеногенезу и последующему развитию фиброза [131, 190].

Под влиянием интерлейкина-1 усиливается продукция эндотелиальными клетками простагландинов и ингибиторов фибринолиза [46, 105, 131, 169]. Совместно с этим ИЛ-1 стимулирует выработку фактора активации тромбоцитов (ФАТ), который, в свою очередь, запускает хемотаксис, агрегацию, повышает секреторную активность полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов, обеспечивая тем самым «респираторный взрыв», а также активирует метаболизм арахидоновой кислоты. В своих работах W.H. McBride (1989) и A. Hershlag с соавторами (1991) подтвердили корреляцию между концентрацией ИЛ-1 в ране и характером развития послеоперационных спаек [56, 165, 197].

Доказательством непосредственного патогенетического влияния ИЛ-1 и ФНО- α на процесс спайкообразования служат эксперименты на крысах. Так, введение антител, нейтрализующих действие данных цитокинов, приводило к значительному снижению формирования спаек в брюшной полости [165]. В отношении интерлейкина-6 (ИЛ-6) данные остаются неоднозначными [105, 165, 169]. Так, Y. Cheong и соавторы рассматривают ИЛ-6 как провоспалительный медиатор, участвующий в спаечном процессе. В то же время A. Rarkin в своих работах отметил отсутствие корреляции между уровнем ИЛ-6 и выраженностью перитонеальных спаек. Другие исследователи полагают, что ИЛ-6 обладает противовоспалительными свойствами, однако демонстрирует их на более поздних стадиях репарации тканей [195, 196].

Противовоспалительным действием обладает также интерлейкин-10 (ИЛ-10). Данный фактор продуцируется фибробластами, входящими в состав спаек, в значительно большем количестве, чем нормальными перитонеальными фибробластами. Этот факт косвенно указывает на участие ИЛ-10 в подавлении перитонеального воспаления. Вместе с тем в ходе ряда

исследований не было установлено достоверной связи между продукцией ИЛ-10 и интенсивностью спайкообразования [56, 113].

Подобные противоречия свидетельствуют о том, что механизмы разрешения воспалительного процесса, лежащего в основе формирования спаек, остаются недостаточно изученными [194].

Наиболее полно изучена роль трансформирующего фактора роста- β (ТФР- β), а именно его изоформы ТФР- β 1. Так, повышение экспрессии данного цитокина приводит к увеличению количества перитонеальных спаек. Согласно литературным данным, цитокины ТФР- β выполняют репаративную функцию при повреждении тканей любого генеза, что в свою очередь нередко сопровождается избыточным фиброзом и образованием спаек [113, 165]. Кроме того, ТФР- β обладает иммуносупрессивными свойствами. Повышенная секреция медиатора совместно с активацией гена ИЛ-10 может рассматриваться как компонент локального противовоспалительного ответа иммунной системы. Следует отметить, что максимальные концентрации ИЛ-10 выявляются в тех образцах спаек, где вместе с тем регистрируется высокое содержание ИЛ-1 β , что также подтверждается прямой корреляционной связью между уровнями этих двух цитокинов [56, 113].

Мезотелий брюшины секретирует хемокин ИЛ-8 в результате стимуляции ИЛ-1 и ФНО- α , которые также индуцируют синтез ИЛ-10. При развитии гнойного воспаления в брюшной полости уровень ИЛ-8 в перитонеальной жидкости повышается на несколько порядков, что обеспечивает хемотаксис нейтрофилов к зоне формирования воспалительных спаек [165, 198].

Согласно общепринятой таксономии, популяция макрофагов подразделяется на три основные субпопуляции: провоспалительную (M1), резидентную (M0) и противовоспалительную (M2), каждая из которых выполняет специфические задачи в развитии и завершении воспалительной реакции [40, 122]. Макрофаги M0, пребывающие в покое, способны к поляризации в зависимости от микроокружения,

дифференцируясь либо в M1, либо в M2 фенотип [40, 64]. Активированные формы данных клеток представлены двумя основными фенотипами: классическим, провоспалительным M1, и альтернативным, противовоспалительным M2. Ключевую роль в этом процессе играют различные пути метаболизма аргинина. Принципиальное метаболическое различие заключается в следующем: в макрофагах M1 метаболизм L-аргинина обеспечивает синтез оксида азота (NO), обладающего цитотоксическим действием в отношении патогенов, в то время как в макрофагах M2 тот же субстрат конвертируется в орнитин [40, 75]. Последний, в свою очередь, служит предшественником для продукции пролина и коллагена, стимулируя пролиферацию и фиброгенез. Выбор доминирующего пути активации определяется комплексом внешних сигналов и доступностью аргинина в микроокружении [40, 136]. Макрофаги M1 и M2 различаются не только по функции, но и по транскрипционным профилям [40, 92]. Их фенотипическая поляризация регулируется широким спектром внутриклеточных факторов. В результате активации специфических сигнальных каскадов макрофаги каждого типа экспрессируют уникальные маркеры. К регуляторным молекулам, определяющим поляризацию, относятся факторы транскрипции (STAT, IRF, NF-κB, PPAR, HIF и другие), а также адаптерные и сигнальные белки, образующие сложную взаимодействующую сеть [40, 56]. Поляризация в сторону фенотипа M1 контролируется преимущественно сигнальными путями, задействующими NF-κB, STAT1/2, STAT5, HIF-1α, IRF3 и IRF5 [3, 40, 125]. В дифференцировке макрофагов M2 ключевую роль играют STAT3, STAT6, HIF-2α, IRF4, PPARδ, PPARγ, PI3K и SMAD3 [3, 40, 105, 125]. Внутри основных фенотипов также идентифицированы более узкие субпопуляции с уникальными функциональными и секреторными профилями. Таким образом, нарушение активности макрофагов представляет собой один из фундаментальных факторов, ведущих к развитию митохондриальной дисфункции [40].

1.2. Скаффолд-технологии и тканевая инженерия в хирургии

Технологии скаффолдинга (от англ. scaffold – каркас, поддерживающая конструкция) представляют совокупность методов в области тканевой инженерии, направленных на выращивание клеточных культур на трёхмерных пористых матрицах (скаффолдах). Эти структуры, созданные из природных или синтетических материалов, служат основой для пространственной организации формируемой ткани или органа, подлежащего трансплантации, обеспечивают оптимальную среду для репаративных процессов и выступают платформой для адгезии и колонизации фибробластов [25].

В ответ на клеточное повреждение в организме инициируется комплекс физиологических и патологических реакций, включающий активацию компонентов внеклеточного матрикса, факторов роста, антикейлонов, цитокинов, хемокинов и иных биологически активных молекул. Их взаимодействие запускает каскад реакций, лежащих в основе механизмов регенерации и восстановления тканей. Естественным биологическим аналогом скаффолда служит внеклеточный коллагеновый матрикс – структурный каркас из коллагена и эластина, окружающий клетки в большинстве тканей и участвующий в регуляции их адгезии, дифференцировки, пролиферации и миграции. Несмотря на то, что этот процесс является физиологическим механизмом, обеспечивающим полное или частичное восстановление тканей, при обширных повреждениях он может приводить к избыточному рубцеванию либо принимать затяжной характер. Это, в свою очередь, ухудшает качество жизни пациента и повышает риск развития стойкой утраты трудоспособности [93].

В рамках поиска методов, направленных на ускорение восстановительных процессов в тканях, специалисты в сфере регенеративной медицины активно разрабатывают и внедряют биологически активные соединения, структурно и функционально близкие к эндогенным, а также

искусственные клеточные матрицы, предназначенные для поддержки естественных механизмов регенерации в роли структурного каркаса.

Хитозан – аминсахаридное соединение, являющееся производным линейного полимера хитина, экстрагируемого из экзоскелетов ракообразных. Для данного вещества характерна биоразлагаемость, а также выраженная антимикробная, противовирусная и антимикотическая активность. Ключевым свойством хитозана, обуславливающим его применение в создании скаффолдов, является способность к биodeградации с образованием метаболитически нейтральных продуктов. В организме он подвергается ферментативному расщеплению до N-ацетил- β -D-глюкозамина и β -D-глюкозамина – мономеров, входящих в структуру гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота представляет собой гликозаминогликан, выступающий структурным компонентом внеклеточного матрикса, синовиальной жидкости и хрящевой ткани.

Другим перспективным компонентом для создания клеточных матриц служит альгинат натрия или кальция – водорастворимые соли альгиновой кислоты, получаемой из бурых, красных и некоторых видов зелёных водорослей [149].

Альгинат также относится к группе полисахаридов, источником для которого служат те же виды водорослей; для практического применения его переводят в растворимую форму, обычно в виде натриевой или кальциевой соли. Он проявляет иммуномодулирующие и гемостатические свойства. При энтеральном применении альгинат способствует поддержанию нормоценоза кишечной микробиоты, обладает бактерицидным и гипополидемическим действием, выполняет функцию энтеросорбента, а также используется в технологиях микрокапсулирования фармакологических препаратов. Тем не менее, кинетика и механизмы его биodeградации в условиях *in vivo*, а также особенности тканевой реакции на его имплантацию остаются предметом дальнейшего изучения [148].

Коллаген представляет собой белок фибриллярного типа, формирующий структурную основу соединительнотканых структур у человека и животных. Он является ключевым компонентом сухожилий, связочного аппарата, хрящевой и костной ткани, дермы, а также входит в состав ряда других органов. Данный белок выполняет в организме каркасную и опорную функции, обеспечивая механическую прочность и эластичность соединительной ткани. В клинической практике коллаген нашел применение в виде гемостатических губок и раневых покрытий, а в тканевой инженерии служит материалом для создания матриц, предназначенных для культивирования разнообразных клеточных линий. Дегградация коллагена *in vivo* осуществляется в сжатые сроки под влиянием специфических ферментов – коллагеназ, катализирующих разрыв пептидных связей в определённых участках его молекулы [149].

На базе коллагенового сырья производятся биodeградируемые матрицы, основу которых составляет нативный (не подвергнутый реконструкции) коллаген I типа. Примером такого биоматериала служит препарат «КОЛЛОСТ», представляющий собой мультифункциональный фибриллярный белок. Исходным сырьём для его получения служит природный коллаген, выделяемый из кожных покровов крупного рогатого скота. Результаты исследований подтверждают высокий профиль эффективности и безопасности данного материала, что позволяет рекомендовать его к применению в широкой клинической практике.

Применение глиоксаля в производстве биоматериалов обусловлено двумя ключевыми свойствами: способностью придавать нерастворимость, а также выступать в роли сшивающего агента (кросс-линкера) в химии полимеров, включая коллагеновые системы. Функциональным аналогом глиоксаля в данном контексте является глутаровый альдегид, также относящийся к группе дубильных веществ [20, 52, 199].

Способы получения полимерных матриц на основе коллагена обуславливают их структурные, физико-механические и биогенные свойства.

В настоящее время существует ряд различных технологий изготовления скаффолдов – выщелачивание, воздействие газа на твердую часть матрицы, которое включает в себя методы фазного разделения полимера и разделения на фазы растворителя и гидрофильного мономера, синтез на основе компонентов плазмы крови и коллагена, способ электроспиннинга.

Выщелачивание – способ изготовления скаффолда, который включает в себя полимеризацию, применение растворителей, газов, прессовку природных и синтетических биоматериалов с выщелачиванием кристаллов хлорида натрия, тартрата натрия и цитрата натрия и с использованием технологии молекулярного сита. Данный метод позволяет контролировать пористость и геометрию изделия, что делает возможным создание пористости до 93% с размером пор 1000 мкм. Однако, в силу агрессивности веществ, используемых в данном методе, происходит потеря водорастворимых молекул и цитокинов в полимерных матрицах на основе коллагена [64].

Метод воздействия газа на твердую часть матрицы осуществляет путем расширения углекислого газа (CO_2) под высоким давлением. Данная технология позволяет добиться пористости в 93% с размером пор около 100 мкм, не теряя при этом цитокины, биологически активные вещества, так как удается полностью очистить поверхность скаффолда от растворителей. Тем не менее, способ воздействия газа на твердую часть матрицы является несовершенным, что связано с наличием в структуре модели нестабильного, склонного к повреждениям, скользящего слоя, наличие которого может привести к отслойке полимерной матрицы от имплантируемой поверхности [78].

Реализация данного метода в современных условиях может происходить двумя способами:

1. Метод фазного разделения полимера. В основе метода лежит стремительная сухая заморозка раствора полимера определенной концентрации и дальнейшая повторная сухая заморозка с получением пористого материала. В результате получают коллагеновые каркасы с порами

от 50 до 150 мкм, коллаген-гликозаминогликановые смеси с порами 90–120 мкм и хитозановые скаффолды с размерами пор 1–250 мкм. Размеры пор при этом можно регулировать, меняя условия заморозки.

2. Метод разделения на фазы растворителя и гидрофильного мономера. Данный метод основан на заморозке исходных материалов, последующей полимеризации гидрофильного мономера путем ультрафиолетового облучения и удаления растворителя стремительной разморозкой. Таким образом получают макропористый гидрогель. Схожим методом производства может служить способ погружения раствора полимера в нерастворимую среду, а затем в испаренный растворитель. Это приводит к образованию пористой структуры скаффолда. На заключительном этапе полученный материал подвергают воздействию ультразвука, замораживанию в жидком азоте при температуре $-198\text{ }^{\circ}\text{C}$, а затем лиофилизации, в результате чего образуется губчатая структура продукта.

Неоспоримым преимуществом данных методов дисперсии является возможность внедрения в материал гидрофильных или гидрофобных биологически активных молекул. Однако, методы фазного разделения полимера и разделения на фазы растворителя и гидрофильного мономера также несовершенны. К недостаткам можно отнести небольшие размеры пор и их разнообразную неудовлетворительно контролируемую структуру.

Для реализации технологии по созданию скаффолда на основе компонентов плазмы крови и коллагена плазму крови замораживают при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, размораживают при $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$, подвергают центрифугированию, отбирают 85 % супернатанта от первоначального объема плазмы и погружают в термостат при 37°C до полного растворения криопреципитата. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки выделяют при помощи тепловой ферментации коллагеназой при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ из жировой ткани пациентов, полученной после пластических операций, культивируют в полной ростовой среде (среда α -MEM, 20 % телячьей эмбриональной сыворотка, глутамин, антибиотики) при абсолютной

влажности и температуре +37 °С в 5 % CO₂. Полученный таким образом скаффолд нецитотоксичен и не подвергается резорбции.

Способ электроспиннинга также является одной из методик производства скаффолдов нано/микромасштабов, которые активно применяют при формировании протезов сосудов. Такие импланты обладают высокой механической прочностью, эластичностью, а также не препятствуют прорастанию клеток и их дальнейшей пролиферации. При данном способе получения скаффолда применяют как синтетические, так и биологические материалы. Основой синтетических материалов обычно служит полимолочная кислота и поликапролактон с функциональным слоем катехоламинов. Однако такой материал обладает крайне низкой биосовместимостью при его имплантации в мягкие ткани и при использовании в сосудистой хирургии [11].

Область применения скаффолдов представляет собой широкий спектр хирургических вмешательств.

За последнее десятилетие произошло активное внедрение полимерных матриц на основе коллагена в клиническую практику в различных областях медицины. В первую очередь были получены и использованы приближенные аналоги относительно простых в структурно-функциональном отношении тканей, таких как кожа, хрящ или кость, в последствии – более сложных эквивалентов тканей и органов – скелетной мускулатуры и печени.

Наиболее широкое применение полимерные матрицы нашли в общей хирургии, что связано с большим количеством полостных операций в данной области медицины. Кроме того, наиболее часто встречающимся видом хирургического вмешательства является герниопластика (около 3-4% среди всего населения). Проблема данной операции, связанная с необходимостью устранения дефекта передней брюшной стенки во избежание рецидива грыжи, до сих пор является актуальной. Она решается, в том числе, посредством использования полимерных матриц на основе коллагена [116].

Немаловажное значение скаффолды имеют и в акушерстве и гинекологии, что продиктовано высокой частотой оперативного

родоразрешения – кесарева сечения, которое является полноценной полостной операцией. Полимерные матрицы способны сократить срок восстановления матери после хирургического вмешательства, что необходимо для ее дальнейшей заботы о ребенке [13].

Сфера применения специализированных биосовместимых и биодеградируемых композиционных материалов может быть очень широкой. Наиболее востребованными данные материалы будут в травматологии и ортопедии, а также в челюстно-лицевой хирургии, нейрохирургии, нейроонкологии [64].

В настоящее время существует два основных подхода к реконструкции обширных костных дефектов — это использование костных графтов (ауто-, алло- и ксенографтов) или тканеинженерных конструкций. Тканеинженерная стратегия включения клеток в матрицу представляет собой обнадеживающую альтернативу для лечения повреждений костей. Эта стратегия состоит из трех основных блоков: клеток, матрицы (скаффолда) и остеоиндуктивных ростовых факторов. Каждый из этих элементов может вызывать тканевую регенерацию, но комбинация всех трех компонентов более эффективна [42].

Активно применяются полимерные матрицы и в сердечно-сосудистой хирургии. Скаффолды используются для протезирования и реконструкции сосудов и клапанов сердца, закрытия дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородок, пластики околосердечных тканей, профилактики формирования спаек в средостении. Матрикс на основе глиссоновой капсулы печени применяется для протезирования кровеносных сосудов, закрытия дефектов перегородок сердца и реконструкции клапанов [62].

В урологии возможно применение скаффолда на основе ксеноперикарда при пластике мочевыводящих путей, укреплении мышц тазового дна, урослингах и гинекологических слингах, закрытии культи почки, после вмешательств по поводу онкопатологии [11].

Таким образом, тканевая инженерия в хирургии находит все большее применение в клинических условиях. Стремительная разработка, внедрение и совершенствование методов программируемого воздействия на репаративные процессы, в особенности после выполненного оперативного вмешательства, подчеркивают актуальность и перспективность данного направления. Среди уже имеющихся решений особняком стоят скаффолд-технологии, которые подразумевают применение универсальных пластических полимерных материалов, которые могут использоваться в различных областях восстановительной медицины при замещении дефектов тканей и органов человека, реализуя персонализированный подход к лечению хирургической патологии.

1.3. Современные тканеинженерные конструкции и их применение в хирургии

На сегодняшний день коллаген активно используется в клинике в виде препаратов, материалов и изделий, которые применяются в качестве: раневых покрытий для лечения ран, трофических язв, ожогов, пролежней; средств для местного гемостатического применения и закрытия ран внутренних органов, остеопластических и хондропластических материалов, ускоряющих регенерацию костной и хрящевой ткани, в том числе при остеомиелите; пластических материалов для лечения пародонтоза и гингивита в стоматологии; коллагеновых пленок для пластики барабанной перепонки в отохирургии; пластических материалов для кишечных анастомозов; антикоагулянтных и антибактериальных коллагенсодержащих сосудистых протезов; материалов для временной окклюзии бронхов при стафилококковой деструкции легких; хирургического лечения миопии и глаукомы; биопластырей для обработки и лечения бытовых микротравм и других коллагеновых материалов. Нейрохирурги применили коллагеновый имплантат для реконструкции твердой мозговой оболочки у пациентов с дегенеративными, травматическими и опухолевыми изменениями спинного мозга [16].

В хирургии также активно применяются изделия из полимеров. Например, при сердечно-сосудистых операциях они предназначены для протезирования клапанов сердца и сосудов. С этой целью в клинической практике используют следующие полимерные материалы:

- для протезирования сосудов — волокна из фторированных полиолефинов (фторлон), полипропилена, полиэфирные волокна (лавсан);
- для клапанов сердца — кремнийорганические (силиконовые) каучуки, полипропилен, волокна из фторлона, поликарбонат. При некоторых

реконструктивных операциях на сердце применяют войлок различной плотности из фторлона [107].

В хирургии в настоящее время используется около 400 типов коронарных стентов, которые различаются друг от друга по некоторым характеристикам: состав материала, покрытие поверхности, которая контактирует с кровью, длина и дизайн отверстий, система доставки в коронарные сосуды. Все данные стенты подразделяют на четыре основные группы:

1) металлические (нержавеющая сталь марки 316L, платиноиридиевый сплав, тантал, сплав никелид-титана, сплав кобальт-хрома, титан, сплавы магния);

2) стенты с покрытиями (полимеры, оксид титана, нитрид титана, углерод, композиты) для улучшения биосовместимости и снижения образования тромбов на металлических поверхностях;

3) стенты, расщепляемые биологическими средами и ферментами (биodeградируемые);

4) стенты, выделяющие лекарственные препараты (drug eluting stents, DES) для предупреждения тромбообразования [15].

Довольно часто хирурги используют полимеры для операций на легких, пищеводе, кишечнике, мочевыводящих путях и др., однако всё больший оборот набирают клеящие композиции акриловых полимеров и, в частности, на основе эфиров цианакриловой кислоты. При помощи данных материалов обеспечивается герметичность соединения, возможность резкого сокращения количества накладываемых швов и даже бесшовного соединения, ускорение операций и сокращение времени заживления ран, а также для эмболизации при кровотечениях или перед удалением органа. При восстановительных операциях на трахее, бронхах, а также на операциях, связанных с необходимостью заполнения послеоперационных полостей, помимо клеев, довольно часто применяют вспененные и гелеобразные композиции на основе биоинертных и биосовместимых полимеров. Для пломбирования

послеоперационных полостей, восстановления формы молочной железы и др. активно используются полиорганосилоксаны (монолитные и вспененные). При травматологических и ортопедических операциях полимеры применяются для изготовления различных изделий внешнего протезирования (протезов конечностей, ортопедических вкладок, тугоров и др.) Полиэтилен, поливинилхлорид, стеклопластики, жесткие и эластичные пенопласты позволяют облегчить протезы, улучшить их функциональные, гигиенические свойства и внешний вид [107].

Для замены сухожилий и связок применяют лавсановые ленты. Пастообразные изделия, в основе которых находятся акриловые полимеры и сополимеры находят своё применение в операциях по закрытию дефектов черепа [103].

В регенеративной медицине в последние годы своё применение нашли коллаген и коллагенсодержащие децеллюляризованные материалы, которые в виде тканеинженерных конструкций используются для протезирования уретры и мочевого пузыря, трахеи, желчного протока [16].

В регенеративной медицине фибрин используется как самостоятельное вещество, так и как добавка к хитозану. Хитозан-фибриновые изделия применяются для создания раневых покрытий, а также в регенерации костной ткани. Помимо этого, данные биоконпозиты используются в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии [81].

Для местной доставки антибиотика в различных областях хирургии врачи применяют гентамицин-коллагеновые губки. Данные скаффолды показали свою эффективность при операциях на сердце, сосудах, желудочно-кишечном тракте и операциях на нижних конечностях [16].

Из-за своей химической структуры и конформации альбумин способен связываться со многими лекарственными веществами, поэтому он является отличным их носителем. В регенеративной медицине данное вещество активно используют совместно с хитозаном, например при операциях, направленных на восстановление поврежденной костной ткани [81].

В хирургии при операциях на диафрагме, при лечении грыж, замещении дефектов тканей брюшной стенки, закрытии дефектов пищевода и др., широко применяют сетчатые материалы из капронового волокна, полиэфирные волокна, волокна из полипропилена и фторлона. Так же некоторые хирурги используют трубки из полиэтилена, пластифицированного поливинилхлорида, кремнийорганических каучуков при протезировании желчных протоков, мочеточников, и такие операции имеют положительные результаты [107].

Таким образом, постепенно расширяется область практического применения тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии, травматологии, а также общей хирургии. Однако матриксы, заполненные культурами клеток пациента пока, не использовались в абдоминальной хирургии, в области которой выполняется наибольшее количество оперативных вмешательств в сравнении с другими областями. На основании изученных литературных источников наиболее рациональным и перспективным представляется разработка и применение скаффолдов, в которых полимерной основой выступает коллаген, обладающий достаточными физическими и биогенными свойствами.

1.4. Преимущества и недостатки применения тканеинженерных конструкций в хирургии

На данный момент учёные разработали разные виды матриксов (гели, порошки, растворы) из микробиологических материалов. На их основе получают дву- и трехмерные скаффолды в виде ультратонких пленок, мембран, губок, пористых конструкций [73].

Губки обладают следующими характеристиками: твердость и высокопористость. В зависимости от способа их изготовления и условий применения размер пор будет изменяться.

Матриксы в форме геля широко применяются в современной хирургии благодаря своим уникальным свойствам. Гели-матриксы служат эффективным средством доставки биологического материала в целевые области тела минимально инвазивными способами. Основные преимущества гель-скаффолдов заключаются в следующем: биологическая совместимость (материалы матрикса создаются таким образом, чтобы обеспечивать оптимальные условия для жизнеспособности и пролиферации клеток); удобство введения (матриксы легко доставляются в труднодоступные места посредством специальных катетеров или игл); поддержка роста и дифференцировки клеток (структура геля позволяет эффективно удерживать активные формы роста и низкомолекулярные пептиды, необходимые для поддержки жизнедеятельности клеток). Однако, важным моментом при разработке такого матрикса является стадия очистки. Как показали исследования, использование традиционных технологий очистки ведет к значительной утрате биоактивных компонентов, необходимых для поддержания оптимального клеточного окружения. Например, выявлено, что очистка скаффолда из подслизистого слоя тонкой кишки свиньи приводит к существенным потерям факторов роста и пептидов, критически важных для нормального развития клеток *in vitro*. Таким образом, при разработке

матрикс-гелей необходимо учитывать следующее: стадия очистки должна проводиться крайне осторожно, чтобы минимизировать потерю ключевых биоактивных веществ; выбор сырья должен соответствовать требованиям тканевого инжиниринга, учитывая особенности целевой ткани и необходимого клеточного поведения; применение таких материалов особенно актуально в реконструктивной медицине, трансплантологии и тканевом инжиниринге, позволяя реализовать новые возможности для восстановления утраченных тканей и органов с минимальным риском повреждения окружающих структур [73].

При использовании рассасывающейся мембраны активируется регенерация, что позволяет её активно применять в хирургической стоматологии при операциях, направленных на восстановление пародонта. Коллагеновые волокна, входящие в состав мембраны имеют особенности в составе и структуре, которые обеспечивают естественную длительную барьерную функцию.

Тканеинженерные матриксы в виде порошка сохраняют ультраструктурные и трехмерные особенности поверхности исходного материала. Так же авторами высказывается возможность разработки гибридных скаффолдов при совмещении подобной формы с синтетическими полимерами, что позволит расширить материальные и механические свойства последних [73].

Природные полимеры и их мономеры являются натуральными биоактивными веществами, это в свою очередь дает им неоспоримое преимущество в адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток на таких матриксах. Данные матриксы имеют в своём составе большое количество молекул воды, которые заполняют полимерную сеть. Их способность впитывать воду позволяет плотно заселять их клетками и имитировать высокогидратированное состояние естественных тканей. Разработка скаффолдов такого типа представляет особую ценность, так как структура данных биоконструкций – это структура натурального внеклеточного

матрикса. Это способствует повышению тканеиндуктивных свойств скаффолда [61].

Природные материалы при имплантации *in vivo* способны активировать адгезию клеток, а также хемотаксисную реакцию, так как обладают способностью экспрессировать естественные биологические сигналы. Именно по данной причине скаффолды такого вида являются наиболее предпочтительными. При использовании в качестве трансплантатов эти полимеры легко перестраиваются клетками реципиента. Также при изготовлении данных скаффолдов их волокнистые свойства позволяют регулировать их структуру и пористость [63].

Коллаген представляет собой белок внеклеточного матрикса (фибрилярный белок), коллагеновые фибриллы являются основой соединительных тканей организма и отвечают за ее прочность и эластичность. Современные технологии позволяют изготавливать разнообразные формы матриксов путём обработки материала. Коллаген, как и все остальные материалы имеет как преимущества, так и недостатки. Данный материал является биоразлагаемым и имеет высокую скорость деградации. Также из недостатков можно отметить наличие пептидов с иммуногенными свойствами и недостаточные механические свойства для обеспечения каркасной функции матрикса [61].

Целлюлоза – полисахарид, который является основой строения клеточной стенки высших растений. Из преимуществ данного материала, как матрикса, можно отметить: высокую степень гидрофильности, способность к клеточной адгезии, повышенную степень прочности при растяжении, в сочетании с податливостью при механической обработке. Среди недостатков матриксов на основе целлюлозы можно выделить следующие: обладают длительной биodeградацией, так как в организме человека отсутствуют специфические ферменты для расщепления целлюлозы – гидролазы; в структуре самого материала нанофибриллы имеют высокую плотность, из-за которой ограничено заселение матрикса клетками [61]. Разработаны

производные целлюлозы, которые позволяют устранить имеющиеся недостатки. Примерами таких материалов являются: карбоксиметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и др.

Фибронектин – структурный гликопротеин межклеточного вещества некоторых тканей. Он выполняет интегрирующую функцию межклеточного вещества и увеличивает клеточную адгезию. Преимуществами фибронектина являются: отсутствие токсичности, контролируемая скорость биodeградации и воспалительных реакций [61].

Хитозан – производное хитина, содержится в панцирях ракообразных (раки, крабы, креветки). Данный материал имеет ряд преимуществ, например, таких как: биосовместимость (отсутствие воспалительной или аллергической реакции), биоразлагаемость (естественно разлагается гидролитическими ферментами, такими как лизоцим) и нетоксичность (не выделяет токсических веществ при деградации) [63]. В качестве недостатка выделяют низкий уровень механической прочности изделий из данного вещества. Разработана смесь коллагена с хитозаном в соотношении 1:1, которая позволит не только увеличить механические качества продукта, но и уменьшить время его биodeградации ($65 \pm 1,7$ дней) [61].

Желатин – термически денатурированный коллаген. Доказано, что трехмерный желатиновый матрикс на основе различных хирургических сеток достоверно повышает способность обеспечивать адгезию и рост мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) [61]. Однако у данного материала есть ряд недостатков, например, такие как: вариабельность скорости биodeградации, которая зависит от способа получения, а также повышенная, по сравнению с коллагеном, водорастворимость в условиях живого организма [81].

Альгинат, агароза — полисахариды, источником которых являются красные и бурые морские водоросли. Сочетание данных материалов при использовании позволит усилить их механические и адгезивные свойства.

Также из преимуществ можно отметить приемлемую пористость матриц, изготовленных на основе альгината и агарозы, подходящую для клеточной миграции и доставки питательных веществ, а также показана на данных материалах с применением мезенхимальных стволовых клеток (МСК) хондрогенная дифференцировка. Отрицательным свойством данных субстанций считают очень медленную и неконтролируемую биodeградацию [61].

Гиалуроновая кислота – простой линейный полисахарид, состоящий из повторяющегося дисахарида. Положительными свойствами данного вещества для тканевой инженерии являются: гидрофильность, неиммуногенность, лёгкая модификация и синтез, созданные скаффолды заменяются внеклеточным матриксом, продуцируемым клетками реципиента при воздействии гиалуронидазы. Также материал имеет огромную биологическую активность: способствуют клеточной адгезии, а также росту клеток. Как и другие вещества, гиалуроновая кислота имеет некоторые недостатки. Такими являются: особенности механопрочностных характеристик, которые ограничивают их использование в качестве костных трансплантатов, ограниченная физическая и механическая стабильность, а также высокая скорость деградации ограничивают применение скаффолдов из биodeградируемых материалов для восстановления костной ткани [81].

Фиброин, спидроин – фибриллярные белки, выделенные из каркасного шёлка паутины пауков рода *Nephila*. К преимуществам данных материалов относят: высокую степень жесткости и прочности, также они универсальны при обработке. Механические свойства и размер пор таких матриц можно изменять путем введения определенной концентрации размера частиц порообразователя. Из отрицательных свойств скаффолдов отмечают низкую скорость биodeградации, которая не всегда достаточна в тканевой инженерии [61].

Полилактид – биodeградируемый, термопластичный полиэфир. Выделяют несколько стереоизомеров лактида: L–лактида, D–лактида и

рацемических форм LD–лактида. Каждый из них обладает определёнными преимуществами и недостатками. Полимер, полученный из L–лактида, обладает низкой скоростью биodeградации (несколько лет). Полимер из LD–лактида является высокобиodeградируемым полимером, но его механические свойства достаточно низкие. Некоторые из отрицательных качеств данных стереоизомеров возможно устранить при комбинации концентрации сополимеров L–лактида и LD–лактида. Данное сочетание придаёт полимеру необходимую механическую прочность и адекватную скорость биodeградации. Отрицательными свойствами полилактида считают его гидрофобность, из этого следует, что материал обладает низкой смачиваемостью. Данный факт свидетельствует о низкой проницаемости при использовании, что приводит к образованию незаполненных клетками пустых полостей. Продукты его распада приводят к локальному закислению, тканевым реакциям при его введении в организм, при этом материал показывает недостаточную прочность при сжатии [61].

Полигидроксibuтират и его различные производные при имплантации в лучшей степени поддерживают реконструктивный остеогенез и костеобразование происходит лучше при наличии таких полимеров. При изготовлении тканеинженерных конструкций для костной ткани используют полилактогликолид. Он является сополимером полилактида и полигликолида (линейный полиэфир, представляет собой полимер гликолевой кислоты). Преимуществами данного материала в тканевой инженерии считают возможность контроля скорости биodeградации. Помимо прочего, при культивировании на нем клеток он способен разлагаться на мономеры – природные метаболиты: молочную и гликолевую кислоты.

Ещё одним полимером, используемым в тканевой инженерии, является поликапролактон. Он из себя представляет полукристаллический биodeградируемый полиэфир. Данный материал прост в обработке и отличается прекрасными механическими свойствами, что является его преимуществом перед другими веществами в тканевой инженерии. Однако,

существует ряд отрицательных свойств, которые ограничивают использование поликапролактона для тканеинженерных конструкций. К ним относятся гидрофобная структура и отсутствие биоактивных функциональных групп [15, 61].

Кальцийфосфаты являются минералами, обогащенными ионами Ca^{2+} и PO_4^{4-} и основной составляющей естественного внеклеточного матрикса кости, которые обеспечивают его жесткость. Преимуществами этих веществ являются: обеспечение остеогенной дифференцировки клеток, благодаря сопутствию экспрессии соответствующих генов, что в свою очередь придает сделанным из них матриксам остеоиндуктивные свойства. Есть ещё одно применение кальцийфосфатов в тканевой инженерии. Они могут использоваться и как адъювант, к синтетическим полимерам улучшая механические свойства конструкции или как модификатор поверхности для костных имплантатов из металлов. Основные материалы этой группы, которые в настоящее время широко используются в тканевой инженерии это β -трикальций фосфат, гидроксиапатит и карбонат кальция. Разнообразие вариантов применения их для скаффолдов крайне высоко: покрытия из порошков и нанопорошков, также цементы и гели [61].

Таким образом, актуальным остаётся вопрос разработки индивидуально настроенных и управляемых методик влияния на ход постоперационного заживления раны, поскольку этот процесс весьма сложен и обусловлен множеством взаимосвязанных факторов, воздействовать на которые одновременно крайне затруднительно. Образующиеся спайки зачастую ведут к нарушению нормальной работы органов, увеличивают риск инвалидности и могут стать причиной смерти пациента.

Активное развитие технологий регенеративной медицины, основанное на применении синтетических каркасов (скаффолдов), подтверждает высокую значимость и потенциал данного научного направления. Сегодня существует большое разнообразие полимерных базисов и методов их обработки, что открывает широкие возможности для удовлетворения потребностей

различных направлений хирургии. Однако использование коллагена среди всех видов сырья более рационально, благодаря своим свойствам. Отдельного внимания стоит коллаген морского происхождения, имеющий параметры, которые его выгодно отличают от коллагена КРС.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Материалы исследования

2.1.1. Характеристика материала исследования

В рамках исследования объектом анализа выступили биосовместимые матрицы, состоящие из коллагена. Экспериментальными образцами являлись изделия для местного хирургического использования — в частности, для изоляции дефектов брюшинного покрова, аппендикса, кишечных швов однорядного кишечного шва, а также сетчатых имплантатов при герниопластике передней брюшной стенки с интраоперационной фиксацией. Разработка образцов осуществлена при научно-методической поддержке кафедры химии ФГБОУ ВО КГУ (научные консультанты: к.х.н, доцент Т.Н. Кудрявцева; зав. кафедрой, к.т.н. И.Б. Кометиани). Производство экспериментальных прототипов выполнено на технической базе лаборатории экспериментальной хирургии и онкологии НИИ экспериментальной медицины (руководитель – д. м. н., профессор В.А. Липатов) совместно с испытательной лабораторией медицинских изделий (руководитель – к.м.н. Е.Г. Обьедков) при НИИ экспериментальной медицины ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России (директор – д.б.н., профессор Е.Б. Артюшкова).

Научная гипотеза исследования строилась на потенциале заселения дермальными аутофибробластами биополимерного каркаса на основе морского коллагена, с последующей активизацией репаративных процессов в повреждённых тканях полых органов и серозных полостей.

Полимерную платформу экспериментальных матриц составил коллагеновый материал «AXOLAGEN marimum» (сертификат ЕАЭС № RU Д-

RU.PA03.B.36504/22), предоставленный ООО «АС РС» (г. Калининград). Исходным сырьём является лиофильно-высушенный порошок, содержащий высокомолекулярные изоляты коллагена типов I, II и III, полученные из тканей гигантского кальмара *Dosidicus gigas*. Молекулярно-массовые параметры белка достигали 300 кДа, объёмная плотность порошкообразной фракции – 0,45 г/см³.

Технологический цикл формирования матриц включал последовательную реализацию ряда операций, определённых авторской методикой [91]. Готовые изделия герметично упаковывались в блистерные контейнеры, из бумажной основы и полимерного прозрачного колпака (производитель – ООО «СЕАН», г. Москва), с термосваркой швов на автоматизированной упаковочной линии BSL-5045L (КНР).

Учитывая термолабильность коллагена и изделий из него, традиционные способы стерилизации, такие как стерилизация горячим паром, автоклавирование были исключены из протокола. Взамен применён метод ионизирующего облучения рентгеновским спектром, подтвердивший надёжность микробной деkontаминации в лабораторных условиях [163, 177, 179]. Процедура проводилась на установке с микрофокусным генератором рентгеновских лучей (ЗАО «ЭЛТЕХ-мед», г. Санкт-Петербург): упакованные образцы размещались в рабочей камере, параметры излучения фиксировались на уровне 150 Вт на аноде рентгеновской трубки, экспозиция составляла пять циклов по 60 секунд каждый [179].

Для оценки функциональных характеристик разработанных матриц проведён сравнительный анализ с коммерческими аналогами сходного химического состава и клинического назначения, применяемыми при закрытии перфоративных дефектов, шовных линий и зон анастомозирования полых органов брюшной полости (см. табл. 1). Завершающим этапом стала серия доклинических испытаний *in vivo* на лабораторных крысах линии Wistar, в ходе которых анализировались морфологические и биохимические показатели тканевых структур и биологических жидкостей подопытных

ЖИВОТНЫХ.

Таблица 1 – Характеристика исследуемых материалов

№	Название	Производитель	Состав
1	Матрикс коллагеновый 10% ГА	ЛЭХиО, ИЛМИ НИИ ЭМ КГМУ, кафедра химии КГУ	3% коллагена морского происхождения, 10% глутаровый альдегид
2	Матрикс коллагеновый 10% ГЛИО	ЛЭХиО, ИЛМИ НИИ ЭМ КГМУ, кафедра химии КГУ	3% коллагена морского происхождения, 10% глиоксаль
3	Повязка коллагеновая ранозаживляющая	ЗАО «Зеленая дубрава», Россия	Коллагена раствор (лиофилизированный) – 100%
4	Пластина кровоостанавливающая «Тахокомб»	TAKEDA, Австрия	Коллагеновая губка, с содержанием в 1 см ² активных веществ: фибриноген – 5,5 мг; тромбин – 2 МЕ; альбумин – 2,9 мг; L-аргинина гидрохлорид – 2,8 мг; коллаген – 2,1 мг; натрия хлорид – 1,5 мг; натрия цитрат – 0,4 мг; рибофлавин – 18,2 мкг
5	AKSOLAGEN MEMBRANE	ООО «АС РС», Россия	Очищенная внутренностная фасция гигантского кальмара

2.2. Дизайн исследования

План работы включал в себя ряд этапов для решения задач исследования.

Первый этап посвящен сравнительному изучению физико-механических

и структурных свойств матриксов в серии экспериментов *in vitro*. По результатам данной серии опытов будет выбран один, наиболее подходящий, вариант матрикса, который будет подвергнут заселению культурой клеток-фибробластов.

На втором этапе проводилась оценка темпов заселения культур фибробластов в толще разработанного матрикса методом электронной микроскопии.

На третьем этапе в опытах *in vivo* изучали реакцию тканей на подкожную имплантацию и темпы биodeградации объекта исследования. В данной экспериментальной серии выполнен сравнительный анализ между разработанными матриксами, один из которых не прикондиционирован культурами клеток-фибробластов. В качестве группы сравнения использован матрикс на основе коллагена КРС.

На четвертом этапе в хроническом эксперименте *in vivo* исследовали эффективность применения разработанных полимерных матриксов на моделях травмы брюшины в области правой подвздошной ямки, купола слепой кишки и узлового шва на ней. В данных сериях использовали разработанный матрикс, заполненный клеточными культурами, раневое покрытие, являющееся косвенным аналогом и многокомпонентным пористым аппликационным средством.

Заключительный этап был посвящен статистической обработке. Графический вариант плана исследования представлен на рисунке 1.

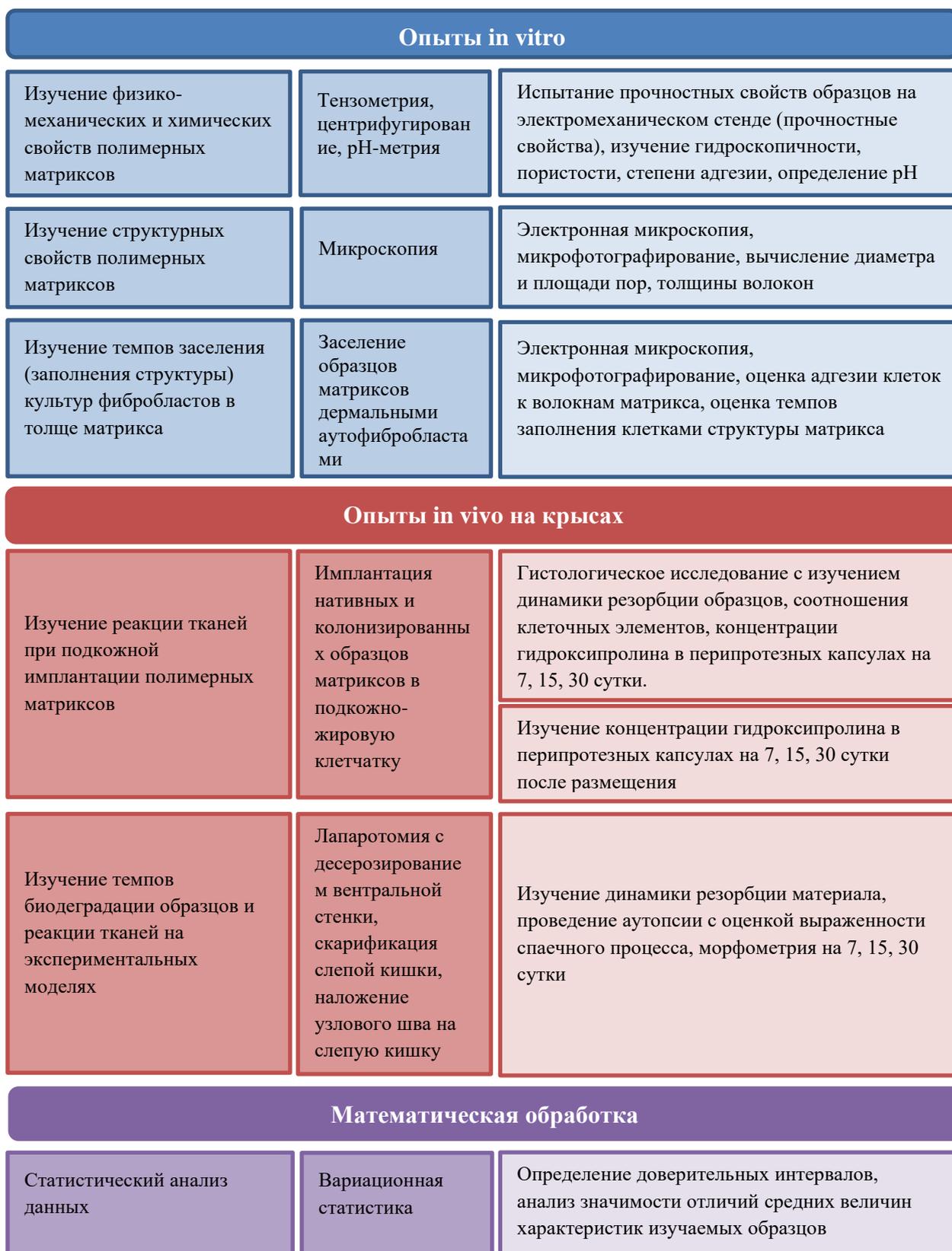


Рисунок 1 – Дизайн исследования

2.3. Распределение материала по группам исследования и последовательность выполнения экспериментов

Распределение образцов полимерных матриц и лабораторных животных по сериям и группам представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение экспериментального материала по сериям и группам

Серии эксперимента	Группы наблюдения (образцы материала)	n
Серия 1: оценка физико-механических и химических свойств и структуры образцов	Группа № 1. СКМ 10% ГА	60
	Группа № 2. СКМ 10% ГЛИО	60
	Группа № 3. СККРС	60
Серия 2: изучение функциональной и синтетической активности культур фибробластов в толще матрикса	Группа № 1. СКМ 10% ГА	20
Серия 3: изучение темпов биodeградации образцов и реакции тканей при подкожной имплантации полимерных матриц	Группа № 1. СКМ 10% ГА	20
	Группа № 2. СККРС 10%	20
	Группа № 3. СКМ 10% ГА с клетками	20
Серия 4: изучение темпов биodeградации образцов и реакции тканей на экспериментальных моделях	Группа № 1. СКМ 10% ГА	30
	Группа № 2. AKSOLAGEN MEMBRANE	30
	Группа № 3. Тахокомб	30
	Группа №4. Контроль	30

2.4. Методы исследования

2.4.1. Методы сравнительного изучения физико-механических свойств полимерных матриц

В рамках экспериментального протокола физико-механическую характеристику исследуемых коллагеновых матриц проводили в утверждённой последовательности: оценка пластических изменений под действием локального давления, количественное определение ёмкости поглощения, измерение адгезивной прочности с биологическими тканями, а также анализ кислотно-щелочной среды материала.

Для регистрации деформационных параметров при максимальном сжатии применяли универсальный электромеханический испытательный стенд РЭМ-0,2-1 (ООО «МЕТРОТЕСТ», г. Нефтекамск, республика Башкортостан, Российская Федерация). Предварительно геометрические характеристики образцов размером 30×30 мм фиксировали с помощью цифрового микрометра iGaging® 0-1/0.00005 (США) с разрешающей способностью 0,001 мм. Испытуемые фрагменты размещали на подвижной траверсе стенда, после чего индентор (сферический наконечник) позиционировали в контакт с верхней поверхностью образца. Далее осуществляли поступательное перемещение индентора со скоростью 3 мм/мин до достижения критической деформации. В ходе испытания регистрировали разрушающее усилие, приводящее к сквозному продавливанию матрицы, а также остаточную толщину материала в зоне локального повреждения.

Количественную оценку сорбционной способности матриц проводили гравиметрическим методом. В стеклянные пробирки помещали металлический наполнитель высотой 30 мм, поверх которого укладывали фильтровальную бумагу; пробирки герметизировали пробками. Образцы

матриц стандартизировали до размеров $10 \times 10 \times 1$ мм, после чего определяли их исходную массу (m_0). Далее фрагменты погружали на 5 минут в термостатированную дистиллированную воду (37°C), затем переносили в подготовленные пробирки и подвергали центрифугированию при ускорении 1500 g в течение 300 секунд для удаления избытка несвязанной влаги. После извлечения образца с фильтровальной прокладки фиксировали его конечную массу ($m_{\text{обр.цент.}}$).

Адгезивные свойства материалов оценивали методом *ex vivo* с использованием биологического субстрата – париетальной брюшины лабораторных крыс. Для приближения условий эксперимента к клинической практике применяли свежевыделенные ткани трупного материала. На подготовительном этапе формировали тестовые фрагменты полимерных матриц, которые затем фиксировали на поверхности брюшинного лоскута размером 20×20 мм. Последний получали путём выполнения П-образного разреза передней брюшной стенки у эвтаназированных животных. Далее измеряли усилие, необходимое для механического отделения матрицы от серозной оболочки, что служило количественной характеристикой адгезивной прочности материала.

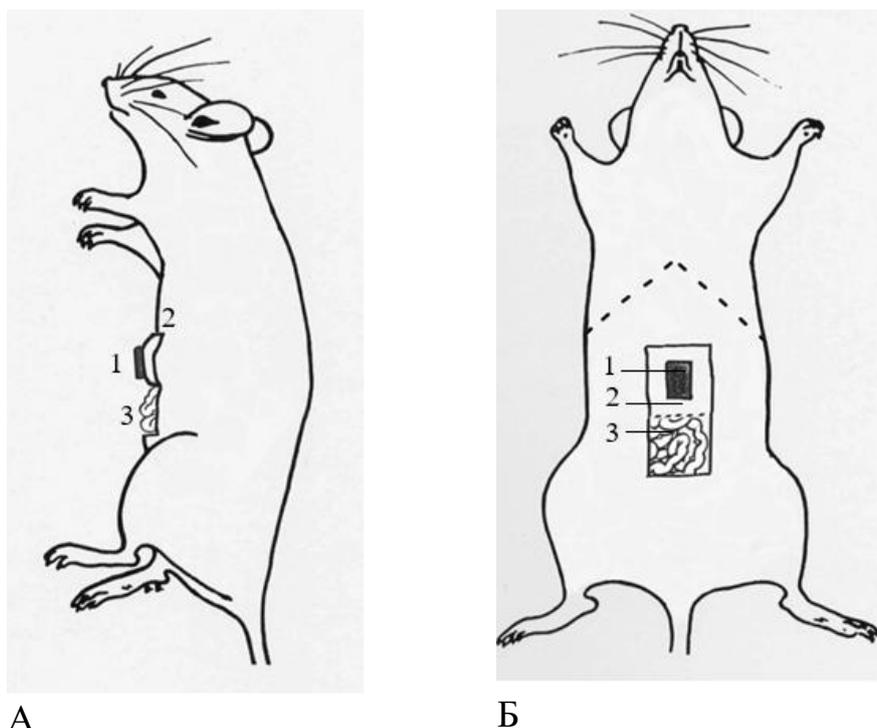


Рисунок 2 – Схема выделения лоскута на кадаверном материале крысы.

А – боковая проекция, Б – прямая проекция.

1 – Исследуемый образец, прикрепленный к лоскуту вентральной стенки;

2 – Лоскут вентральной стенки;

3 – Петли тонкого кишечника

Для проведения адгезионных испытаний кадаверный материал животных надёжно фиксировали на рабочем стенде разрывной испытательной машины после формирования брюшинного лоскута. На подвижную траверсу стенда монтировали исследуемый фрагмент, после чего осуществляли его контактное прижатие к серозной поверхности париетальной брюшины со скоростью 35 мм/мин. Указанная скорость перемещения была обоснована авторами как компромиссный режим, исключающий повреждения как структуры биоматериала, так и целостности тканей, что могло бы наблюдаться при ускоренном нагружении. Для обеспечения стабильного сцепления поверхностей матрикса и брюшины контакт в течение 30 с. По завершении выдержки траверсу с закреплённым образцом перемещали в обратном направлении с идентичной скоростью, визуально отслеживая процесс

делиминации матрицы от брюшинной поверхности. Момент полного разрыва фиксировался программным обеспечением установки; ключевым регистрируемым параметром выступало пиковое разрывное усилие, выражаемое в ньютонах на квадратный метр (Н/м²). После каждого цикла испытания брюшинный лоскут возвращали в анатомически корректное положение, что обеспечивало его естественное увлажнение за счёт контакта с влажной средой брюшной полости и прилегающими органами (рисунок 3).

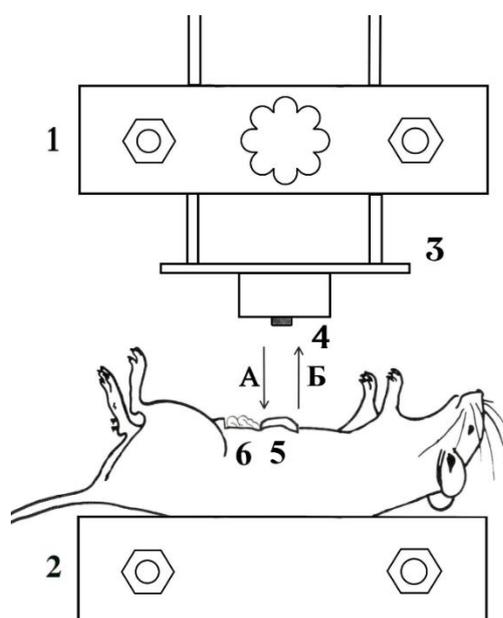


Рисунок 3 – Схема размещения тушки крысы на рабочей поверхности испытательного стенда. 1 – подвижная траверса испытательного стенда, 2 – неподвижная траверса испытательного стенда, 3 – устройство фиксации исследуемого образца к траверсе, 4 – испытываемый объект, 5 лоскут брюшной стенки, 6 – петли кишечника.

А, Б – направления движения траверсы в ходе эксперимента

Оценку кислотно-щелочной среды материала проводили потенциометрическим методом. В химический стакан объёмом 50 мл вносили 30 мл дистиллированной воды, погружали тестовый образец матрицы и в течение 5 минут при перемешивании при температуре окружающей среды и осуществляли периодическое перемешивание для равномерного

диффузионного обмена. Экспериментальный цикл повторяли десятикратно с использованием свежих порций образцов и растворителя. Измерение водородного показателя полученных экстрактов выполняли на цифровом рН-метре модели РН-2011/200 АТС (KL-911, КНР), предварительно прошедшем трехточечную калибровку стандартными буферными растворами с фиксированными значениями рН.

2.4.2. Изучение структурных свойств полимерных матриц

Микроскопию проводили на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Quanta 650 FEG на базе кафедры физики и нанотехнологий ФГБОУ ВО КГУ под консультацией заведующего кафедрой к.физ.-мат.н., доцента Вервейко Вячеслава Николаевича со следующими параметрами: ускоряющее напряжение пучка (HV) 6,0 kV, размер пучка – 3,0. СЭМ изображения всех полимерных матриц были получены в режиме вторичных электронов (SE). Суммарно было выполнено 60 измерений.

2.4.3. Изучение темпов заполнения культур фибробластов структуры матрикса

Для деконтаминации органических остатков коллагеновые матрицы стерильной модификации подвергали обработке абсолютным этанолом в соотношении 100:1 (масса растворителя к массе материала) в условиях ламинарного бокса. Инкубацию проводили в течение 180 минут на орбитальном шейкере при постоянном перемешивании. По завершении экстракции спирт удаляли, заменяя его избытком фосфатно-солевого буфера

(PBS). Контроль кислотно-щелочной среды осуществляли потенциометрическим методом до достижения физиологического диапазона pH 7,2–7,4, что подтверждало полноту удаления спиртового компонента.

Подготовку клеточного наполнителя для трёхмерных конструкций осуществляли в четыре последовательных этапа. На первом этапе проводили десорбцию монослойной культуры дермальных фибробластов с поверхности культуральных флаконов. Для этого сливали питательную среду, после чего вносили раствор «Версен» из расчёта 3,3 мл на 25 см² площади дна для хелатирования дивалентных катионов кальция и магния, обеспечивающих адгезию клеток. Инкубацию выполняли при 37 °С в течение 5 минут. Далее добавляли 0,25%-ный трипсиновый раствор в эквивалентном объёме для ферментативной дезинтеграции межклеточных контактов и белковых связей с субстратом, после чего флаконы помещали в термостат при 37 °С на 30 минут с периодическим мягким встряхиванием. Процесс десорбции контролировали визуально под инвертированным микроскопом.

На втором этапе, после полного отслоения клеток от поверхности, суспензию «Трипсин+Версен» с клеточным материалом вносили в центрифужные пробирки объёмом 15 мл и подвергали центрифугированию при относительном ускорении 300 g в течение 300 секунд (рисунки 4, 5).



Рисунок 4 – Перенос открепившихся фибробластов в центрифужные пробирки.



Рисунок 5 – После центрифугирования суспензии: на дне пробирок осадок из фибробластов.

Третий этап включал разделение надосадочной жидкости с инактивированными ферментами и ресуспендирование клеточного осадка в 1 мл полной питательной среды. Жизнеспособность популяции оценивали методом вытеснения трипанового синего (концентрация красителя 0,4%), количественный подсчёт клеток осуществляли на автоматическом анализаторе Countess 3 Automated Cell Counter. Брали аликвоту полученной суспензии и доводили до рабочей концентрации 5×10^6 клеток/мл (рисунок 6).

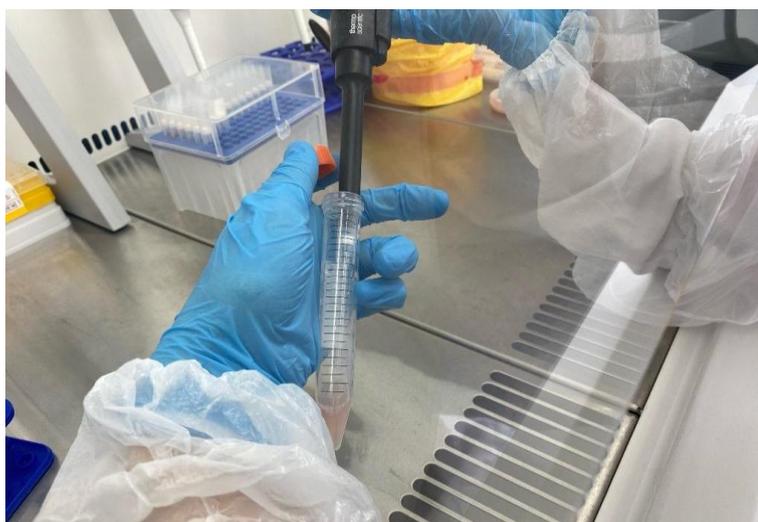


Рисунок 6 – Ресуспендирование осадка с клетками после центрифугирования.

Четвёртый этап предусматривал заселение матриц: промытые коллагеновые губки размещали в стерильных чашках Петри, полностью покрывали питательной средой и равномерно наносили 5 мл клеточной суспензии на поверхность трёхмерного каркаса (рисунок 7).

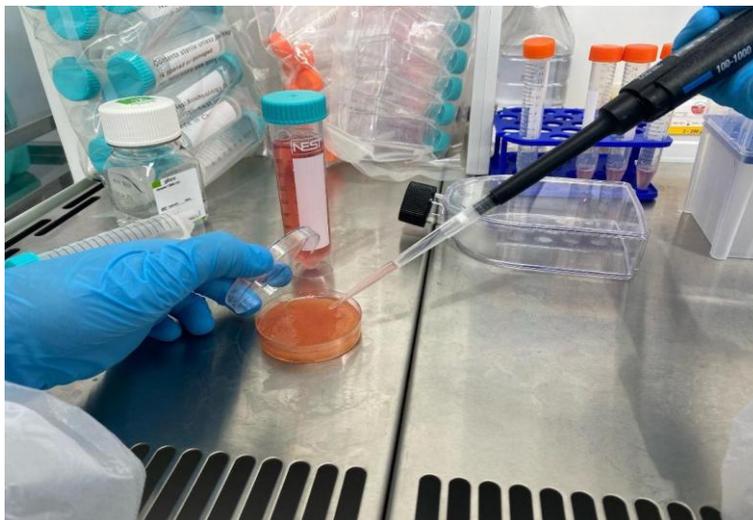


Рисунок 7 – Внесение культуры клеток в 3D – матрицу.

Культуры инкубировали в течение 24 часов для обеспечения адгезии, спрединга и начальной миграции фибробластов вглубь пористой структуры. По истечении указанного периода визуально оценивали степень колонизации матрицы. Отмечено, что применённая методика описывается в литературных источниках, где для заселения используют микродозы клеточной суспензии (20–40 мкл), с последующей шестичасовой адгезией и дополнительным заполнением средой.

Верификацию клеточной колонизации проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на базе научно-исследовательского центра «БиоХимТех» ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (директор – к. х. н, доцент В.А. Арляпов). Пробоподготовку выполняли по протоколу: фиксировали матрицы с клеточными культурами в 10%-ном нейтральном формалине, высушивали под вакуумом с последующим напылением хромированного проводящего

покрытия с помощью установки распыления металлов C156RS (ООО «Научные технологии и сервис», Россия)

Микроскопирование осуществляли на сканирующем электронном микроскопе HITACHI TM4000 Plus (Hitachi High-Technologies Corporation, Япония) с программным обеспечением «3D-View» (Великобритания) при увеличении 80×. Дополнительно проводили спектральный анализ для подтверждения химического состава композита и верификации присутствия фибробластов, интегрированных в волокнистую структуру полимерного носителя.

2.4.4. Изучение реакции тканей при подкожной имплантации полимерных матриксов

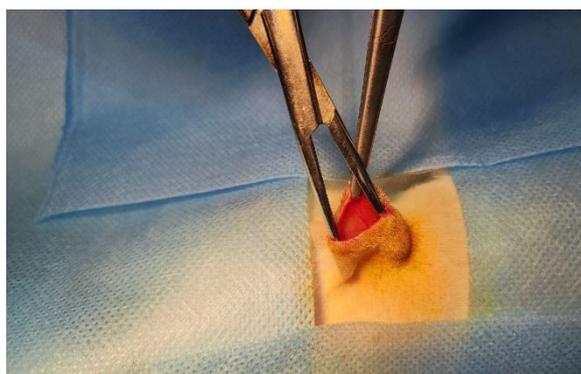
В рамках экспериментального протокола все лабораторные животные подвергались идентичным хирургическим операциям. Предоперационную подготовку осуществляли под ингаляционной анестезией изофлураном: грызунов фиксировали в дорсальном положении, операционное поле обрабатывали антисептическими растворами. Все манипуляции выполнялись с соблюдением принципов асептики и антисептики.

Доступ формировали разрезом кожи и подкожно-жировой клетчатки по позвоночной линии протяжённостью 20 мм. Далее диссектором создавали карман между подкожно-жировой клетчаткой и поверхностной фасцией глубиной 20 мм, проксимально и дистально распространяющийся на всю длину кожного разреза. В подготовленное пространство имплантировали тестовые образцы коллагеновых скаффолдов прямоугольной формы (10×10 мм). Рану ушивали многослойно с обязательным захватом мышечного слоя для предотвращения контакта между соседними имплантатами и обеспечения их пространственной изоляции. Выведение животных из эксперимента

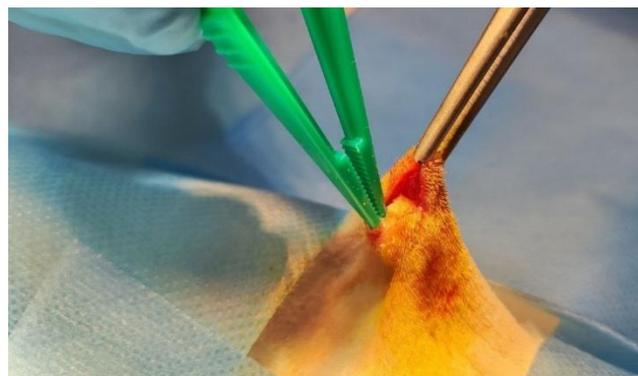
проводили на 7-, 15- и 30-е сутки после операции с последующим гистологическим анализом (рисунок 8).

После эвтаназии осуществляли забор биоптатов, включающих зону имплантации с прилежащими интактными тканями (кожа, подкожно-жировая клетчатка) размером 10×10 мм. Полученный материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, после чего проводили по стандартному гистологическому протоколу. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике.

Для цифровой архивации гистологических препаратов использовали сканер слайдов Hamamatsu NanoZoomer-SQ (Япония) с программным обеспечением Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology. Микроскопический анализ и количественную морфометрию проводили на световом микроскопе Nikon Eclipse Ni-U с применением лицензионного программного пакета NIS-Elements Basic Research версии 4.0, что позволяло осуществлять детальную оценку тканевой реакции, васкуляризации и степени интеграции имплантатов с окружающими структурами.

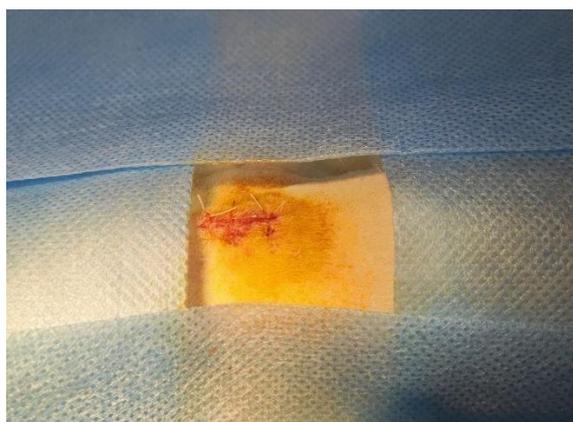


А

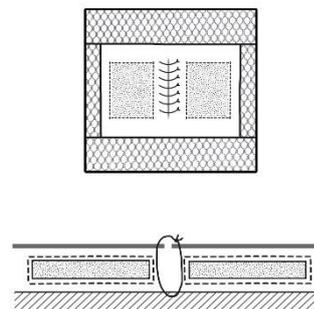


Б

Продолжение рисунка 8.



В



Г

Рисунок 8 – Этапы подкожной имплантации исследуемых образцов.

А – формирование кармана, Б – имплантация образца в кармане, В – ушивание раны, Г – схема размещения образцов в сформированном кармане.

2.4.5. Изучение уровня гидроксипролина перипротезных капсул

В данной серии изучали выраженность коллагеногенеза при помощи определения уровня гидроксипролина в перипротезных капсулах после имплантации образцов по методике, описанной в предыдущем разделе.

Количественное определение гидрокси-L-пролина проводилось колориметрическим методом («Методика определения содержания гидроксипролина в различных тканях», заявка на патент РФ № 2024103617 от 13.02.2024 г.).

Методика включает в себя следующие этапы: подготовку материала к гидролизу, гидролиз, очистку, дериватизацию и колориметрический анализ.

Подготовка к анализу заключается в последовательном измельчении, обезжиривании и высушивании образцов.

Возможно проведение обезжиривания и удаления воды как в одну стадию, с использованием смеси органических растворителей, так и в два этапа, внося различные растворители по отдельности. Для обезжиривания и удаления воды можно использовать большой спектр доступных реагентов. Так, для удаления жира применяются следующие соединения: предельные углеводороды, например, алкановый ряд, такие как гексан (C_6H_{14}), гептан (C_7H_{16}), декан ($C_{10}H_{22}$) и другие, хлорпроизводные алканов, к которым относятся хлористый метилен (CH_2Cl_2), хлороформ ($CHCl_3$) и так далее. Также для удаления воды и дополнительного обезжиривания можно использовать спирты и кетоны: этанол (C_2H_5OH), пропанол (C_3H_7OH), ацетон (C_3H_6O), изопропанол ($CH_3CH(OH)CH_3$) и другие.

Для гидролиза белков до аминокислот из перипротезных капсул образцы обрабатывают растворами щелочей при высокой температуре от 12 до 20 часов. В качестве гидролизующих агентов используются доступные гидроксиды натрия ($NaOH$) и калия (KOH). В ходе данной операции пептидные белки (I) разрушаются с образованием свободных аминокислот, в том числе – гидроксипролина (II).

Далее аналитические образцы очищают методом экстракции. В качестве экстрагентов предпочтительны спирты, такие как безводные пропанол и изопропанол.

После очистки аналитические образцы вносят в ячейки 96-луночного планшета для ИФА. Для дальнейшей дериватизации проводят реакцию с Хлорамином Т, в ходе которой гидроксипролин (II) окисляется до пиррол-2-карбоксилата (III). После экспозиции в ячейки планшета с веществом (III) добавляют раствор диметиламинобензальдегида-пара (DMAВ, реагент Эрлиха) в смеси изопропанола и соляной кислоты. В ходе реакции образуется хромофор (VI). Показания снимают колориметром при длине волны 540 нм.

Нами были использованы следующие реактивы и материалы: ацетон и хлороформ марки ЧДА, производство «Компонент-Реактив» (Россия), гидроксид натрия производства «Thermo Fisher scientific» (США), чистота for

analysis, моногидрат лимонной кислоты, а также ацетат натрия производства компании «Merck» (Австрия), чистой for analysis, хлорамин Т производства «Neofox» (Германия), реагент Эрлиха, чистотой 99,2%, предоставленный компанией Dia-m. Также в ходе работ были применены мерные колбы производства компании «Simax» (Чехия) класс точности А.

На первом этапе определения гидрокси-L-пролина осуществляли пробоподготовку образцов. Перипротезные капсулы замораживали в жидком азоте повышенной чистоты (ГОСТ 9293–74, 1-й сорт), после чего измельчали в аналитической мельнице до получения однородной порошкообразной массы.

Далее проводили обезжиривание и удаление влаги. Для этого измельчённые пробы помещали в химические стаканы, заливали смесью ацетон:хлороформ (1:1, V/V) и выдерживали при перемешивании на магнитной мешалке Primelab в течение 15 минут. Затем порошок фильтровали на установке для вакуумной фильтрации, состоящей из колбы Бунзена и воронки Бюхнера. Вакуум в системе создавали с помощью мембранного насоса Primelab PL.NM03.01.45 (Россия).

Для удаления остаточной влаги порошки лиофилизировались с помощью сушилки SCIENTZ 30-F FREEZE DRYER (КНР) в течение 64 часов. Процесс лиофильной сушки проводился в течение одиннадцати последовательных рабочих циклов. При этом первые девять циклов длились по 5 часов, а десятый цикл был удлинён до 9 часов, так как предназначался для полной досушки материала.

Лиофилизацию инициировали при температуре $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и остаточном давлении 5 Па. В ходе каждого последующего из первых девяти циклов температуру постепенно повышали на $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ при сохранении постоянного давления (5 Па).

Для проведения гидролиза на аналитических весах AND (Япония) брали точную навеску порошкообразных образцов, полученных на предыдущей стадии, в пробирки типа Eppendorf и приливали 10М раствор гидроксида

натрия. Образцы помещали в твердотельный термостат при температуре 90-95°C на 14 часов. После проведения гидролиза образцы охлаждали в морозильной камере, не допуская замерзания образцов. Далее растворы нейтрализовали 37% соляной кислотой до pH=6,5-7,0. Затем образцы снова помещали в твердотельный термостат «Biosan» и насухо упаривали до достижения постоянной массы. Образцы охлаждали до комнатной температуры, добавляли мерной пипеткой 1 мл изопропанола и центрифугировали на микроцентрифуге «Eppendorf 5452 Minispin» (Германия) в течении 30 минут при 13400 g, после чего жидкую фазу отделяли в пробирки типа Eppendorf, не допуская попадания твердой фазы. Образцы упаривали до постоянной массы, остужали до комнатной температуры и приливали 0,6 мл изопропанола.

Далее для дериватизации образцов готовили буферный раствор, раствор Хлорамина Т и раствор реагента Эрлиха.

В мерную колбу приливали раствор изопропанола и 37% соляной кислоты, далее вносили точную навеску диметиламинобензальдегида-пара, после чего растворяли при перемешивании на магнитной мешалке, с последующем доведением объема до метки с применением того же растворителя.

Для приготовления буферного раствора точные навески ацетата натрия, гидроксида натрия, лимонной кислоты моногидрата растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе, приливали уксусную кислоту и доводили тем же растворителем до метки.

В аналогичной колбе точную навеску Хлорамина Т растворяли при перемешивании на магнитной мешалке ранее приготовленным буферным раствором, доводили объем тем же растворителем до метки.

Для построения калибровочного графика гидроксипролина был приготовлен раствор стандартного образца в концентрации 0,1 мг / 1 мл. Для этого в мерной колбе Simax А класса точности объемом 10 мл растворяли в дистиллированной воде точную навеску стандартного образца транс-4-

гидроксиг-Л-пролина количеством 10,0 мг. Далее доводили объем тем же растворителем до метки. Затем в аналогичную колбу вносили аликвоту приготовленного раствора в количестве 1 мл, доводили дистиллированной водой до метки и таким образом получали раствор стандартного образца (PCO) концентрацией 0,1 мг / 1 мл.

Далее приступали к проведению анализа.

Автоматической пипеткой отбирали аминокислотный раствор аналитических образцов объемом 4, 6 и 8 мкл соответственно и раскапывали в ячейки планшета для ИФА. В отдельные ячейки планшета вносили PCO в объеме 0, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл с целью дальнейшего построения калибровочного графика, необходимого для расчетов. Далее образцы вышеуказанного объема упаривали досуха в термостате.

Затем автоматическим дозатором в ячейки добавляли по 0,1 мл ранее приготовленного раствора Хлорамина Т и выдерживали при комнатной температуре в течение 20 минут.

Для образования хромофора в ячейки с аналитическими образцами вносили по 0,1 мл ранее приготовленного раствора DMAВ, планшеты накрывали крышкой для предупреждения упаривания растворов, помещали на орбитальный шейкер в термостат на 45 минут при температуре 65 °С. После истечения времени выдержки реакцию останавливали резким охлаждением на морозильной полке. В результате проведенных реакций проявленные аналиты представляли собой растворы в цветовой гамме от желтого до насыщенно-фиолетового цвета. PCO был добавлен в ряд Н1-Н6 в объеме 0, 2, 4, 6, 8 и 10 мкл, где Н1 – 0 мкл.

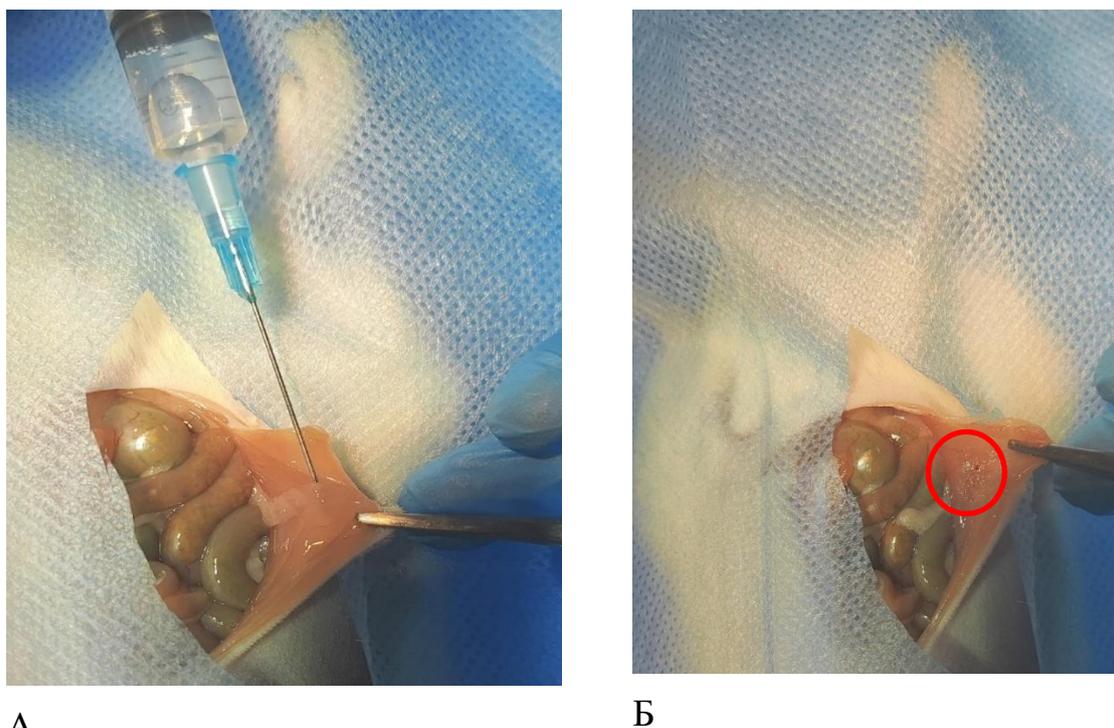
2.4.6. Изучение реакции тканей на экспериментальных моделях

Для решения поставленных задач было выполнено несколько вариантов оперативных вмешательств. Все манипуляции осуществляли на крысах самцах породы Wistar под ингаляционным наркозом раствором изофлурана. Исследование проводили под контролем Регионального этического комитета при ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России (протокол №4 от 15.12.2022 г.).

Во всех случаях формировали группу контроля, в которой введенным в эксперимент животных на область моделирования воздействие не проводили. Рану послойно ушивали. Выводили животных из эксперимента на 7-е, 15-е, 30-е сутки методом CO₂-индуцированной эвтаназии.

2.4.6.1. Изучение реакции тканей на модели десерозированной брюшины

Первая экспериментальная модель заключалась в повреждении брюшины. Для этого выполняли срединную лапаротомию, после чего десерозировали брюшину методом гидропрепаровки. После этого на поврежденный участок наносили исследуемый образец в зависимости от группы исследования (рисунок 9).



А

Б

Рисунок 9 – Моделирование дефекта брюшины.

А – введение изотонического 0,9% раствора NaCl;

Б – десерозированный участок брюшины

2.4.6.2. Изучение реакции тканей на модели повреждение слепой кишки.

Вторая модель заключалась в повреждении купола слепой кишки. После вскрытия брюшной полости в рану выводили слепую кишку, скарификатором наносили повреждение поверхности органа до характерного признака «кровоавой росы». После этого на поврежденный участок наносили исследуемый образец в зависимости от группы исследования (рисунок 10).

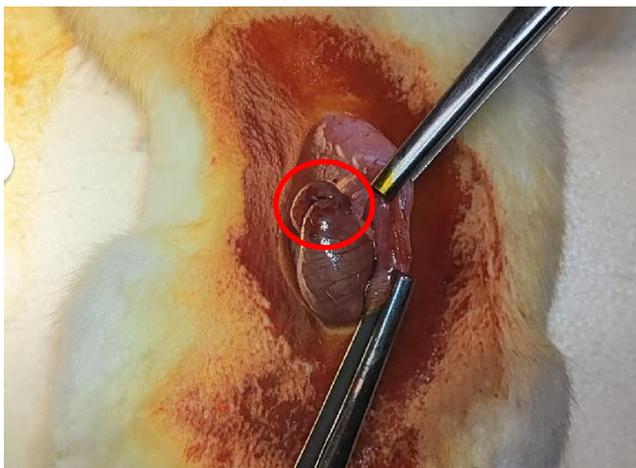


Рисунок 10 – Моделирование повреждения слепой кишки.

2.4.6.3. Изучение реакции тканей на модели ушивания стенки слепой кишки

Третья модель отличалась тем, что вместо нанесения раны слепой кишки выполняли прошивание его стенки однорядным узловым швом (шовный материал – викрил 4/0 по USP). После прошивания наносили исследуемый образец в зависимости от группы исследования (рисунок 11).



Рисунок 11 – Наложенный шов на стенке слепой кишки

Гистологическое изучение аутопсийного материала с имплантируемыми образцами проводили после выведения подопытного животного из эксперимента. Забор материала осуществляли путем иссечения участка органа, включающий место имплантации и прилежащие интактные ткани, общим размером 1x1 см. Взятый материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина с последующей проводкой и заливкой в парафин по стандартной методике. Из парафиновых блоков изготавливали срезы, окрашивали с последующей окраской гематоксилином и эозином (по стандартным гистологическим прописям). Оцифровка предметных стекол выполнялась с помощью цифрового преобразователя предметных стекол для микроскопа NanoZoomer-SQ Hamamatsu (Япония) с программным обеспечением Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology (Япония). Микроскопирование и морфометрию проводили на микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (лицензионное программное обеспечение (NIS-Elements Basic Research (BR), 4.0).

На микрофотографиях оценивали состояние места имплантации, окружающих тканей, степень резорбции образцов и формирование на их месте фиброзной капсулы. Для объективной оценки регенераторных процессов определяли количество фибробластов, фиброцитов, макрофагов, лимфоцитов и гранулоцитов в 10-ти неперекрывающихся полях зрения при большом увеличении (x40) по кариоцитологическим признакам.

2.4.7. Методы статистической обработки полученных данных

Объём выборки, составивший десять наблюдений ($n = 10$) в каждой группе, был обоснован предварительным пилотным исследованием и признан минимально достаточным для обеспечения статистической мощности анализа. Перед применением параметрических методов проверяли соответствие

распределения количественных переменных нормальному закону с использованием критерия Шапиро-Уилка.

Для переменных, распределение которых не противоречило нормальному закону, в качестве мер центральной тенденции рассчитывали выборочное среднее арифметическое (M), а в качестве меры вариабельности – стандартную ошибку среднего (m), представляя результаты в виде $M \pm m$. В случаях отклонения от нормальности распределения применяли непараметрические описательные статистики: медиану (Me) в сочетании с интерквартильным диапазоном, ограниченным 25-м и 75-м перцентилями, $Me [Q25; Q75]$.

Для определения значимости влияния характеристик образцов на результаты их применения использовали факторный анализ. Считали допустимой для экспериментальных медико-биологических исследований величину ошибки (вероятность ошибочно отклонить нулевую гипотезу) 5% (уровень $p \leq 0,05$). В качестве программного обеспечения использовали лицензионную версию программы Statistica 13.0 (производитель Dell Software Company, Round Rock, Texas, USA) (лицензия ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России); GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) (триал версия).

Глава 3. Результаты исследования

3.1. Результаты сравнительного изучения физико-механических свойств полимерных матриксов

В результате внутригруппового анализа степени деформации при продавливании шариком наименьший результат продемонстрировали образцы группы №3, деформация образцов составила 30,13%. Данный результат на 8,61% ниже, чем в группе №1 ($p = 0,99$) и на 31,88% ниже, чем в группе №2 ($p = 0,0053$). При сравнительном анализе степени деформации между группами №1 и №2 обнаружены статистически значимые отличия ($p = 0,0144$) (таблица 3).

При изучении сорбционной способности единицы массы наиболее высокий результат зафиксирован в группе №3 (0,3713), наиболее низкий в группе №2 (0,02037). Статистическая значимость отличий выявлена между группами №1 и №3 ($p = 0,0018$), а также между группами №2 и №3 ($p = 0,0001$). Рассматривая данный показатель по единице объема наибольшие результаты также продемонстрировали образцы группы №3 (0,4335), наиболее низкие значения выявлены в группе №2 (0,055). Статистически значимые отличия определяются между группами №1 и №3 ($p = 0,0102$), а также между группами №2 и №3 ($p = 0,0001$) (таблица 3).

При исследовании усилия, необходимого для отрыва объекта исследования от брюшины *ex vivo* выраженной адгезией обладали образцы группы №1 (0,61 Н), самый низкий показатель демонстрировали образцы группы №2 (0,46 Н). При этом статистически значимые отличия между группами не выявлены ($p \geq 0,05$) (таблица 3).

Более высокий уровень рН зафиксирован в группе №3 (5,18), самый низкий уровень отмечен у образцов группы №2 (4,43). Статистически

значимые отличия выявлены между группами №2 и №3 ($p = 0,0383$) (таблица 3).

Таблица 2 – Результаты исследования эксплуатационных свойств полимерных матриц в серии экспериментов *in vitro*, Me [25; 75]

№	Наименование образца	Характеристика				
		Степень деформации при продавливании шариком, %	Сорбционная способность		Степень адгезии, Н/м ²	рН
			Единицы массы, моль/г	Единицы объема, мл/см ³		
1.	СКМ 10% ГА	38,74 [15,16; 48,56]	0,052 [0,035; 0,065]	0,1065 [0,087; 0,14]	0,61 [0,45; 0,89]	4,62 [4,54; 4,83]
2.	СКМ 10% ГЛИО	62,01 [49,68; 69,13] *	0,02 [0,015; 0,031]	0,055 [0,04; 0,092]	0,46 [0,355; 0,585]	4,43 [4,32; 4,72]
3.	СККРС	30,13 [14,07; 46,37]	0,371 [0,256; 0,45] *	0,4335 [0,394; 0,516] *	0,56 [0,45; 0,85]	5,18 [4,62; 5,3]

Примечание: * – уровень статистической значимости $p \leq 0,05$ между группами №1 и №№ 2, 3

При оценке степени деформации изучаемые образцы распределены в порядке возрастания следующим образом: №3, №1, №2. Это говорит о возможной большей стабильности коллагена, выделенного из тканей крупного рогатого скота, или же более активном действии «сшивающего» агента в составе данных образцов. Однако производитель матриц из группы № 3 не

раскрывает в составе их наименование и концентрацию модифицирующих изделие агентов. Среди экспериментальных образцов наименьшей степенью деформации обладает скаффолд на основе «морского» коллагена с добавлением 10% глутарового альдегида. Данный кросс-линкер обеспечил более устойчивую к нагрузке структуру изделия, что подтверждают статистически значимые отличия физико-механических показателей.

При изучении сорбционной способности единицы массы и единицы объема образцы расположились одинаково по возрастанию в последовательности №2, №1, №3. Вероятно, это может быть связано с большим количеством пор в структуре СККРС, что подтверждают статистически значимые отличия полученных данных.

В результате исследования степени адгезии образцы расположились по возрастанию в последовательности №2, №3, №1. Все образцы продемонстрировали приблизительно равные результаты, которые обладают недостаточным уровнем статистической значимости, что говорит об одинаковых адгезивных свойствах коллагена крупного рогатого скота и коллагена морского происхождения.

При оценке уровня pH результаты распределены по возрастанию в следующей последовательности: №2, №1, №3. Статистически значимые отличия выявлены лишь между группами №2 и №3. В целом, данные показатели позволяют применять данные образцы на живых объектах, согласно требованиям Государственной фармакопеи 15 издания от 20 июля 2023 года. Помимо прочего, данные значения формируют благоприятные условия для заселения матриц клетками и их функционирования.

Таким образом, в ходе сравнительного анализа, получены результаты, которые позволяют исключить из дальнейших серий опытов, в том числе на живых объектах образцы на основе коллагена морского происхождения с добавлением 10% глиоксаля в качестве кросс-линкера. Аналогичный образец, но с добавлением 10% глутарового альдегида, наоборот, по многим

параметрам не уступает, а по некоторым превосходит характеристики изделий на основе коллагена крупного рогатого скота группы контроля.

3.2. Результаты изучения структурных свойств полимерных матриц

В результате изучения диаметров пор образцов наибольшее значение зафиксировано в группе МК КРС 555,2 [508,7; 602,3] мкм в группе МК ГЛИО диаметр пор составил 376,1 [204,7; 676,6] мкм и в группе МК ГА он составил 102,2 мкм [90; 115,4] мкм, что является наименьшим значением (рис. 14). Выявлены статистически значимые отличия между группами МК ГА и МК ГЛИО ($p=0,0032$) и между группами МК ГА и МК КРС ($p < 0,0001$).

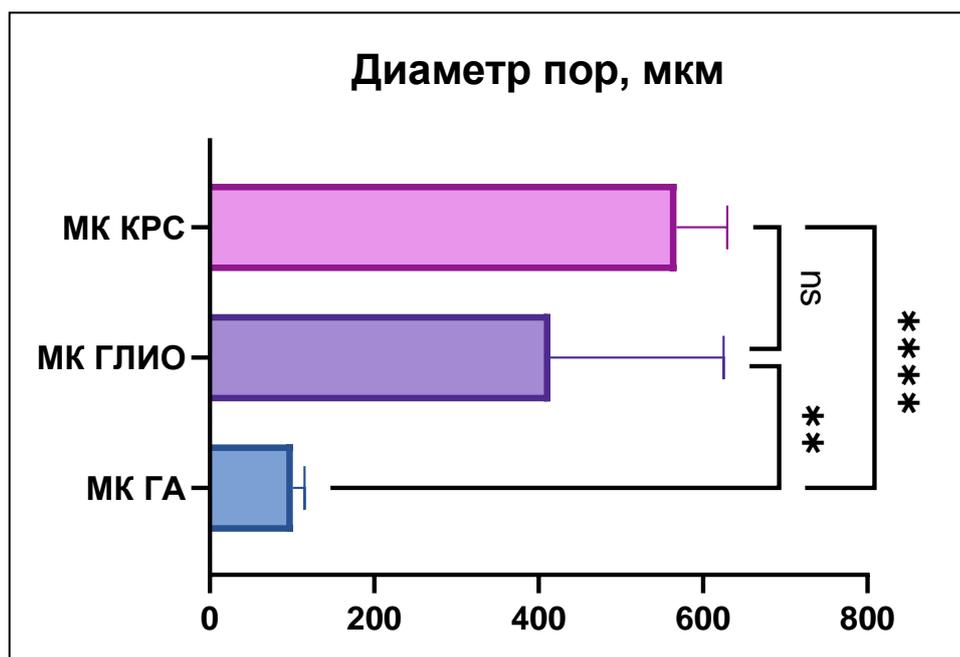


Рисунок 12 – Результаты измерения диаметра пор исследуемых образцов

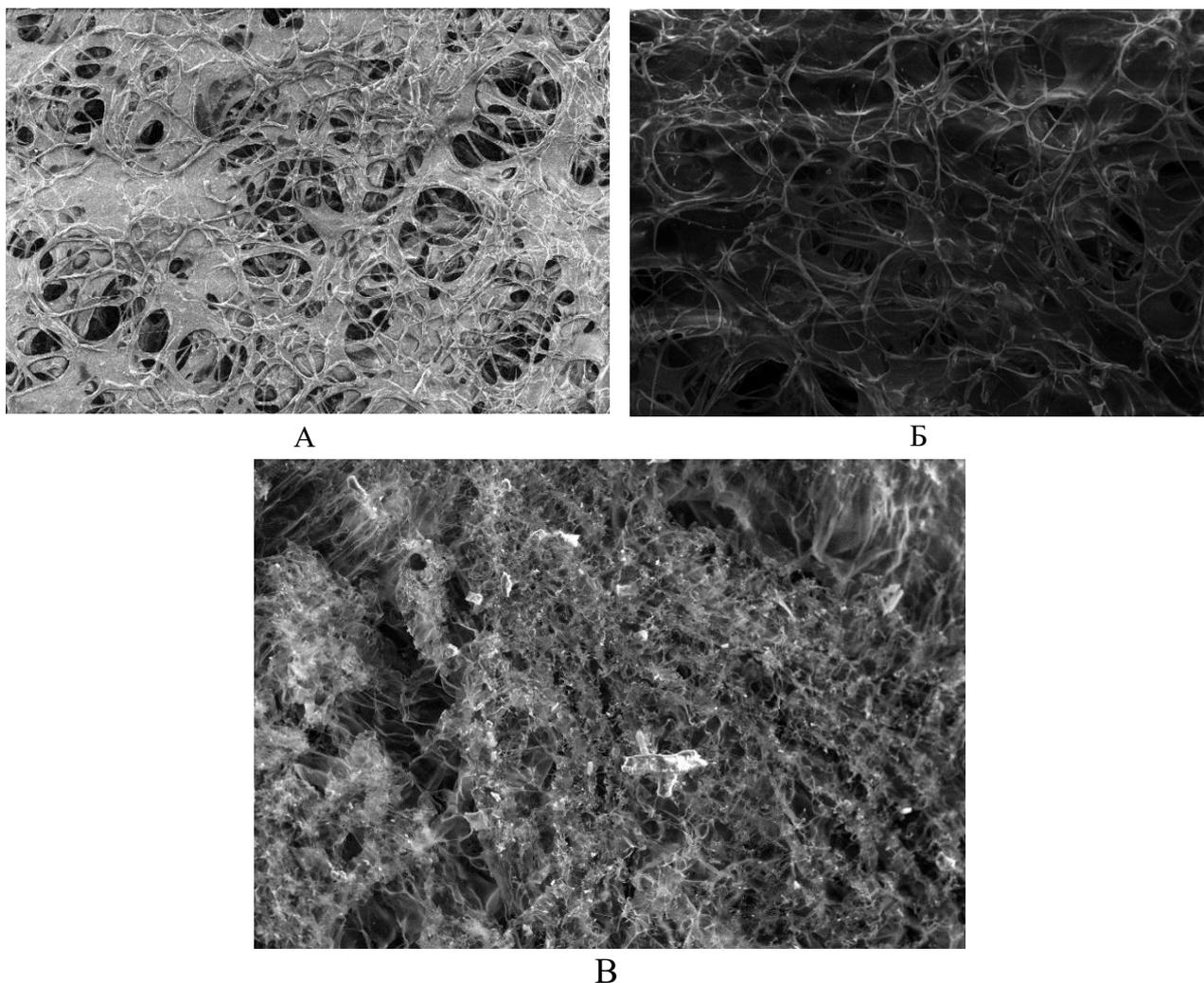


Рисунок 13 – Микрофотография образцов исследуемых матриц:

А – МК ГА, Б – МК ГЛИО, В – МК КРС. Ув. x120

При изучении толщины волокон наибольшая толщина волокон зафиксирована у образцов МК ГА 42,25 мкм [35,65; 48,93]. Наименьшее значение отмечено в группе МК КРС 21,2 мкм [17,88; 25,08]. В группе МК ГЛИО толщина волокна составила 22,1 [17,38; 27,08] мкм. Статистически значимые отличия выявлены между МК ГА и МК ГЛИО ($p=0,0008$) и между МК ГА и МК КРС ($p=0,0002$) (рис. 14).

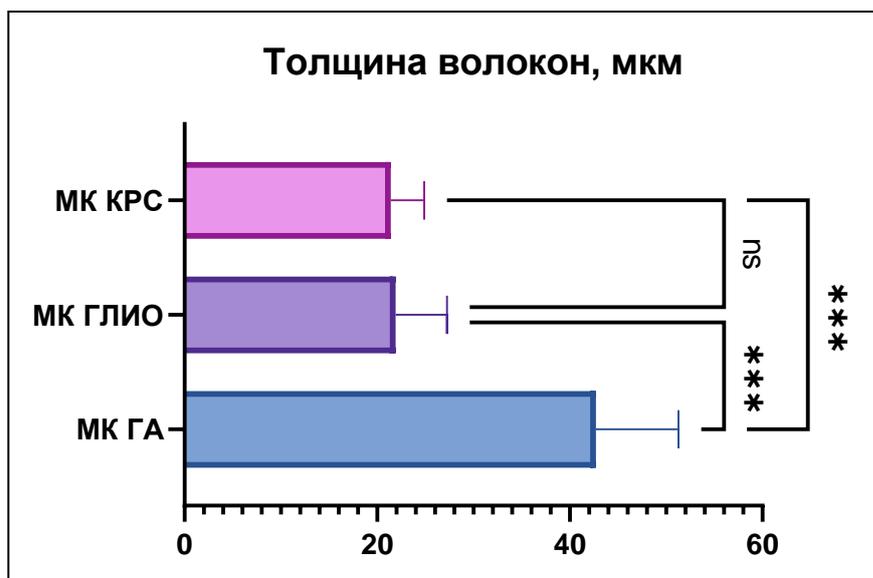


Рисунок 14 – Результаты измерения толщины волокон исследуемых образцов

В результате изучения диаметра пор данные распределились в порядке возрастания МК ГА → МК ГЛИО → МК КРС, все образцы соответствуют необходимым размером для культивирования клеток фибробластов, поскольку средний диаметр последнего составляет 25 мкм. Что касается толщины волокон, то результаты распределены следующим образом по мере ее увеличения: МК КРС → МК ГЛИО → МК ГА. Исходя из этого, наиболее рациональным для колонизации культурами фибробластов является МК ГА. Данный вывод объясняется большей толщиной волокна в сравнении со средними размерами фибробласта. Данный факт повышает вероятность успешной адгезии клеток к матриксу.

3.3. Результаты изучения функциональной и синтетической активности культур фибробластов в толще матрикса.

При помощи метода электронной микроскопии высокого разрешения было выявлено наличие фибробластов, имеющих ошаренный вид вследствие специфики подготовки образцов. Данные клетки были зафиксированы на

коллагеновых волокнах морского происхождения, обработанных глутаровым альдегидом в роли химического сшивающего вещества. (рисунки 15, 16).



Рисунок 15 – Микрофотография. Фибробласты, адгезированные к поверхности волокон матрикса, ув. 600 х.

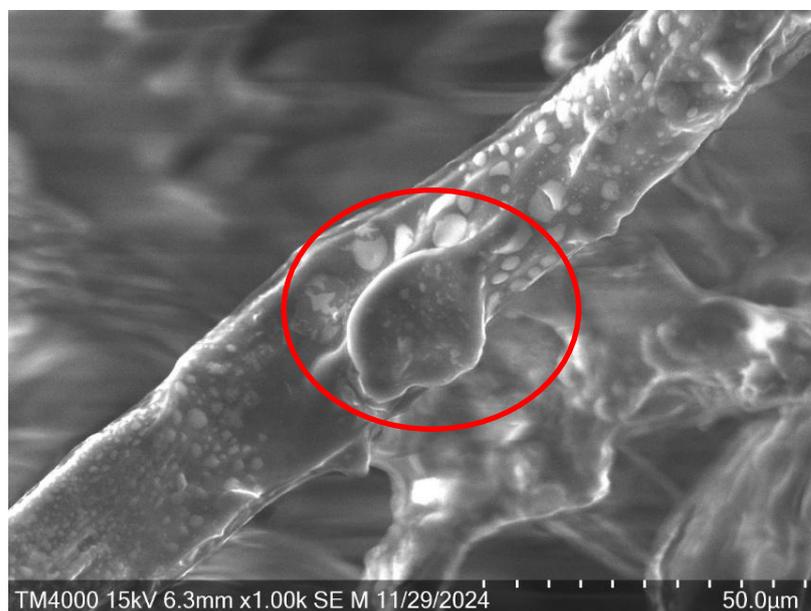
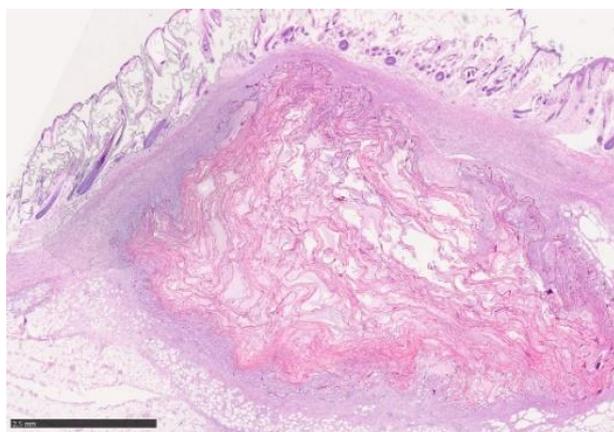


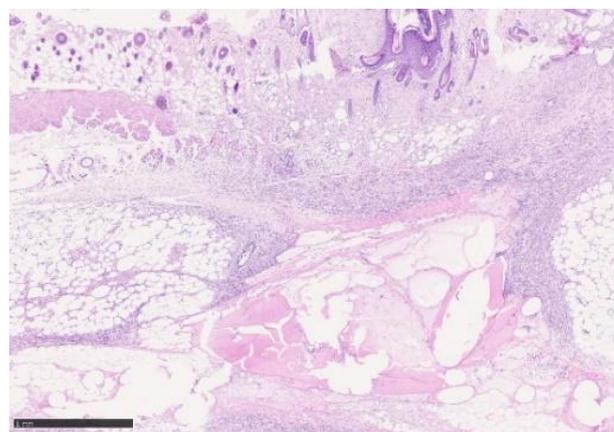
Рисунок 16 – Микрофотография. Фибробласты, адгезированные к поверхности волокон матрикса, ув. 1000 х.

3.4. Изучение реакции тканей при подкожной имплантации полимерных матриксов

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного при подкожной имплантации изучаемых образцов на 7-е сутки эксперимента вокруг пористого полотна определяются остаточные фрагменты материала. Причем наименьшая резорбция отмечается при имплантации СККРС. При имплантации материала СКМ определяется незначительная резорбция материала с образованием вокруг имплантата воспалительно-клеточного вала. При имплантации СКМ с клетками определяется значительная резорбция материала с врастанием внутрь тонких коллагеновых волокон. При этом отмечается незначительная воспалительная инфильтрация. Среди клеточного компонента преобладают фибробласты и фиброциты (рисунок 17).

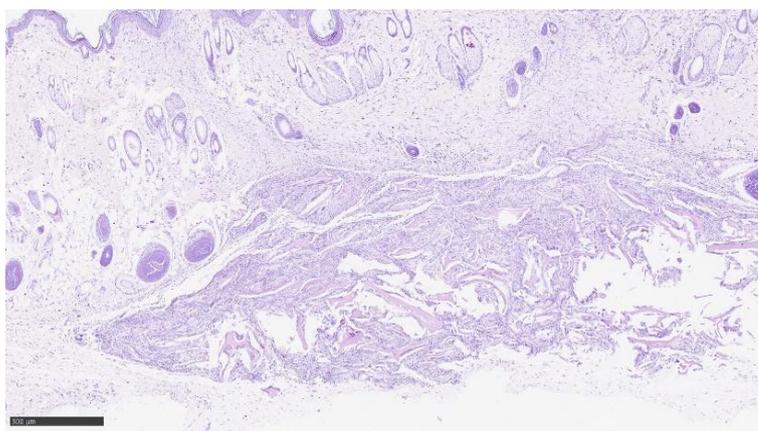


А



Б

Продолжение рисунка 17.



В

Рисунок 17 – Микрофотография морфологических изменений тканей при подкожной имплантации изучаемых образцов на 7 сутки эксперимента вокруг материала: А – СККРС. Б – СКМ. В – СКМ с клетками.

Окр. Г-Э, ув. х 40.

На данном сроке эксперимента в группах определен клеточный состав, представленный в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнительный анализ клеточного состава соединительнотканной капсулы на 7-е сутки, Ме [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	МФ	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	33 [28,75; 30,5]	13 [9,75; 19,25]	17,5 [20,75; 23,25]	17 [13,75; 18]	19,5 [23,5; 34]
СКМ, не колонизированный культурами фибробластов	24 [22,75; 26]	16 [9; 21,25]	27 [23; 28]	18 [13; 23,25]	15 [13; 19]
СККРС	15 [13; 16]	20 [14,5; 27,25]	20,5 [11; 24]	16,5 [11; 16]	28 [16,75; 21,25]

Наибольшее количество фибробластов выявлено в группе СКМ, который колонизировали клеточными культурами, наименьшее – в группе СККРС. Были выявлены статистически значимые отличия между всеми группами исследования. Между группами №1 и №2 $p=0,0006$, №1 и №3, а также №2 и №3 $p<0,0001$ (рисунок 18).

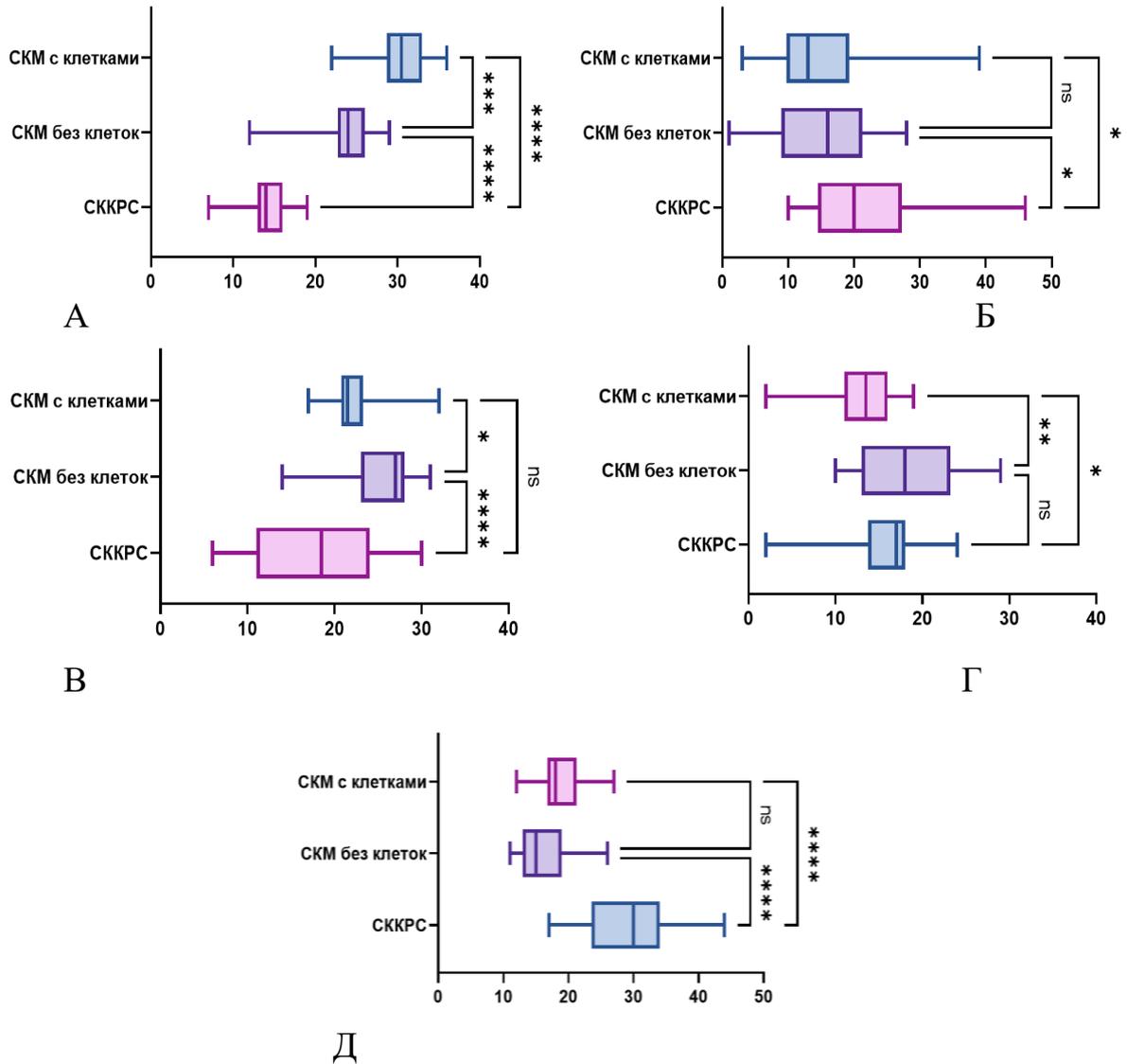


Рисунок 18 – Степень статистической значимости отличий количества клеток в соединительнотканной капсуле на 7-е сутки
 А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;
 Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного при подкожной имплантации изучаемых образцов на 15-е сутки эксперимента вокруг материала СККРС отмечается полиморфноклеточная инфильтрация с многочисленными макрофагами. При имплантации СКМ определяется тонкая фиброзная капсула с прорастанием тонких коллагеновых структур внутрь материала и его фрагментацией. При имплантации СКМ с клетками вокруг импланта воспалительных изменений не определяется. Внутри импланта визуализируются единичные фрагменты материала с преобладанием новообразованных коллагеновых структур (рисунок 19).

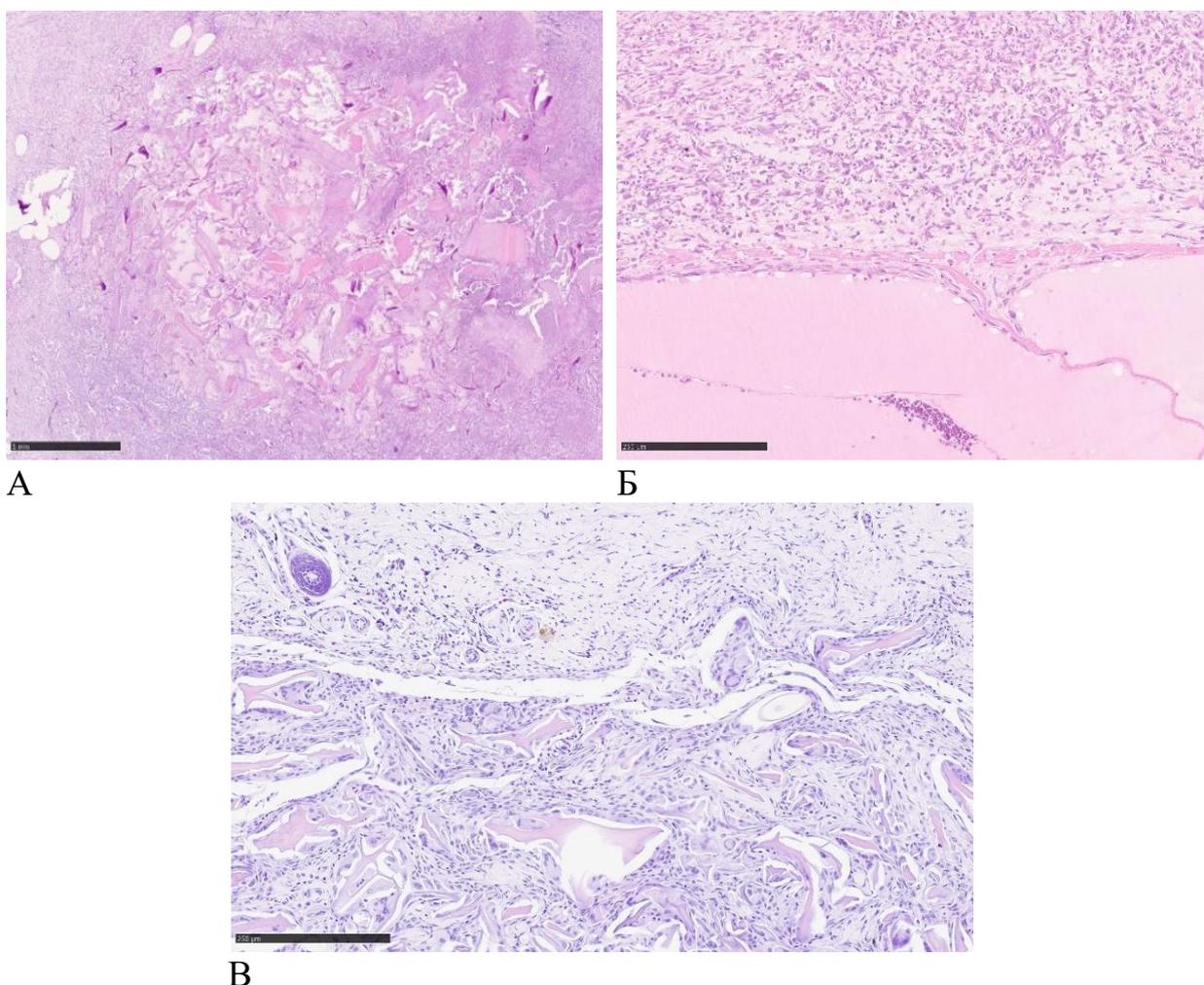


Рисунок 19 – Микрофотография морфологических изменений тканей при подкожной имплантации изучаемых образцов на 15-е сутки эксперимента вокруг материала: А - СККРС.Б – СКМ. В – СКМ с клетками.

Окр. Г-Э, ув. х 100.

Количественные характеристики клеточного состава соединительнотканной капсулы на 15-е сутки после выведения животных в эксперимент отражены в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнительный анализ клеточного состава соединительнотканной капсулы на 15-е сутки, Ме [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	МФ	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	34 [30,75; 36]	32 [31; 35]	11,5 [9; 16,5]	11,5 [4; 15,25]	11 [8,75; 12]
СКМ, не колонизированный культурами фибробластов	25 [20; 29]	28 [24; 29,25]	10 [7; 15,25]	13,5 [12,75; 15,25]	23,5 [22; 26]
СККРС	15 [13; 17]	10 [4,75; 18]	26 [23; 27]	22 [17,75; 25]	27 [20; 31,25]

На 15-е сутки эксперимента продолжало возрастать количество фибробластов во всех группах. Также как и на предыдущем сроке наибольшая концентрация данных клеток отмечена в группе №1, наименьшая в группе №3. При этом статистически значимые отличия выявлены между всеми группами исследования ($p < 0,0001$) (рисунок 20).

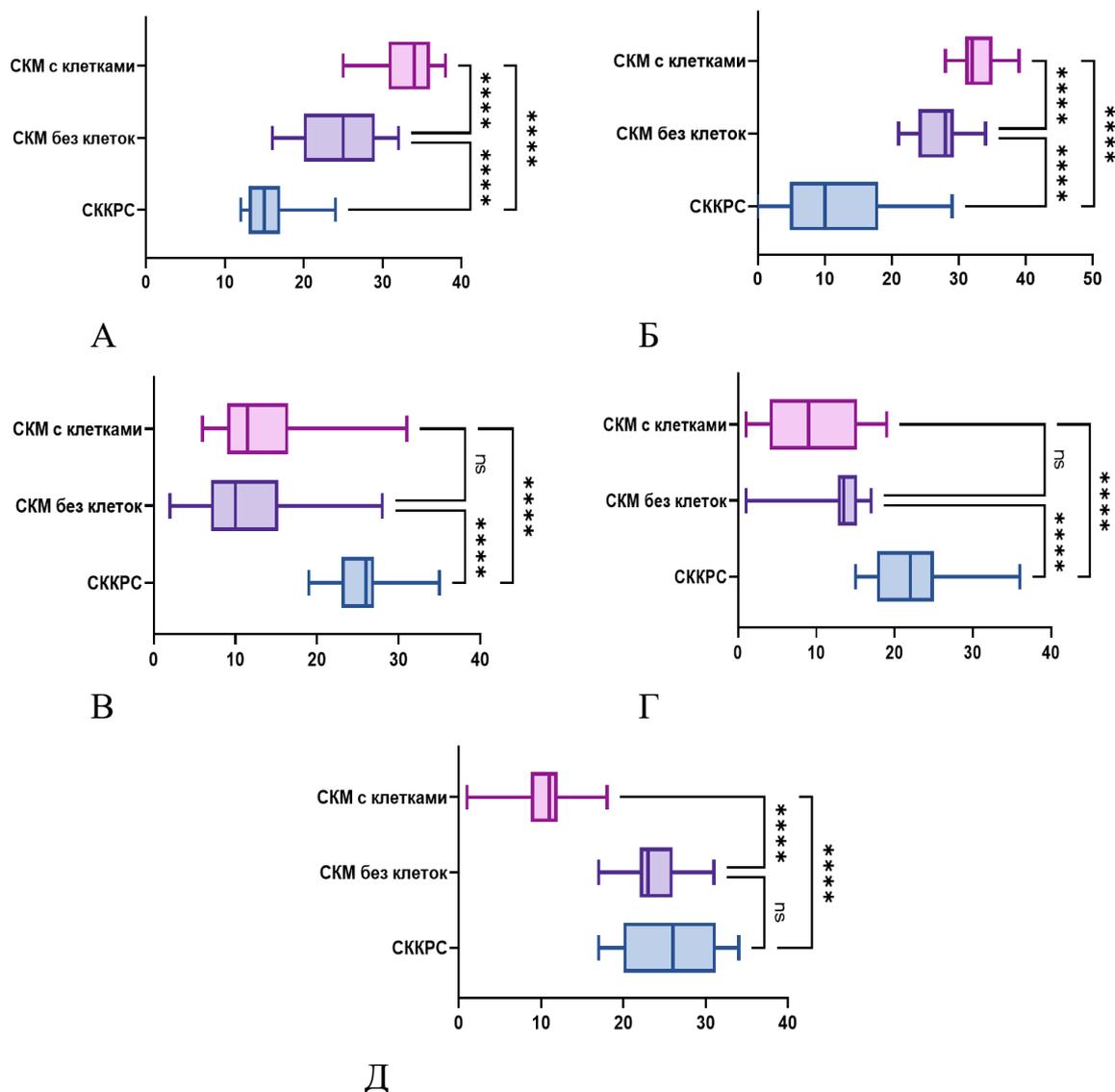


Рисунок 20 – Степень статистической значимости отличий количества клеток в соединительнотканной капсуле на 15-е сутки

А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;

Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного при подкожной имплантации изучаемых образцов на 30-е сутки эксперимента вокруг материала СККРС сохраняется полиморфноклеточная инфильтрация, в поле зрения визуализируются многочисленные макрофаги и гигантские многоядерные клетки инородных тел. На месте импланта также обнаруживаются остатки материала, между которыми визуализируются клетки фибробластического дифферона, макрофаги и лимфоциты. Вокруг

полотна СКМ визуализируется новообразованная соединительная ткань, состоящая из плотно расположенных тонких коллагеновых волокон. Среди клеток преобладают фибробласты и фиброциты с незначительной примесью грануло- и агранулоцитов. При имплантации СКМ с клетками фрагментов материала практически не визуализируется. На месте имплантации происходит замещение зрелой его структуры соединительной тканью, состоящей из толстых коллагеновых волокон. В поле зрения также визуализируются единичные гигантские многоядерные клетки народных тел, макрофаги и клетки фибропластического дифферона (рисунок 21).

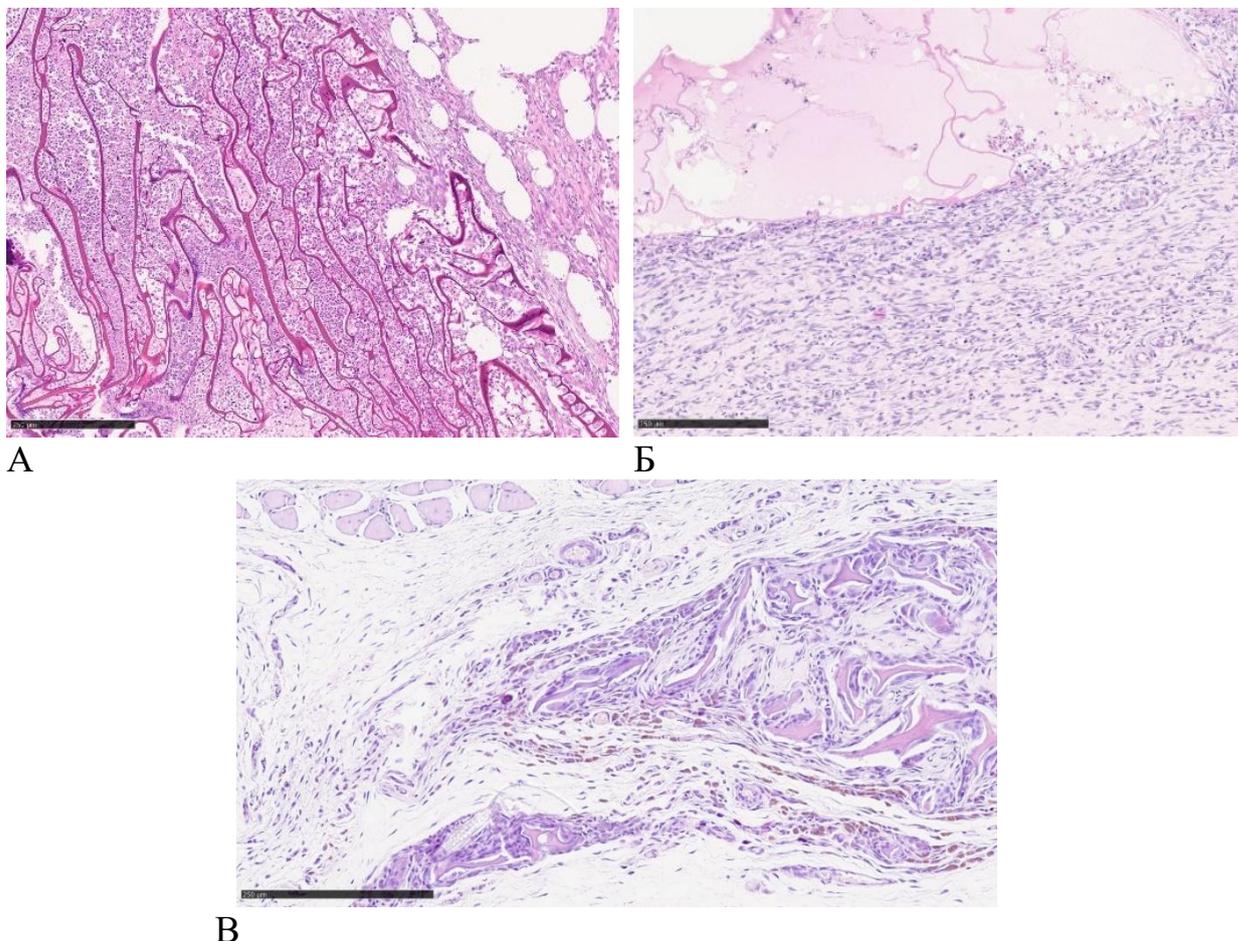


Рисунок 21 – Микрофотография морфологических изменений тканей при подкожной имплантации изучаемых образцов на 30 сутки эксперимента вокруг материала: А – СККРС. Б – СКМ. В – СКМ с клетками.

Окр. Г-Э, ув. х 100.

Количественный состав клеток в соединительнотканых капсулах на 30-е сутки после введения животных в эксперимент представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Сравнительный анализ клеточного состава соединительнотканной капсулы на 30-е сутки, Ме [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	32,5 [31; 33]	40 [37; 42]	16,5 [14; 18]	4 [3; 5]	7 [6; 9]
СКМ, не колонизированный культурами фибробластов	21,5 [17,75; 28,25]	27,5 [22,75; 34,25]	24,5 [21,75; 27]	13 [11; 17]	13,5 [11; 15]
СККРС	21 [17,75; 24]	20 [20; 29]	23 [15,25; 24]	16 [14,75; 19]	20 [18; 24,25]

Как и на предыдущих сроках исследования, наибольшее количество фибробластов отмечалось в группе №1, в то же время между группами №2 и №3 этого показателя уравнивается. Статистически значимые отличия выявлены только в группах №1 и №2, №1 и №3 ($p < 0,0001$) (рисунок 22).

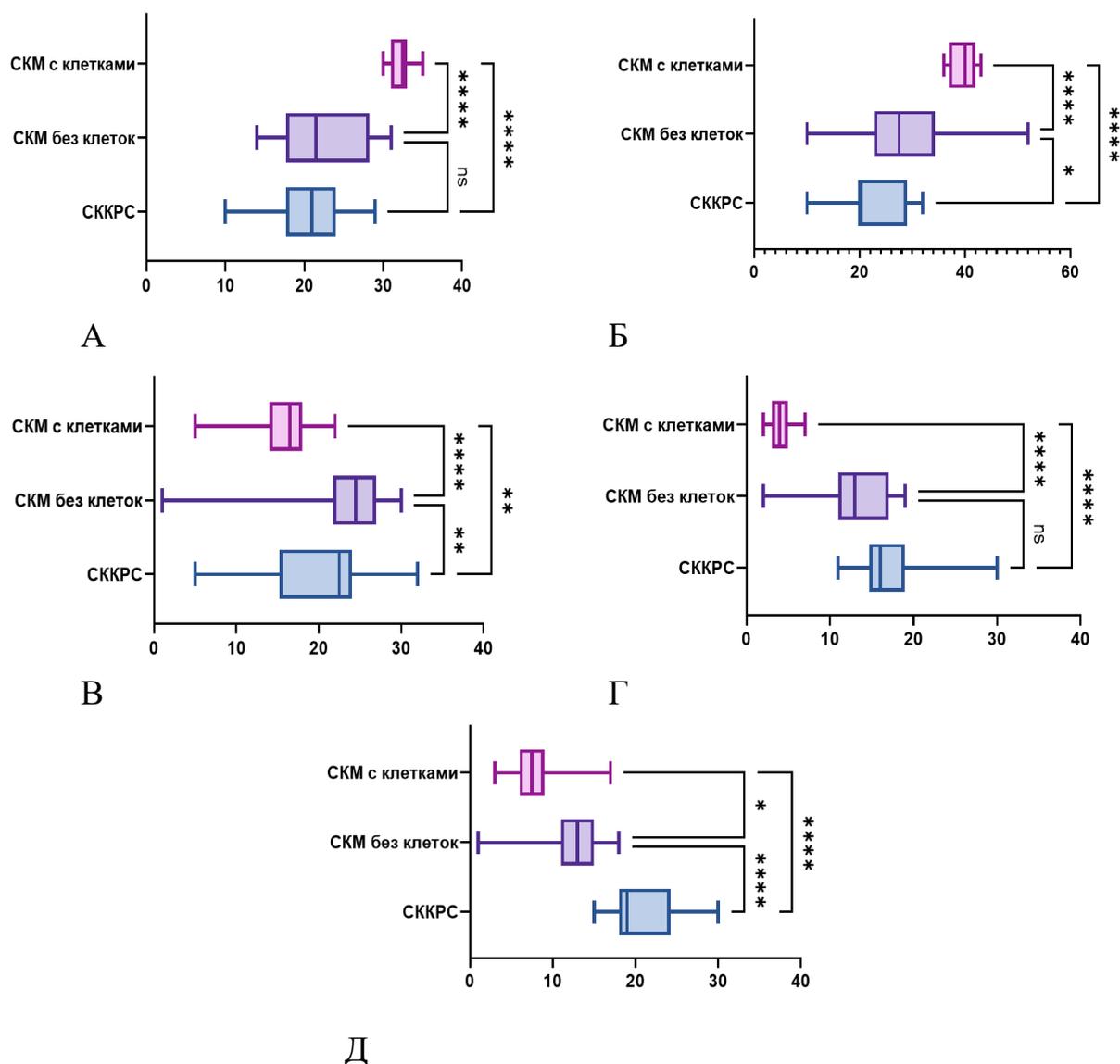


Рисунок 22. Степень статистической значимости отличий количества клеток в соединительнотканной капсуле на 30-е сутки
 А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;
 Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

3.5. Изучение уровня гидроксипролина перипротезных капсул

Концентрация гидроксипролина в перипротезной капсуле служит индикатором выраженности фибротического процесса ввиду включения исходной аминокислоты пролина, производным которой выступает

исследуемый биомаркер, в структуру молекул коллагена. Использованный в данном экспериментальном анализе подход представляет собой биохимический аналог ранее изложенных морфологических изменений, возникающих вследствие субкутанного введения испытуемых образцов полимерных матриксов. Полученные количественные характеристики приведены в нижеследующих графических иллюстрациях и табличных формах.

На 7-е сутки после выведения из эксперимента группы исследования расположись в следующем порядке по возрастанию: СККРС (0,2 мг/мл) → СКМ (0,56 мг/мл) → СКМ с культивированными клетками (0,562 мг/мл) (таблица 6, рис. 25). При этом статистически значимые отличия выявлены между группами СКМ с культивированными клетками и СККРС ($p < 0,0001$) и между СКМ и СККРС ($p < 0,0001$) (рисунок 23).

На 14-е сутки эксперимента концентрация гидроксипролина в тканях возрастала в следующей последовательности: СККРС (0,3 мг/мл) → СКМ с культивированными клетками (0,24 мг/мл) → СКМ (0,16 мг/мл) (таблица 7, рис. 26). Статистически значимые отличия выявлены между группами СКМ с культивированными клетками и СКМ ($p = 0,05$), а также СКМ и СККРС ($p = 0,01$) (рисунок 24).

Спустя месяц после начала эксперимента концентрация гидроксипролина в перипротезных капсулах животных увеличивалась в следующей последовательности: СКМ с культивированными клетками (0,129 мг/мл) → СККРС (0,133 мг/мл) → СКМ (0,2 мг/мл) (таблица 8, рисунок 25). Статистически значимые отличия выявлены между группами СКМ с культивированными клетками и СКМ ($p < 0,0001$), а также СКМ и СККРС ($p = 0,0001$) (рисунок 25).

В целом, особенность динамики концентрации гидроксипролина в группе, где применялся матрикс на основе коллагена морского происхождения с культивированными в его толще клетками фибробластами объясняется тем, что к 7-м суткам развивается выраженная реакция организма на имплантацию

инородного тела, показывая высокое содержание гидроксипролина, затем к 14-м и 30-м суткам наблюдается его снижение, что говорит о позитивном влиянии клеточных культур в толще матрикса. В остальных группах исследования такая выраженная динамика отсутствовала.

Таблица 6 – Динамика концентрации гидроксипролина на 7-е сутки, г/мл

	Me [25; 75]	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка средней
СКМ с культивированными клетками	0,562 [0,3495; 0,848]	0,2283	0,05708
СКМ	0,56 [0,4313; 0,7353]	0,2073	0,05183
СККРС	0,2005 [0,172; 0,2498]	0,0486	0,01215

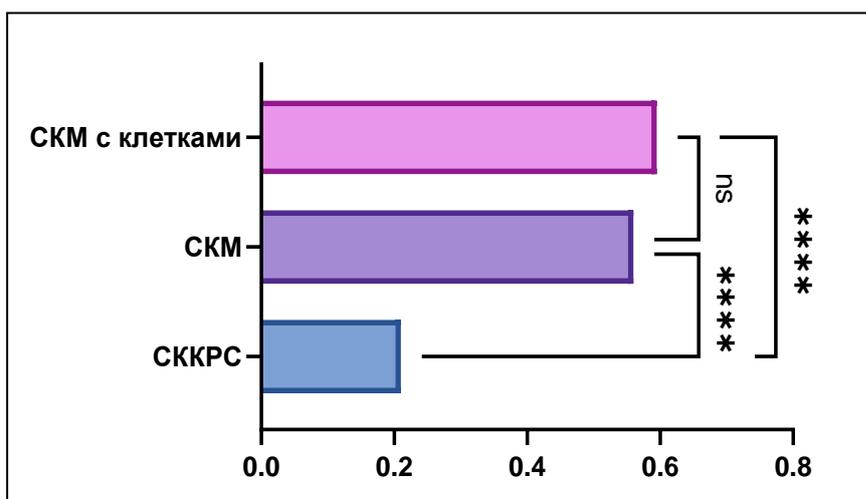


Рисунок 23 – Концентрация гидроксипролина на 7-е сутки.

Таблица 7 – Динамика концентрации гидроксипролина на 14-е сутки, г/мл

	Me [25; 75]	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка средней
СКМ с культивированными клетками	0,2365 [0,1863; 0,2645]	0,04743	0,01118
СКМ	0,163 [0,1518; 0,1738]	0,01688	0,003979
СККРС	0,3055 [0,0285; 0,488]	0,2015	0,0475

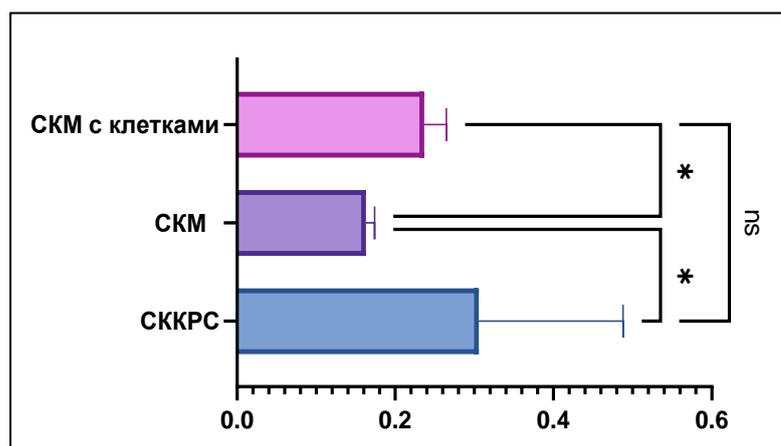


Рисунок 24 – Концентрация гидроксипролина на 14-е сутки.

Таблица 8 – Динамика концентрации гидросипролина на 30-е сутки, г/мл

	Me [25; 75]	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка средней
СКМ с культивированными клетками	0,1295 [0,081; 0,1495]	0,04519	0,01065
СКМ	0,2065 [0,1968; 0,2253]	0,01403	0,003306
СККРС	0,133 [0,1258; 0,1713]	0,04041	0,009525

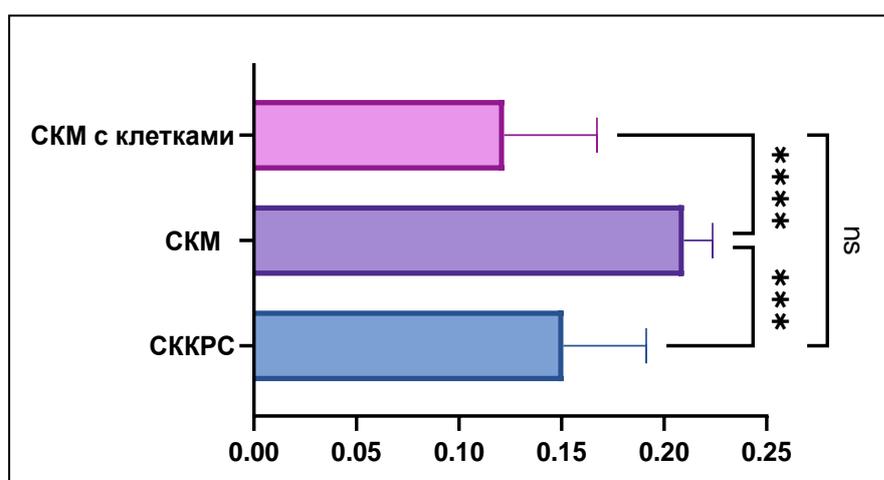


Рисунок 25 – Концентрация гидроксипролина на 30-е сутки.

3.6. Изучение реакции тканей на экспериментальных моделях

3.6.1. Изучение реакции тканей на модели повреждения брюшины

При морфологическом изучении аутопсийного материала, полученного вследствие повреждения брюшины в контрольной группе на 7-е сутки, определяется диффузная выраженная полиморфноклеточная инфильтрация и большое количество разнокалиберных кровеносных сосудов. На поверхности на всем протяжении визуализируется отсутствие однослойного плоского

эпителия. В группе «Тахокомб» на поверхности брюшины определяются остатки материала с образованием клеточного детрита, участков некроза и выраженной полиморфноклеточной инфильтрацией. При использовании Aksolagen Membrane на поверхности брюшины отмечается практически полное замещение дефекта новообразованной незрелой соединительной тканью с высокой клеточностью. При имплантации материала СКМ с клетками на поверхности брюшины определяются единичные фрагменты мембраны с образованием вокруг них зрелой соединительной ткани. Примечательно, что клеток воспалительного ряда в данной группе практически не определяются (рисунок 26).

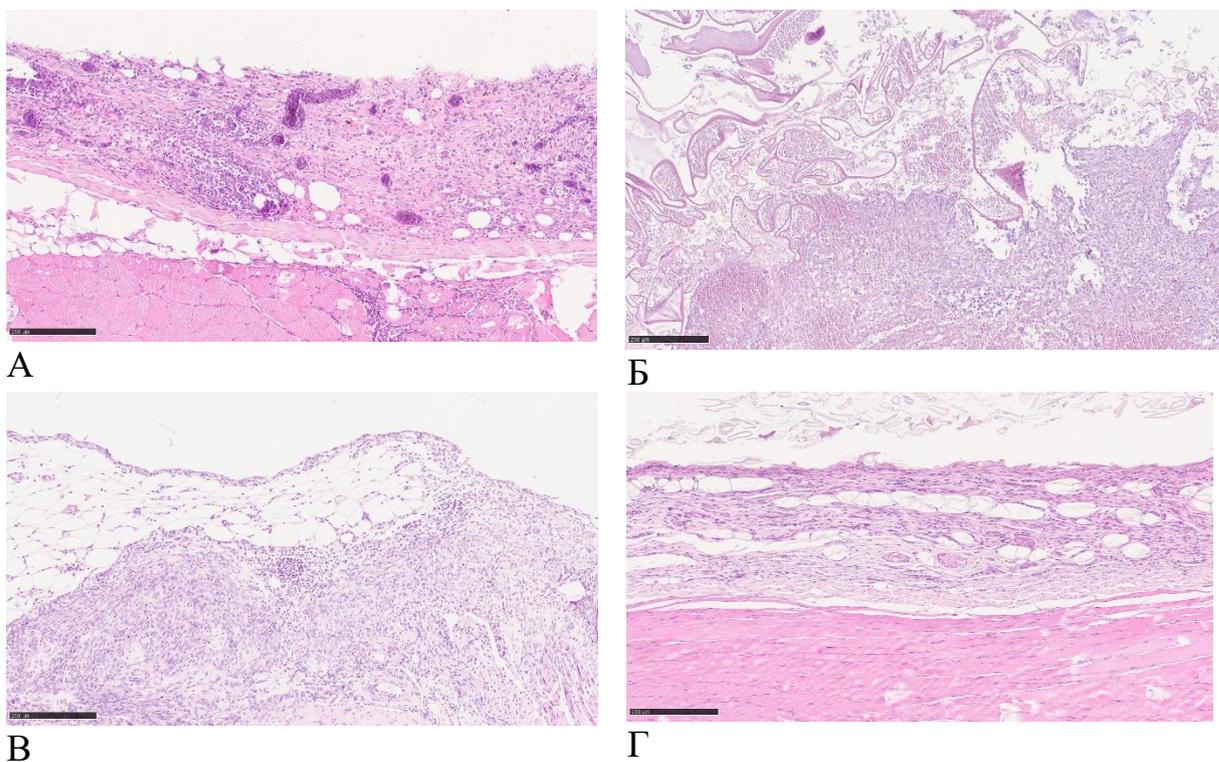


Рисунок 26 – Микрофотография морфологических изменений тканей при повреждении брюшины и последующем нанесении изучаемых образцов на 7 сутки эксперимента. А - контроль. Б – «Тахокомб». В – Aksolagen Membrane. Г – СКМ с клетками. Окр. Г-Э, ув. x 100.

Количественные показатели клеточного состава аутопсийного материала, взятого на 7-е сутки, представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала на 7-е сутки, Me [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	22 [18; 23]	23,5 [22,75; 24,25]	22 [20; 24]	13 [10; 15,25]	19,5 [16,5; 28]
Aksolagen Membrane	13 [12; 14]	13,5 [12; 14]	24,5 [22; 27,25]	15 [13; 16,25]	34 [32; 36,25]
«Тахокомб»	9 [8; 9]	10 [8; 9,25]	28 [27; 29]	12 [14; 17]	41 [36,75; 43]
Контроль	3 [2; 4]	12 [10,75; 13,25]	12 [11; 13]	15 [13; 15]	58 [55,75; 61]

Из приведенных данных видно, что наибольшее количество фибробластов и фиброцитов выявлено в группе №1, наименьшее количество фибробластов в группе №4, а наименьшая концентрация фиброцитов в группе №3. При этом в группе №2 выявлено наибольшее количество гранулоцитов, в группе №3 макрофагов, а в группе контроля агранулоцитов.

При оценке уровня статистической значимости отличий между исследуемыми образцами выявили, что практически во всех параметрах значение $p \leq 0,05$, за исключением концентрации фиброцитов и гранулоцитов в группах №2 и №4 ($p > 0,9999$), концентрации макрофагов в группах №1 и №2 ($p = 0,1829$), агранулоцитов в группах №2 и №3 ($p = 0,0541$). Что касается количественного содержания гранулоцитов, то статистически значимые отличия выявлены лишь между группами №1 и №2 ($p = 0,0352$) (рисунок 27).

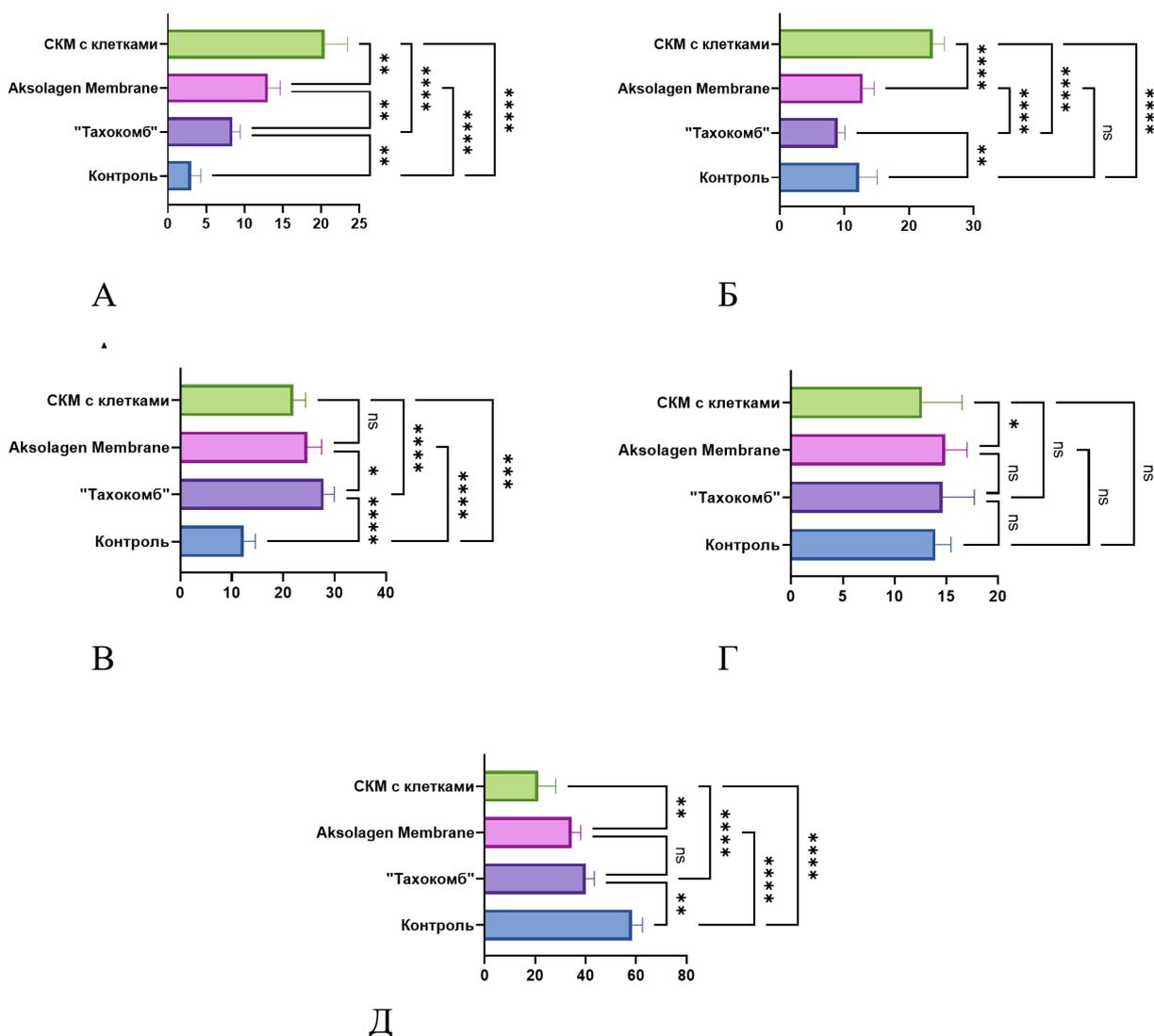


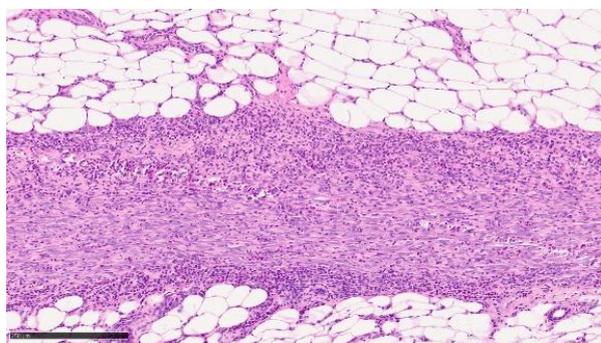
Рисунок 27 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 7-е сутки после повреждения брюшины:

А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;

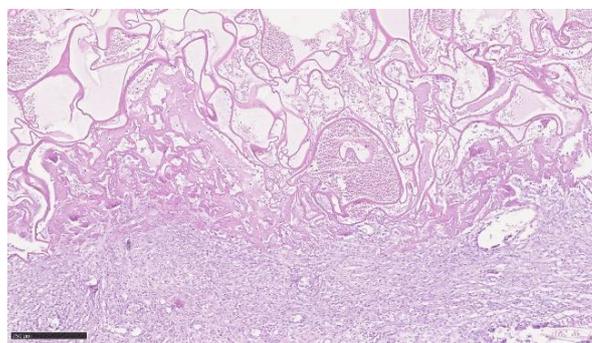
Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

В результате морфологического изучения аутопсийного материала, полученного при повреждении брюшины и последующей имплантации изучаемых образцов, на 15-е сутки эксперимента в контрольной группе определяется образование соединительной ткани, что приводит к значительному утолщению участка повреждения. Среди клеток преобладают нейтрофилы и лимфоциты. В группе средства «Тахокомб» на поверхности брюшины продолжают визуализироваться остатки материала со значительной

их резорбцией и прорастанием зрелой соединительной ткани. Участков некроза не обнаружено. Однако, в непосредственно близости к остаткам материала, отмечено образование гигантских многоядерных клеток инородных тел. При имплантации Aksolagen Membrane происходит созревание соединительные ткани, которое приводит к незначительному утолщению места повреждения. Клеточный состав преимущественно представлен клетками фибробластического дифферона с единичными макрофагами и гигантскими клетками инородных тел. После применения мембраны СКМ с клетками на поверхности брюшины происходит образование мезотелия, под которым определяется двухслойная соединительная ткань. Верхние ее отделы представлены незрелой соединительной тканью с незначительной воспалительной фильтрацией. Нижняя часть капсулы представлена зрелыми, толстыми коллагеновыми волокнами с клетками фибробластического дифферона (рисунок 28).

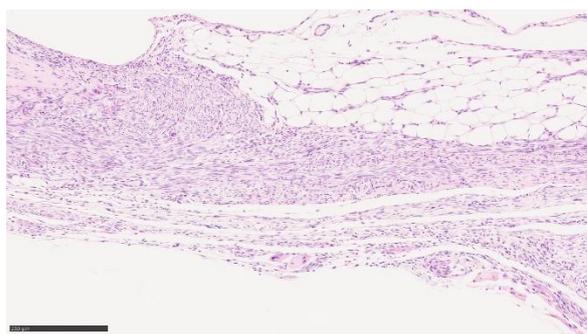


А

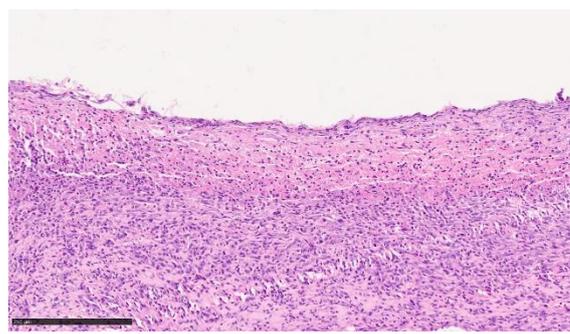


Б

Продолжение рисунка 28.



В



Г

Рисунок 28 – Микрофотография морфологических изменений тканей при повреждении брюшины и последующем нанесении изучаемых образцов на 15-е сутки эксперимента. А – контроль. Б – Тахокомб. В – Aksolagen Membrane. Г – СКМ с клетками. Окр. Г-Э, ув. х 100.

Данные гистологического исследования аутопсийного материала, взятого на 15-е сутки эксперимента представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала на 15-е сутки, Ме [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	60 [56,75; 62,25]	13,5 [13; 15]	14,5 [12,75; 16]	8 [3,75; 9]	5 [5; 6,25]
Aksolagen Membrane	37 [32,75; 41,25]	24,5 [22,75; 28,25]	18 [17; 19]	10 [8; 12]	10 [9; 12]
«Тахокомб»	16 [15; 17,25]	18 [13; 20]	31 [29; 33]	10 [9,75; 11]	25 [21,75; 30,25]
Контроль	20 [18; 22]	10 [8,75; 12]	13 [12; 15]	11 [9,75; 12]	46,5 [43; 49]

На двухнедельном сроке в группах исследования продолжало возрастать количество фибробластов. Наибольшее их количество отмечено в группе №1, наименьшее – в группе №3. Примечательно, что в группе СКМ с клетками минимальная концентрация гранулоцитов и агранулоцитов, что говорит о позитивном эффекте от имплантации клеточного продукта.

По количеству фибробластов статистически не значимы отличия между группами №3 и №4 ($p=0,0975$). По количеству фиброцитов высокая статистическая значимость отличий была выявлена во всех группах за исключением групп №1 и №3. По количеству макрофагов значимых отличий не было только между группой №1 и контролем. По концентрации гранулоцитов статистически значимые отличия выявлены между группами №1 и №2, №1 и №3, №1 и №4 ($p<0,0001$). По количеству агранулоцитов статистически значимые отличия выявлены абсолютно во всех группах ($p\leq 0,05$) (рисунок 29).

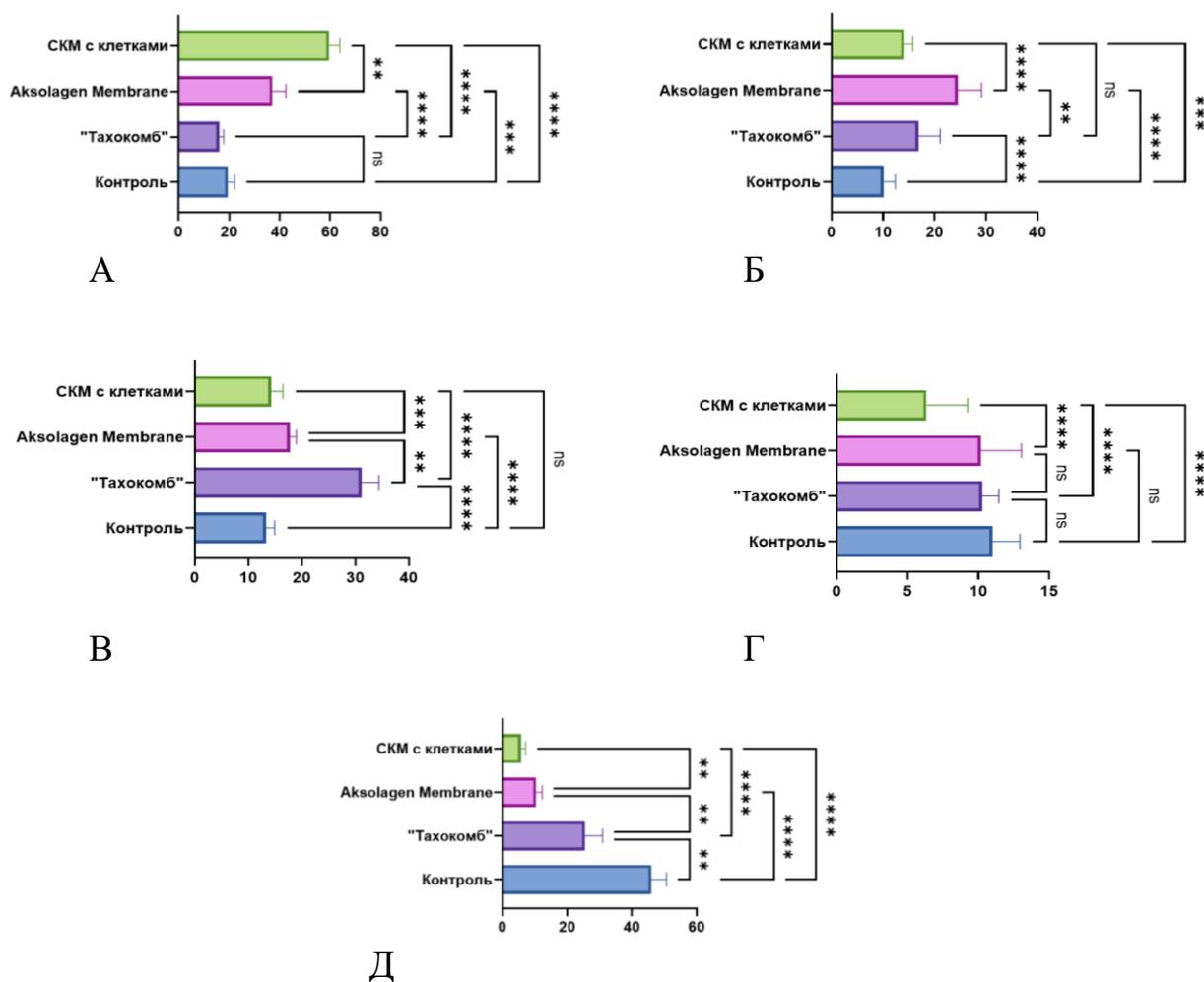


Рисунок 29 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 15-е сутки после повреждения брюшины:

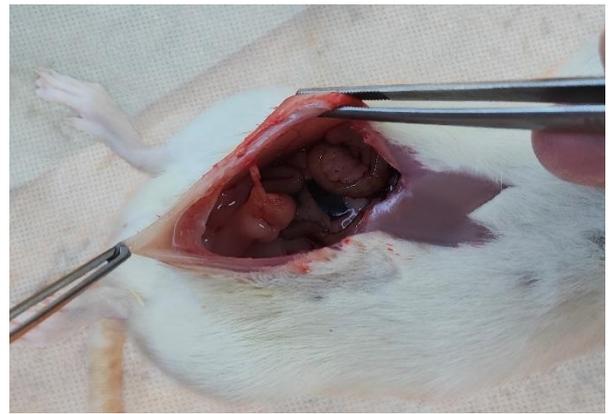
А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;
Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного при повреждении брюшины и последующем нанесении изучаемых образцов на 30-е сутки эксперимента, в контрольной группе на месте дефекта продолжает визуализироваться утолщенный слой зрелой соединительной ткани, от которого к прилежащей жировой ткани отходят тонкие коллагеновые спайки. Среди клеточного компонента приобретают клетки лимфоциты и фибробласты. В группе «Тахокомб» на месте повреждения материал полностью резорбирован. Происходит образование достаточно толстого пласта соединительной ткани, которая также приводит к образованию спаек с

прилежащими тканями. После имплантации Aksolagen Membrane на месте дефекта происходит эпителизация однослойным плоским эпителием – мезотелием, под которым визуализируется незначительная клеточная инфильтрация. Спаек в данной зоне нет. При имплантации СКМ с клетками на месте повреждения визуализируется новообразованная, зрелая соединительная ткань, без признаков спайкообразования (рис. 30, 31).



А



Б



В



Г

Рисунок 30 – Макроскопическая картина изменений на 30-е сутки после десерозирования брюшины в группах исследования:

А – группа контроля; Б – «Тахокомб»; В – Aksollagen Membrane;
Г – Aksolagen Membrane, заселенный дермальными аутофибробластами.

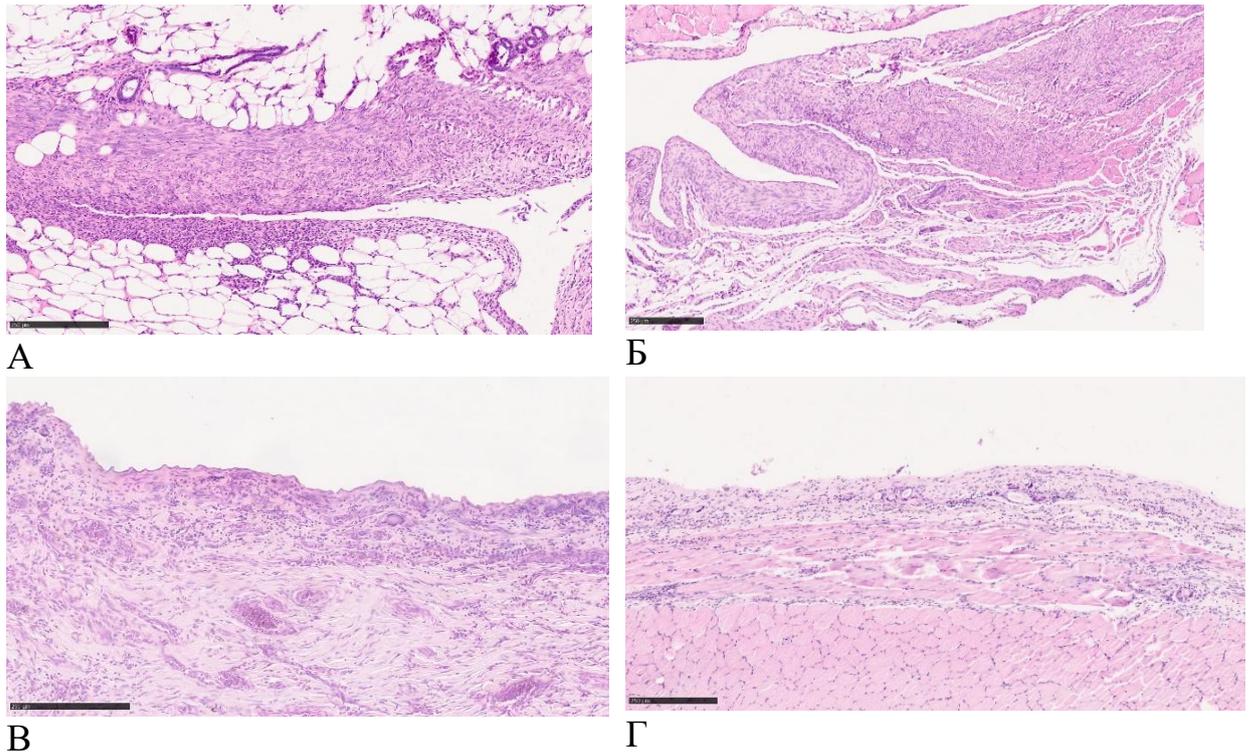


Рисунок 31 – Микрофотография морфологических изменений тканей при повреждении брюшины и последующем нанесении изучаемых образцов на 30-е сутки эксперимента. А - контроль. Б – Тахокомб. В – Aksolagen Membrane. Г – СКМ с клетками. Окр. Г-Э, ув. х 100.

На финальном сроке выведения животных из эксперимента были получены следующие данные относительно клеточного состава аутоптата (таблица 11).

Таблица 11 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала на 30-е сутки, Ме [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	18,5 [16; 22]	68 [63; 69]	3,5 [2; 5]	4 [3; 5]	6 [5; 8]
Aksolagen Membrane	39 [33; 40,25]	40 [37,75; 46,25]	13 [12; 14,25]	3 [1; 4]	5 [4; 5]

Продолжение таблицы 11.

«Тахокомб»	20 [19; 22]	15 [13; 16,25]	19 [14,75; 20]	11 [10; 12,25]	35 [31,75; 40]
Контроль	24 [22; 25]	16,5 [15; 18,25]	13 [11,75; 14]	10 [9; 11]	36,5 [33,75; 40]

На данном сроке в группе №1 заметно сокращается количество фибробластов, но значительно увеличивается количество фиброцитов, что говорит о «созревании» соединительной ткани. При этом концентрация макрофагов, гранулоцитов и агранулоцитов в данной группе минимальная относительно других образцов и контроля.

Анализируя количество фибробластов, статистически значимые отличия не выявлены только между группами №1 и №3. По концентрации фиброцитов нет значимых отличий между группой №3 и контролем. Сравнивая количество макрофагов, статистически значимых отличий нет только между группами №2 и №4. При подсчете гранулоцитов и агранулоцитов незначимы отличия между группами №1 и №2, а также №3 и №4 (рисунок 32).

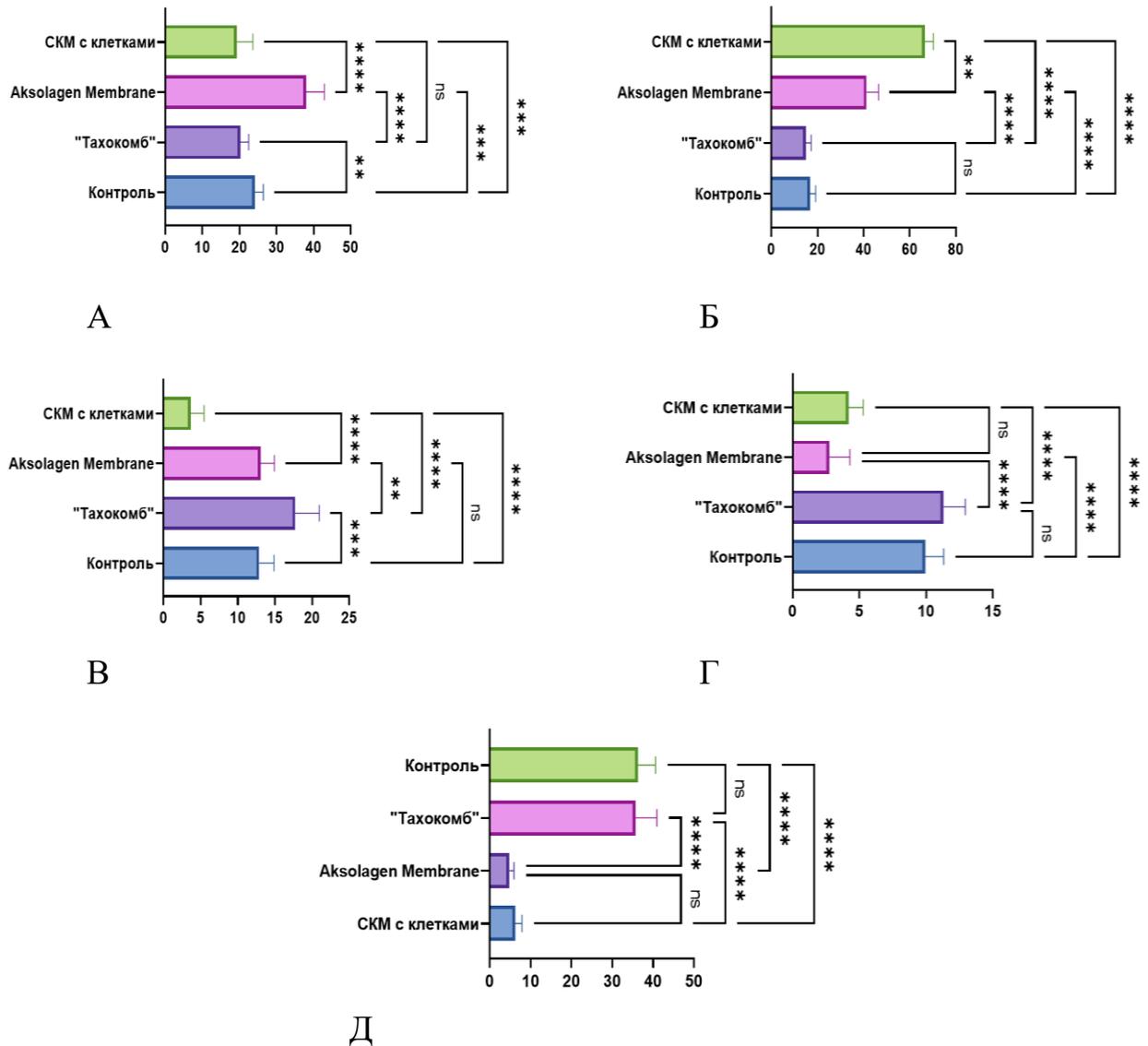


Рисунок 32 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 30-е сутки после повреждения брюшины:

А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;

Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

3.6.2. Изучение реакции тканей на модели повреждения слепой кишки

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного при повреждении серозной оболочки кишки на 7-е сутки эксперимента в

контрольной группе, определяется воспалительно-клеточный вал с образованием участков некроза и тонких коллагеновых структур, тянущихся к окружающей жировой клетчатке. В группе «Тахокомб» в серозной оболочке кишки определяется наличие остатков материала с образованием вокруг них фиброзной капсулы, а также участками детрита с многочисленными макрофагами и клетками воспалительного ряда. При имплантации мембраны Aksolagen Membrane в серозной оболочке кишки визуализируются остатки мембраны с диффузной воспалительно-клеточной фильтрацией и единичными гигантскими многоядерными клетками. При имплантации мембраны СКМ с клетками в серозной оболочке кишки определяются остатки мембраны, значительно меньше воспалительной фильтрации по сравнению с предыдущей группой (рисунок 33).

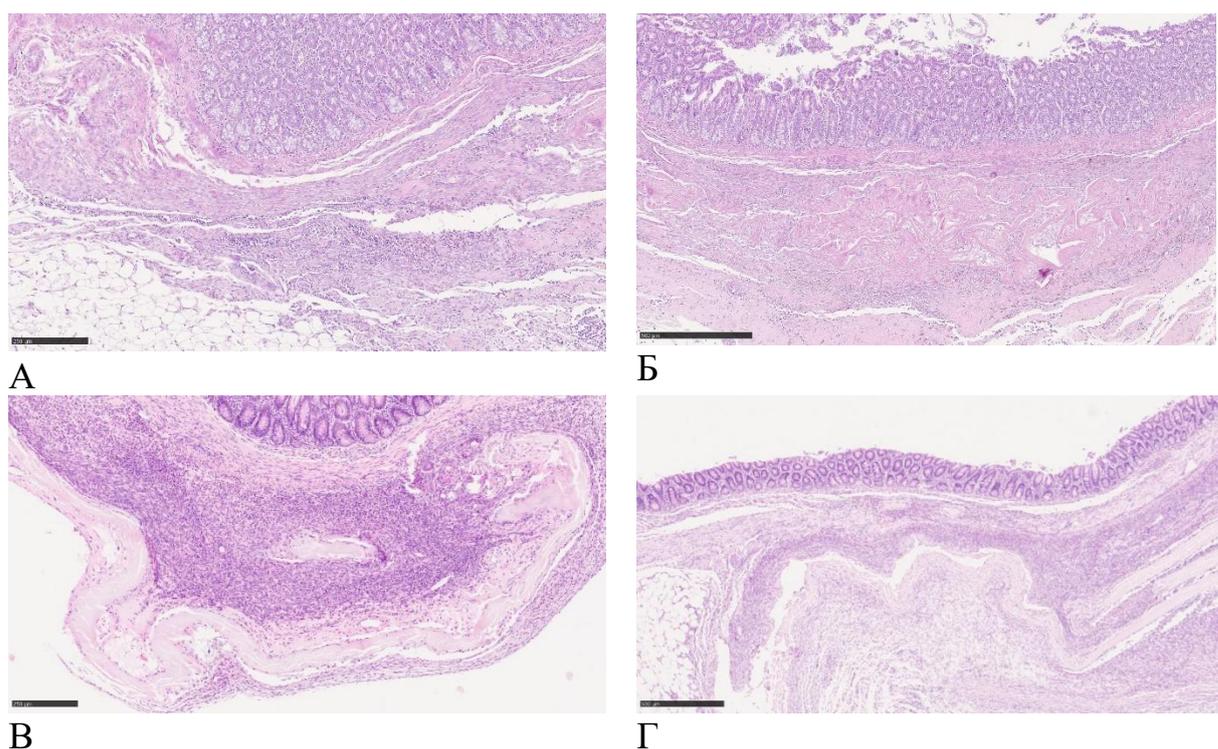


Рисунок 33 – Микрофотография морфологических изменений тканей при повреждении серозной оболочки кишки и последующем нанесении изучаемых образцов на 7-е сутки эксперимента. А – контроль. Б – Тахокомб. В – Aksolagen Membrane. Г – СКМ с клетками.

Окр. Г-Э, ув. х 100.

Численные показатели клеточного состава аутоптата кишки на 7-е сутки эксперимента представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала после повреждения серозной оболочки кишки на 7-е сутки, Me [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	22,5 [19; 24]	11 [10; 12]	30,5 [30; 35]	18 [16; 21]	18 [14; 21,25]
Aksolagen Membrane	10,5 [9; 12]	7,5 [5,75; 8,25]	39 [37; 40]	19 [18; 21,75]	24 [22,75; 25]
«Тахокомб»	5 [4; 6]	16,5 [16; 18]	36,5 [33; 38]	17 [15,75; 18]	25 [22,5; 28,25]
Контроль	4 [3,75; 5]	7 [6; 7]	20,5 [19; 22]	24 [23; 26]	44,5 [41,75; 48]

На 7-е сутки после выведения животных из эксперимента наибольшее количество фибробластов определяется в группе №1, а наименьшее в группе №4. Наибольшее количество макрофагов определяется в группе №2, гранулоцитов и агранулоцитов в группе контроля.

При этом по количеству фибробластов выявлены статистически значимые отличия между всеми группами, за исключением групп №3 и №4. По количеству фиброцитов таким же исключением по уровню статистической значимости является сравнение групп №2 и №4. По количеству макрофагов значимые отличия выявлены между группами №1 и №2, №1 и №4, №2 и №4, №3 и №4 ($p < 0,0001$). По количеству гранулоцитов статистически значимые отличия отсутствуют между группами №1 и №2, №1 и №3. По количеству

агранулоцитов статистически значимые отличия не выявлены только между группами №2 и №3 (рисунок 34).

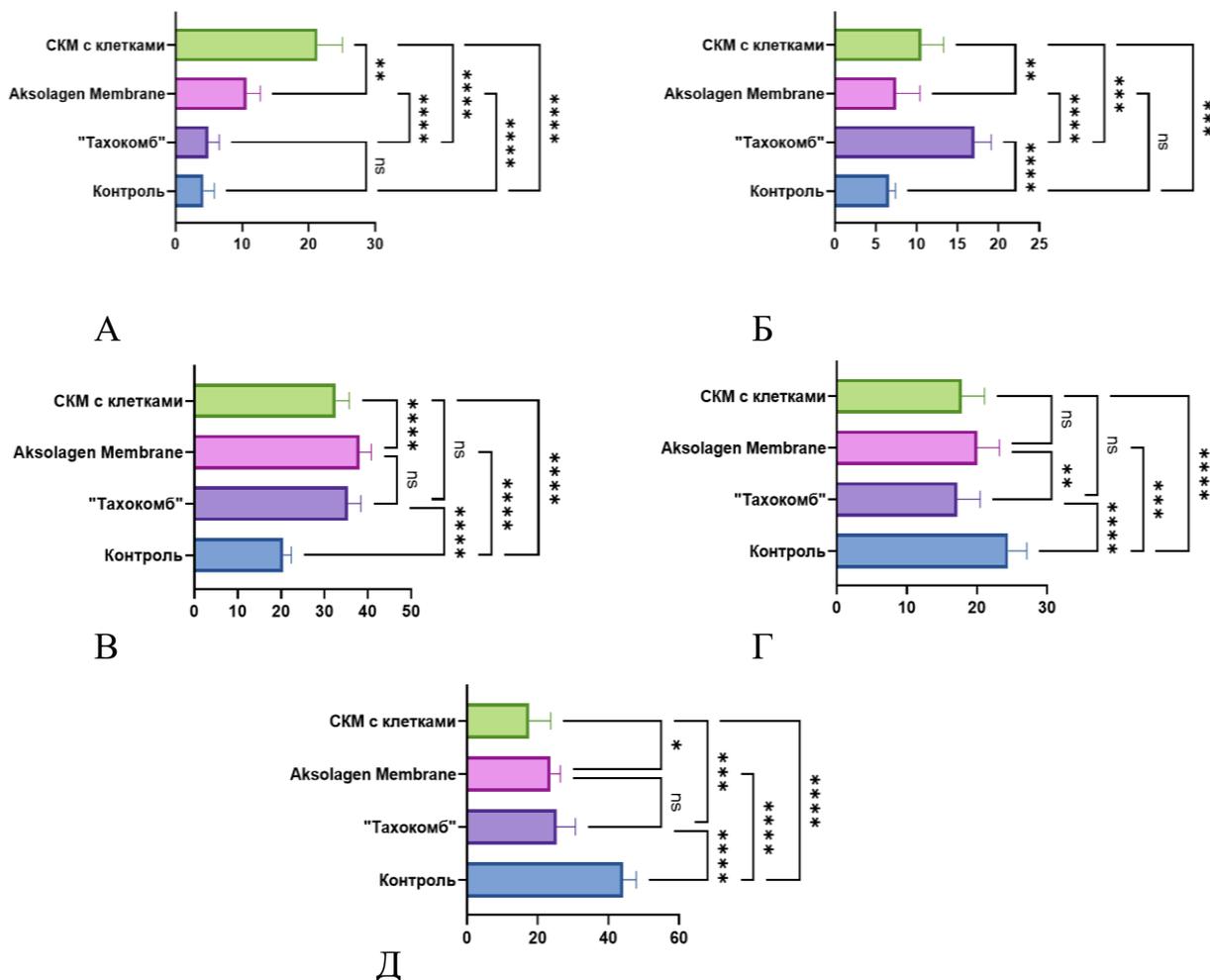


Рисунок 34 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 7-е сутки после повреждения серозной оболочки слепой кишки:

А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;

Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного после повреждения серозной оболочки кишки на 15-е сутки эксперимента в контрольной группе, в серозной оболочке происходит образование незрелой соединительной ткани, состоящей из тонких коллагеновых волокон, с образованием спаек и значительным преобладанием клеточного инфильтрата. В группе с «Тахокомб» визуализируются остатки мембраны с образованием фиброзной капсулы с наличием в ней клеток инородных тел, что приводит к

значительному увеличению толщины серозной оболочки и образованию спаек. При имплантации Aksolagen Membrane также происходит достоверное увлечение толщины серозной оболочки, в центре визуализируются остатки материала. Однако клеточный компонент преимущественно представлен клетками фибробластического дифферона, единичными макрофагами и гигантскими многоядерными клетками. При имплантации мембраны СКМ с клетками толщина серозной оболочки увеличена незначительно, без спайкообразования. Новообразованная соединительная ткань представлена рыхло расположенными тонкими коллагеновыми волокнами, с явлениями ангиогенеза (рисунок 35).

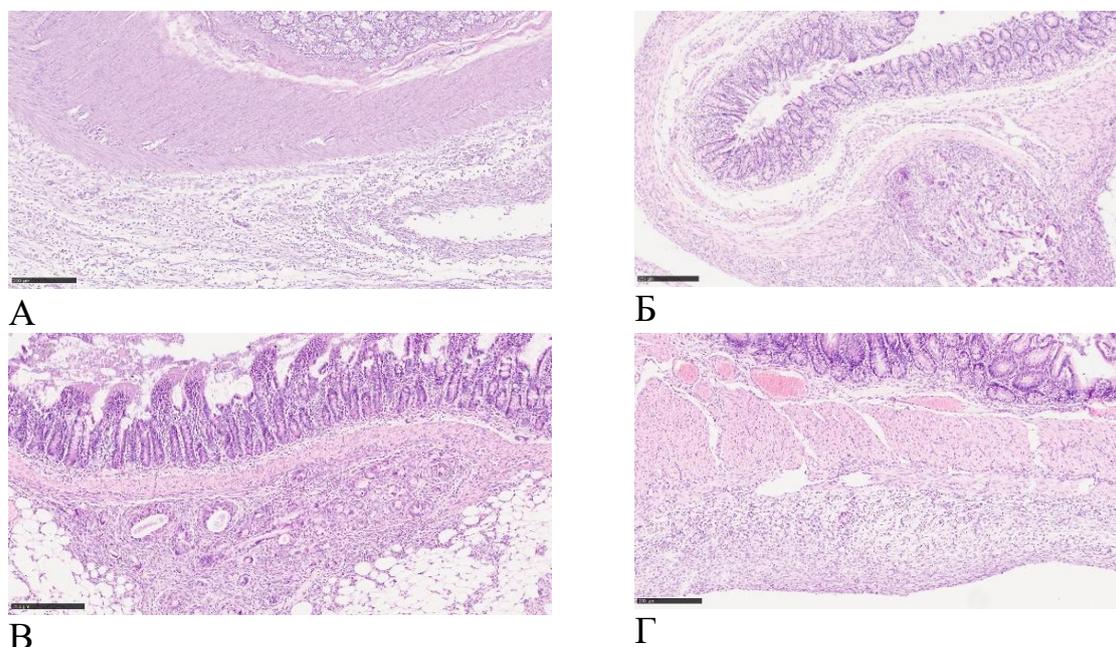


Рисунок 35 – Микрофотография морфологических изменений тканей при повреждении серозной оболочки кишки и последующем нанесении изучаемых образцов на 15-е сутки эксперимента. А - контроль. Б – Тахокомб. В – Aksolagen Membrane. Г – СКМ с клетками. Окр. Г-Э, ув. x 100.

Количественные показатели клеточного состава аутопатов слепой кишки на 15-е сутки после выполнения эксперимента представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала после повреждения серозной оболочки кишки на 15-е сутки, Me [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	35 [33,75; 37]	26 [23; 28]	16 [15; 17,25]	12 [11,75; 14]	11 [9; 12,25]
Aksolagen Membrane	18 [16,75; 19]	21 [16; 25]	22 [21; 25]	23 [21; 25]	16 [7,75; 22,25]
«Тахокомб»	20 [9; 11]	12 [11; 13]	27,5 [23; 30,5]	24 [11; 13,25]	26,5 [11; 13,25]
Контроль	11 [9; 12]	18 [13,75; 20,25]	14 [13; 21]	23,5 [16; 27]	33,5 [26; 39,5]

На 15-е сутки после выведения в животных в эксперимент в группе №1 также сохраняется наибольшее количество фибробластов, стоит также отметить двухкратное возрастание концентрации фиброцитов в данной группе, что говорит о формировании соединительной ткани.

Оценивая уровень статистической значимости отличий между группами, получены следующие результаты. По количеству фибробластов статистически значимые отличия выявлены практически между всеми группами ($p < 0,0001$), за исключением групп №3 и №4, где $p > 0,9999$. По концентрации фиброцитов значимость отличий не выявлена между группами №1 и №2, а также №2 и №4. По количеству макрофагов отличия не значимы между группами №2 и №3, №1 и №4. Анализируя количество гранулоцитов и агранулоцитов, статистическая значимость отличий не выявлена только между группами №1 и №3, №2 и №4 (рисунок 36).

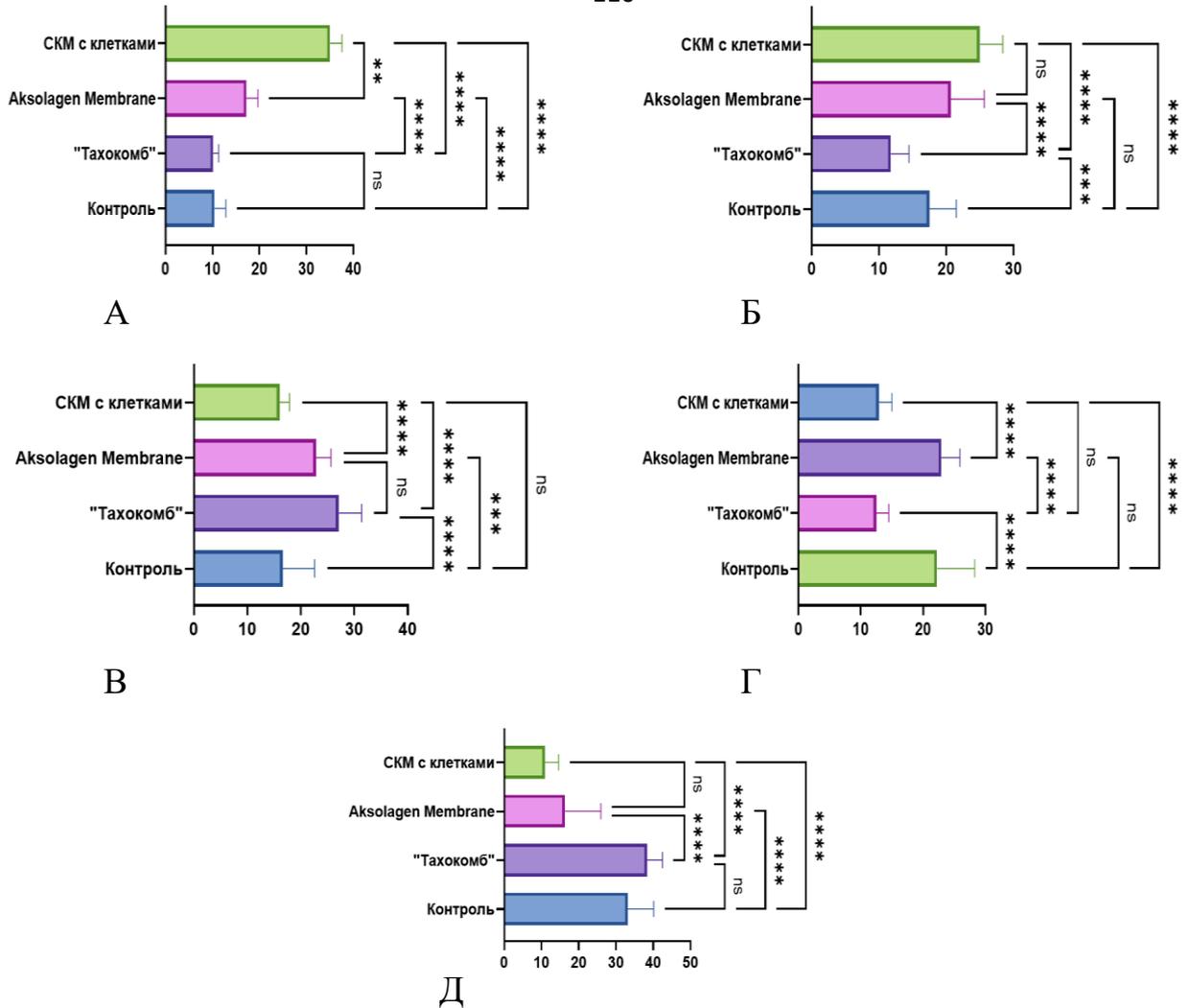


Рисунок 36 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 15-е сутки после повреждения серозной оболочки слепой кишки:

А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;
Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного после повреждения серозной оболочки кишки на 30-е сутки эксперимента, в контрольной группе определяется образование спаек с незначительной воспалительной фильтрацией. При использовании мембраны «Тахокомб» продолжает сохраняться воспалительно-клеточная фильтрация с образованием единичных гранулем и многочисленными гигантскими многоядерными клетками. При использовании мембраны СКМ в серозной оболочке визуализируются единичные остатки материала, клеточность повышена. В поле зрения преобладают клетки фибробластического

дифферона, также макрофаги и единичные гигантские многоядерные клетки. При использовании мембраны СКМ с клетками серозная оболочка не увеличена, спайкообразования не определяется, воспалительных изменений нет (рисунки 37, 38).



А



Б



В



Г

Рисунок 37 – Макроскопическая картина изменений на 30-е сутки после модели повреждения кишки в группах исследования:

А – группа контроля; Б – «Тахокомб»; В – Aksollagen Membrane;

Г – СКМ, заселенный дермальными аутофибробластами

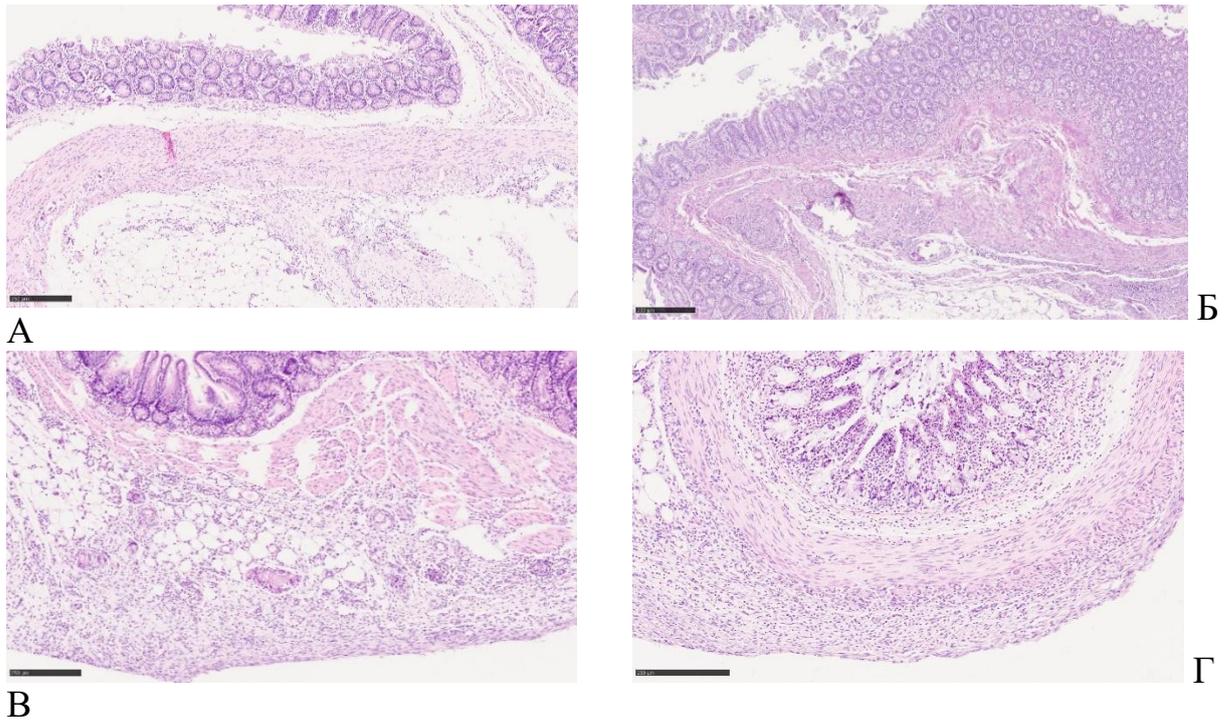


Рисунок 38 – Микрофотография морфологических изменений тканей при повреждении серозной оболочки кишки и последующем нанесении изучаемых образцов на 30 сутки эксперимента. А - контроль. Б – Тахокомб.

В – Aksollagen Membrane. Г – СКМ с клетками.

Окр. Г-Э, ув. х 100.

Количественные показатели сравнительного изучения клеточного состава аутоптата слепой кишки на 30-е сутки эксперимента представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала после повреждения серозной оболочки кишки на 30-е сутки, Ме [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	36 [35; 37]	37,5 [35; 38]	4 [3; 5]	15 [14; 16,25]	7,5 [5; 10,25]
Aksolagen Membrane	31 [28; 33,5]	24 [22,75; 26]	24 [22; 25]	5 [5; 7]	16 [13; 19,5]

Продолжение таблицы 14.

«Тахокомб»	17 [16,75; 20]	24 [23; 26,25]	25 [19; 28,25]	13 [11; 15,25]	21 [14; 26,25]
Контроль	18,5 [17; 21]	17,5 [16; 20]	15 [11; 15,25]	12,5 [11; 14,25]	36,5 [32,75; 39,25]

Полученные данные на данном сроке эксперимента показывают, что наибольшее количество фибробластов и фиброцитов определяются в группе №1, в то время как в остальных группах преобладают макрофаги, гранулоциты, агранулоциты. Примечательно, что статистически значимые отличия по количеству клеток (за исключением фиброцитов и гранулоцитов не выявлены между группами №3 и №4 ($p \geq 0,05$), а также между группами №2 и №3 за исключением гранулоцитов и фибробластов ($p \geq 0,05$) (рисунок 39).

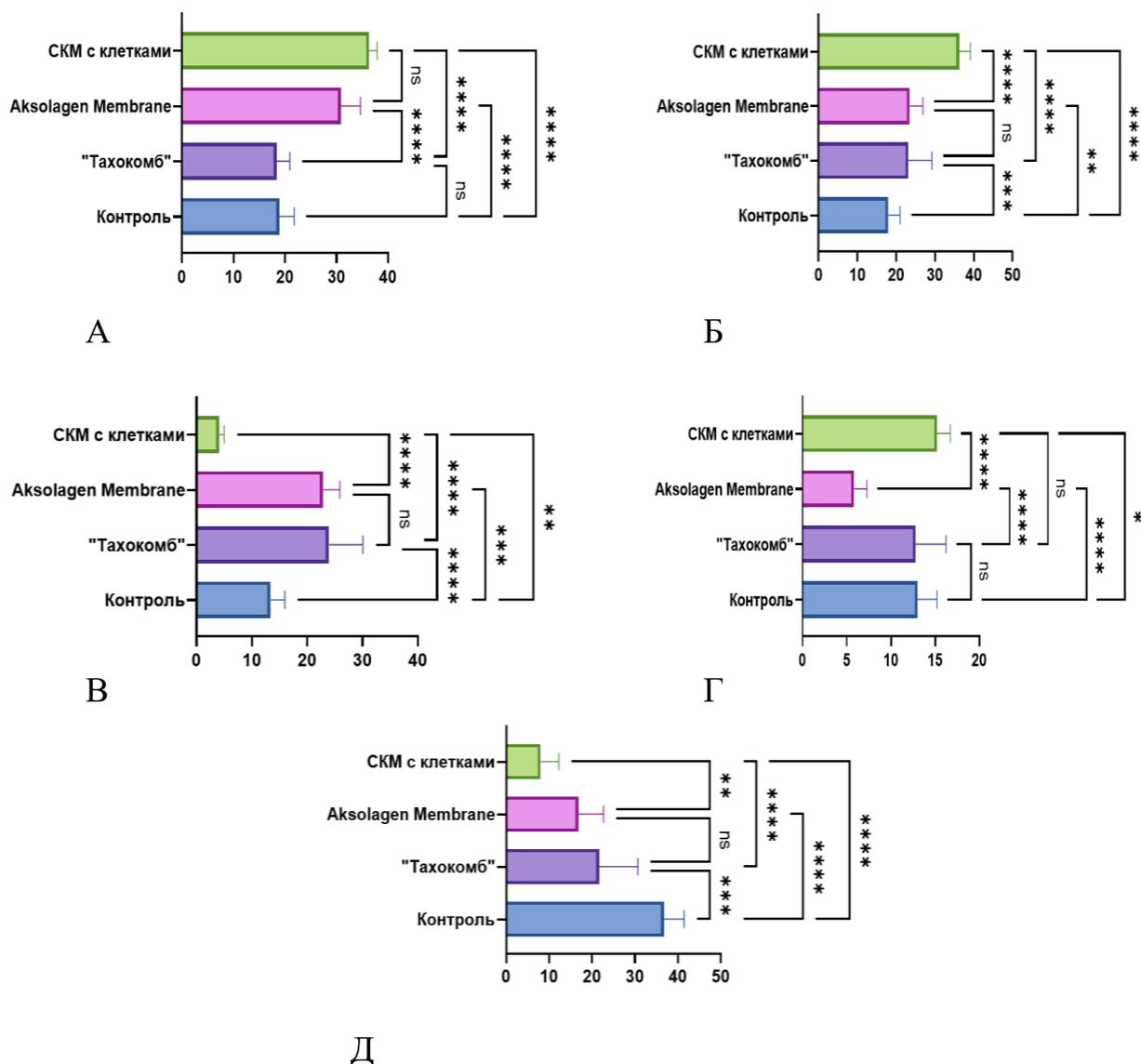


Рисунок 39 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 30-е сутки после повреждения серозной оболочки слепой кишки:

А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;

Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

3.6.3. Изучение реакции тканей на модели однорядного узлового шва слепой кишки

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного после прошивания кишки однорядным узловым швом на 7-е сутки

эксперимента в контрольной группе в зоне шва, определяется наличие шовного материала с образованием вокруг него капсулы, в состав которой входят многочисленные макрофаги, гигантские многоядерные клетки, а также грануло- и агранулоциты. В группе «Тахокомб» происходит частичная дезорганизация мембраны с участками интерстициального отека, некроза, многочисленными макрофагами и клетками инородных тел. При закрытии шва материалом Aksolagen Membrane в зоне шва сохраняются незначительные остатки материала, при этом воспалительная фильтрация не выражена. При применении матрикса СКМ, колонизированного фибробластами в зоне шва, определяется выраженная фибропластическая реакция, воспалительных изменений нет (рисунок 40).

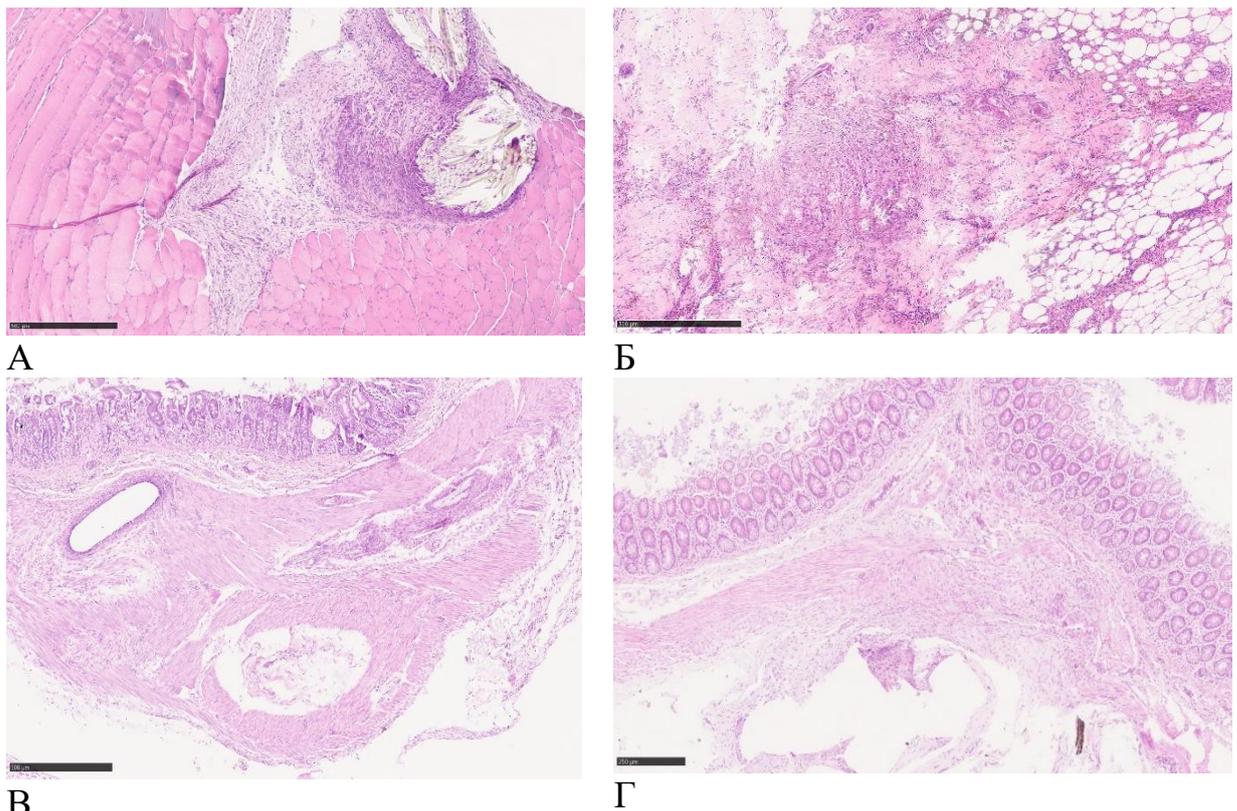


Рисунок 42 – Микрофотография морфологических изменений тканей после прошивания кишки однорядным узловым швом и последующем нанесении изучаемых образцов на 7 сутки эксперимента. А - контроль. Б – Тахокомб.

В – Aksollagen Membrane. Г – СКМ с клетками. Окр. Г-Э, ув. х 100

Количественные показатели клеточного состава аутоптата на 7-е сутки эксперимента представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала после наложения однорядного узлового шва на кишку на 7-е сутки, Ме [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	29,5 [27; 30]	13 [12; 14]	21 [18; 23]	23 [22; 25]	13,5 [12,5; 18,25]
Aksolagen Membrane	7,5 [5; 9]	12,5 [11; 14]	21 [19 22]	25 [23; 28]	34 [17; 39]
«Тахокомб»	6 [5; 10]	9 [7,75; 12,5]	23 [19,75; 30,25]	48 [29; 57]	14 [9; 17,5]
Контроль	9 [7; 10]	10 [8; 15,25]	21,5 [14; 32,25]	47 [32,5; 55]	12,5 [6,75; 17]

Полученные данные на 7-е сутки эксперимента демонстрируют большое количество фибробластов и фиброцитов в группе №1, при этом макрофагов, гранулоцитов и агранулоцитов отмечается наименьшее количество. При оценке уровня статистической значимости отличий по количеству фибробластов таковые были выявлены при сравнении группы №1 с остальными группами исследования. По количеству фиброцитов значимые отличия обнаружены между группами №1 и №3. По количеству макрофагов статистически значимые отличия между исследуемыми группами отсутствуют. По количеству гранулоцитов статистически значимые отличия не выявлены между группами №1 и №2, №3 и №4. По количеству агранулоцитов статистически значимые отличия выявлены между группами №1 и №2, №2 и №3, 4 соответственно (рисунок 41).

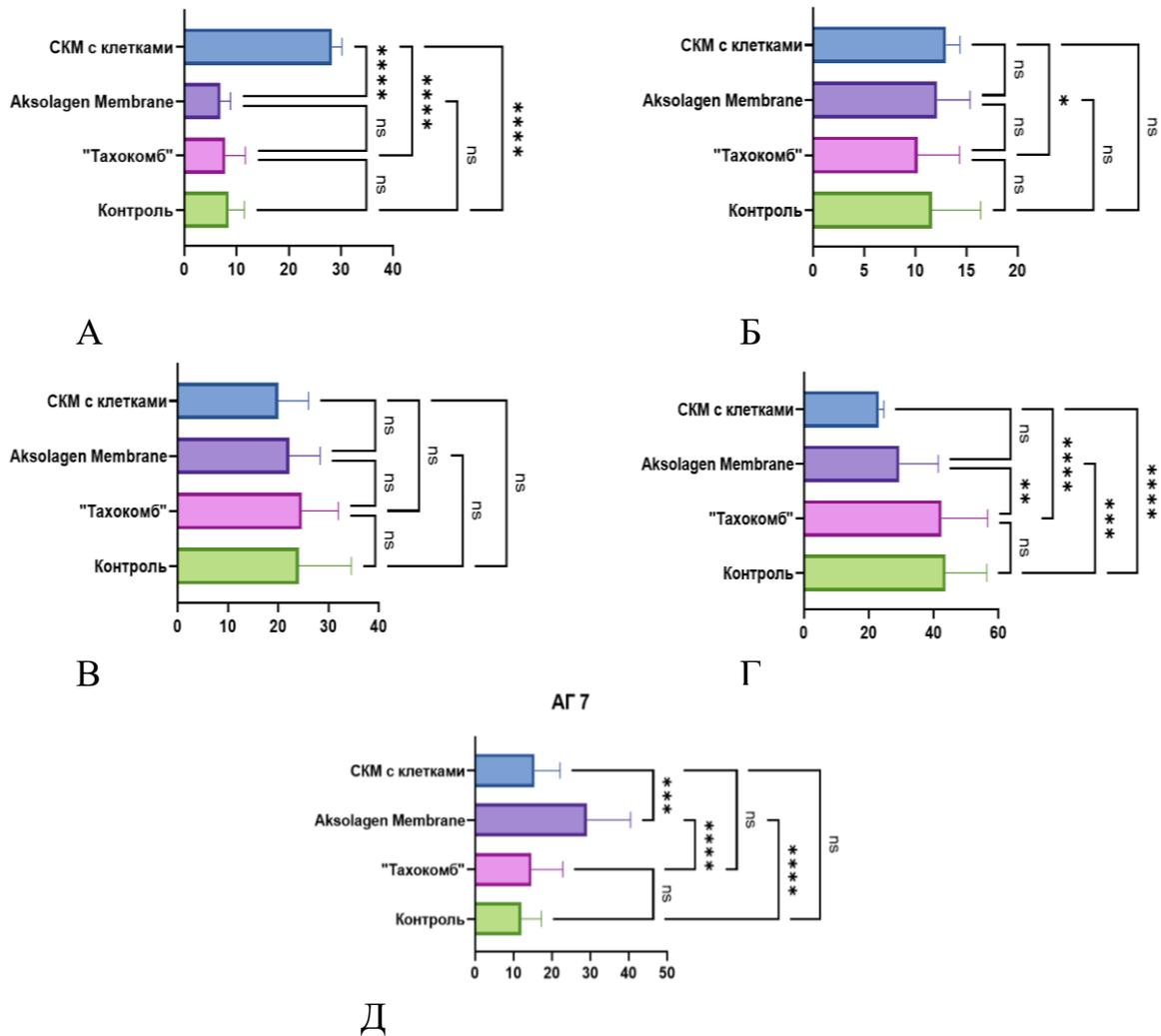
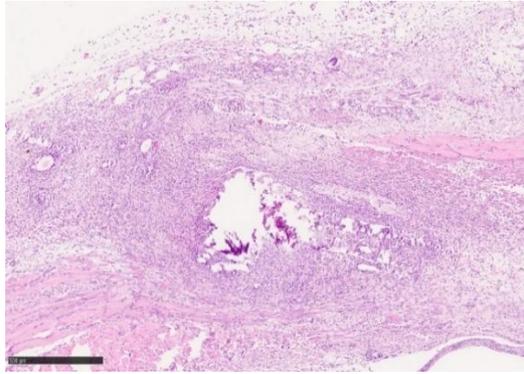


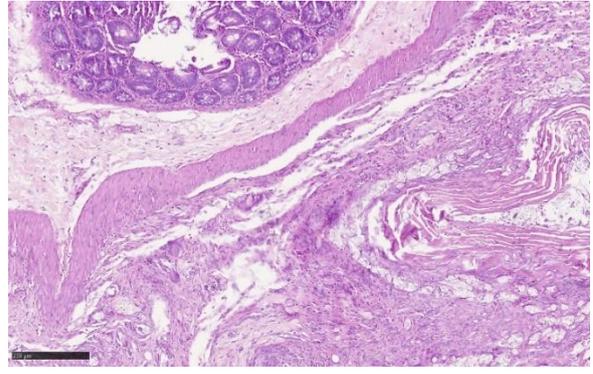
Рисунок 41 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 7-е сутки после наложения однорядного узлового шва слепой кишки:
 А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;
 Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

При гистологическом изучении аутопсийного материала, полученного после прошивания кишки однорядным узловым швом, на 15-е сутки эксперимента в контрольной группе вокруг шовного материала продолжает оставаться выраженная клеточная фильтрация, вокруг которой образуется зрелая соединительная ткань. В группе «Тахокомб» в зоне наложения шва определяются остатки материала, гигантские многоядерные клетки, макрофаги с участками незрелой соединительной ткани. При имплантации Aksolagen Membrane в зоне наложения шва визуализируется зрелая,

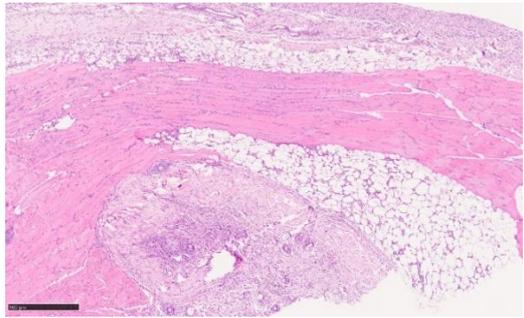
новообразованная соединительная ткань. При использовании скаффолда СКМ, колонизированного фибробластами в зоне шва также визуализируется, новообразованная зрелая ткань, состоящая из толстых коллагеновых волокон, с незначительной примесью клеток воспалительного ряда (рисунок 44).



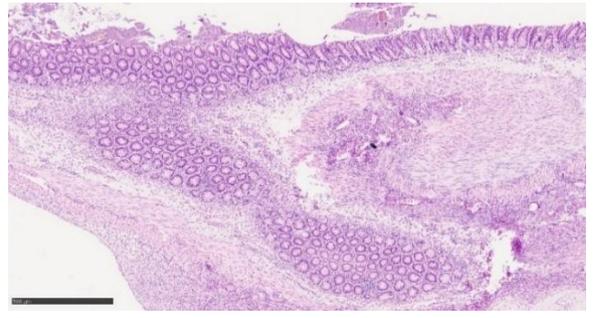
А



Б



В



Г

Рисунок 44 – Микрофотография морфологических изменений тканей после прошивания кишки однорядным узловым швом и последующем нанесении изучаемых образцов на 15-е сутки эксперимента. А - контроль. Б – Тахокомб. В – Aksollagen Membrane. Г – СКМ с клетками.

Окр. Г-Э, ув. х 100.

Количественный анализ клеточного состава аутоптата на 15-е сутки после введения животных в эксперимент представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала после наложения однорядного узлового шва на кишку на 15-е сутки, Me [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	23,5 [19; 23,25]	42,5 [34; 51,5]	12 [10; 14]	15 [9; 23]	7 [5; 8]
Aksolagen Membrane	16 [13,75; 17,5]	15 [14; 18]	17 [15,75; 18]	22 [19,75; 22]	30 [29; 31,5]
«Тахокомб»	10,5 [8,75; 13]	10 [9; 16]	17 [14; 19]	30,5 [27; 35]	32 [26,75; 35]
Контроль	11 [10; 14]	14,5 [8,75; 22,25]	7 [4; 8]	46,5 [35,75; 53]	22 [19; 24]

На 15-е сутки после выведения животных из эксперимента в группе №1 хорошо заметна динамика снижения количества фибробластов при увеличении числа фиброцитов, при этом количество гранулоцитов и агранулоцитов в данной группе сохраняется наименьшим.

При оценке статистической значимости отличий получены следующие результаты. По количеству фибробластов $p \leq 0,05$ во всех группах, за исключением групп №3 и №4. По концентрации фиброцитов высокую значимость отличий продемонстрировали образцы группы №1 относительно остальных групп исследования. По количеству макрофагов статистически значимые отличия не выявлены лишь между группами №2 и №3. По количеству гранулоцитов статистически значимые отличия определяются между всеми группами за исключением №1 и №2. Анализируя концентрацию агранулоцитов, статистически значимые отличия не выявлены лишь между группами №2 и №3 (рисунок 43).

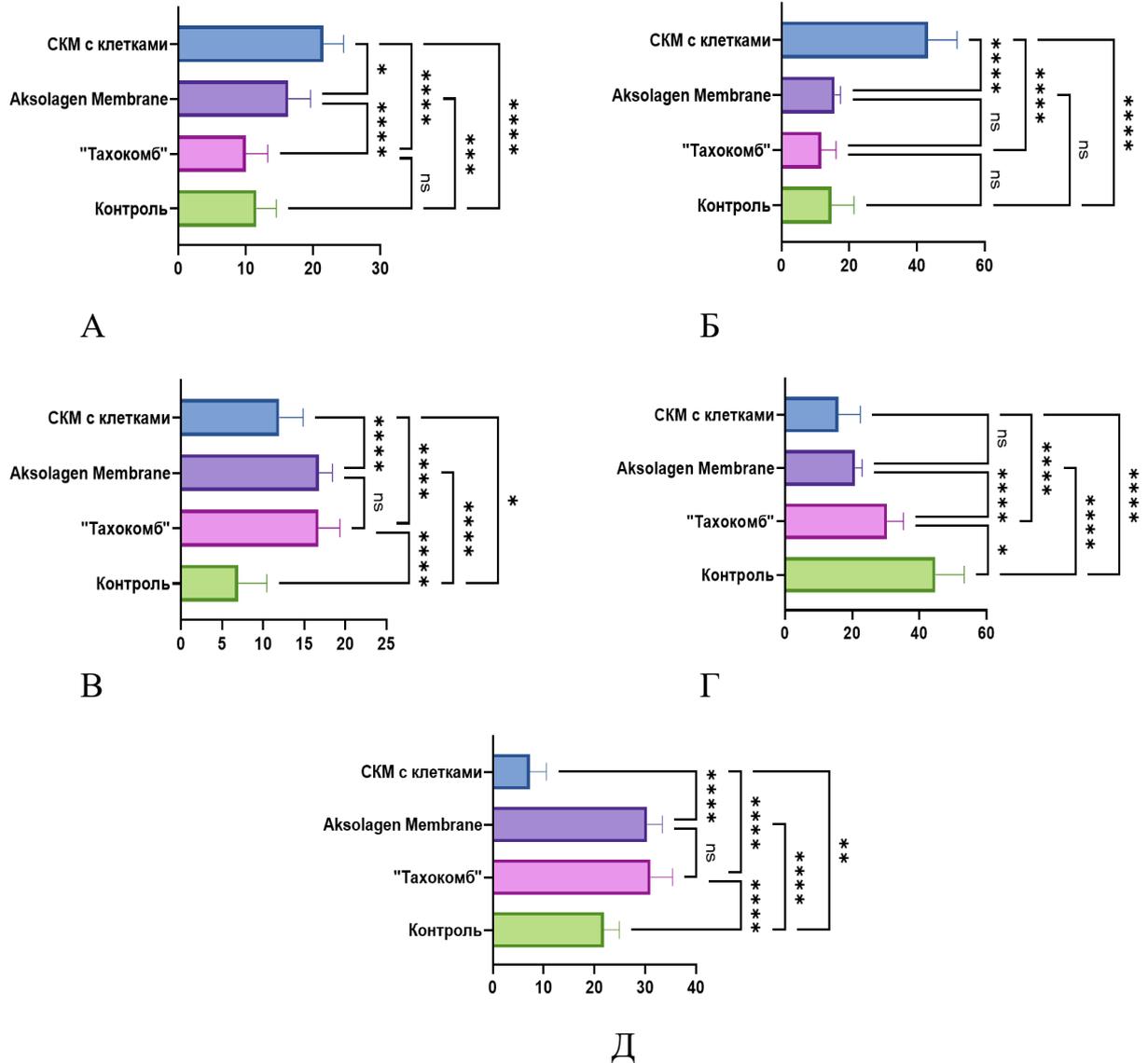


Рисунок 43 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 15-е сутки после наложения однорядного узлового шва слепой кишки:

А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;

Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

При морфологическом изучении аутопсийного материала, полученного после прошивания кишки однорядным узловым швом на 30 сутки эксперимента в контрольной группе, продолжает визуализироваться незрелая, соединительная ткань с образованием спаек. В группе «Тахокомб» в зоне его наложения происходит образование спаек, состоящих из рыхлой волокнистой ткани с полиморфноклеточной инфильтрацией. При использовании Aksolagen

Membrane и СКМ с клетками в зоне наложения шва происходит образование зрелой соединительной ткани без спайкообразования и воспалительных изменений (рисунки 44, 45).



А



Б



В



Г

Рисунок 44 – Макроскопическая картина изменений тканей после прошивания кишки однорядным узловым швом и последующем нанесении изучаемых образцов на 30-е сутки эксперимента в группах исследования:

А – группа контроля; Б – «Тахокомб»; В – Aksollagen Membrane;

Г – СКМ, заселенный дермальными аутофибробластами.

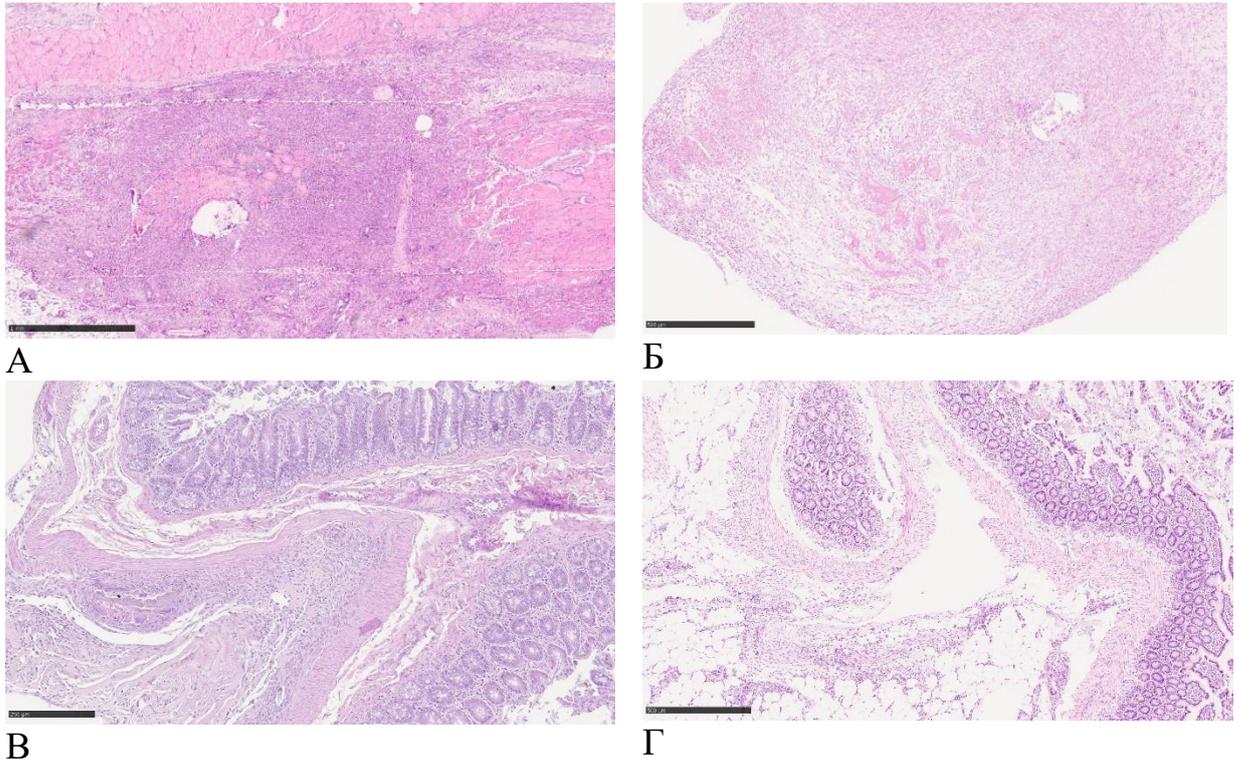


Рисунок 45 – Микрофотография морфологических изменений тканей после прошивания кишки однорядным узловым швом и последующем нанесении изучаемых образцов на 30-е сутки эксперимента. А - контроль. Б – Тахокомб. В – Aksollagen Membrane. Г – СКМ с клетками.

Окр. Г-Э, ув. х 100.

Количественный анализ клеточного состава аутоптата на 30-е сутки после выведения животных в эксперимент представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Сравнительный анализ клеточного состава аутопсийного материала после наложения однорядного узлового шва на кишку на 30-е сутки, Me [25; 75], %

Группа исследования	ФБ	ФЦ	М	Г	Аг
СКМ, колонизированный культурами фибробластов	22,5 [20; 26]	48 [39,5; 53]	17 [12; 22]	8 [5; 10]	4,5 [3; 6,25]

Продолжение таблицы 17.

Aksolagen Membrane	22,5 [20; 27]	21 [18; 24]	19 [18; 22]	19,5 [14,75; 25,5]	18 [14,75; 19]
«Тахокомб»	19 [17; 21]	20 [19; 21]	8 [8; 9]	9 [8; 9]	44 [40; 46]
Контроль	19 [16; 21]	12 [7,75; 20,25]	22 [19,75; 25]	25 [24; 28]	24 [16; 28]

Исходя из полученных данных, при имплантации на шов образцов группы №1 в препаратах выявляется максимальное количество фибробластов и фиброцитов, при этом отмечена наименьшая концентрация гранулоцитов и агранулоцитов. При оценке уровня статистической значимости отличий между исследуемыми группами получены следующие результаты. По количеству фибробластов значимые отличия выявлены между группами №1 и №№3, 4, между группами №2 и №№3, 4 ($p \leq 0,05$). По концентрации фиброцитов значимые отличия определены между группой №1 с остальными группами исследования. Сравнивая количество макрофагов, отличия с $p \leq 0,05$ определяются между группами №1 и №3, №2 и №3, а также группами №3 и №4. При изучении количества гранулоцитов статистическая значимость отличий выявлена между группами №1 и №2, №1 и №4, №2 и №3, а также №3 и №4. Анализируя концентрацию агранулоцитов в аутоптатах статистическая значимость отличий присутствует между всеми группами за исключением групп №2 и №4 (рисунок 46).

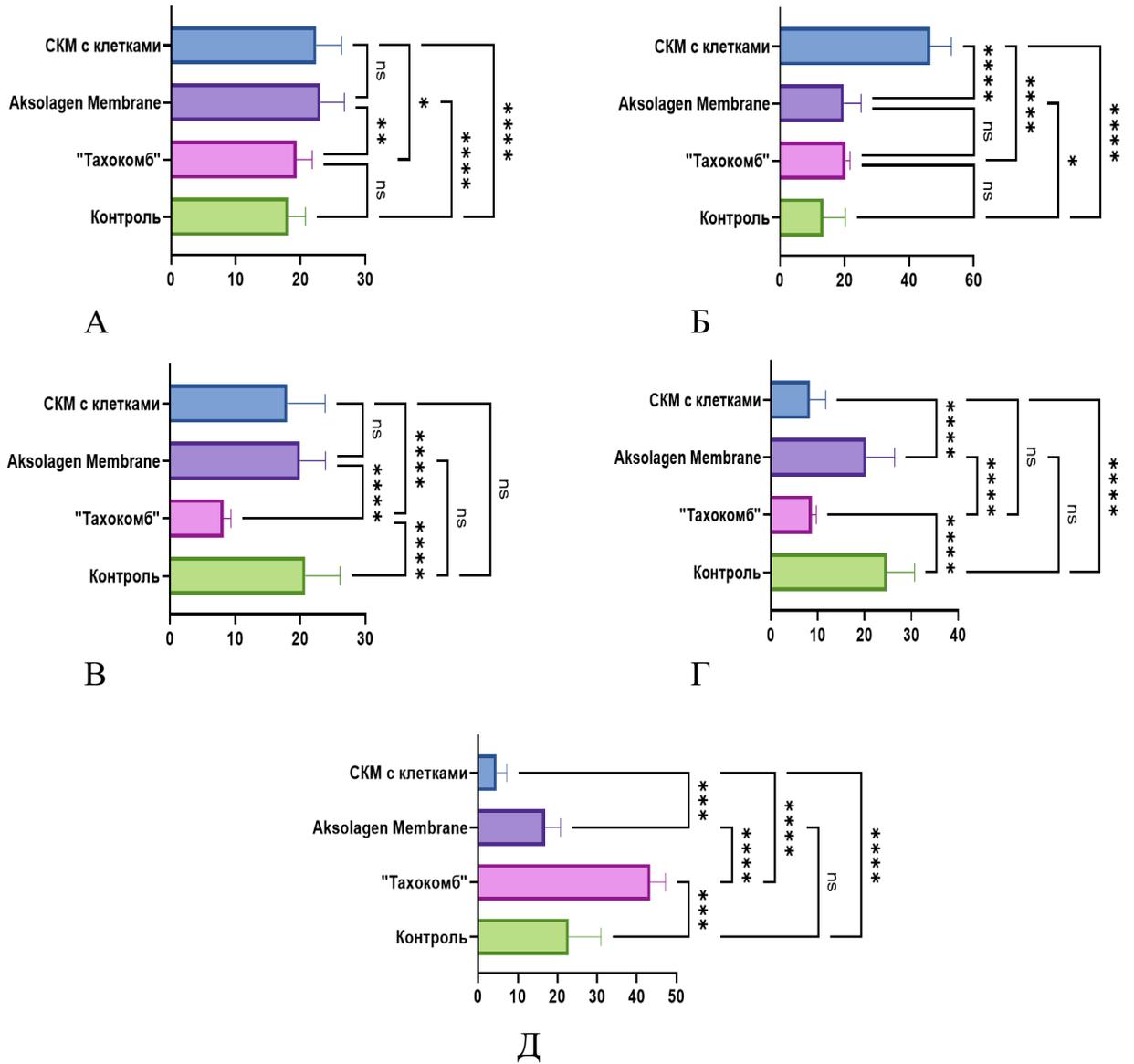


Рисунок 46 – Статистическая значимость отличий после аутопсии на 30-е сутки после наложения однорядного узлового шва слепой кишки:

А – фибробластов; Б – фиброцитов; В – макрофагов;

Г – гранулоцитов; Д – агранулоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подавляющее большинство хирургических вмешательств – более 7 миллионов ежегодно – приходится на операции на органах брюшной полости, причём их количество демонстрирует устойчивую тенденцию к росту. Данная динамика обусловлена совокупностью факторов, включая естественный прирост населения, что сопровождается увеличением заболеваемости абдоминальной хирургической патологией, повышение оперативной активности, появление нового оборудования и технологий, а также иммунодефицитные состояния, которые негативно влияют на процессы регенерации и многократно повышают риск инфекционных осложнений в послеоперационном периоде [12, 35, 94].

Процесс регенерации тканей органов брюшной полости сложен, а его нарушение может приводить к развитию серьёзных осложнений, таких как нагноение раны, дисфункция прооперированного органа, некроз, распространение гнойно-воспалительного процесса на прилегающие здоровые структуры, а также формированию спаек в брюшной полости. В связи с этим обеспечение оптимальных условий для быстрого и полноценного восстановления повреждённых тканей является одной из приоритетных задач современной хирургии, особенно у пациентов с сопутствующей патологией: пожилого и старческого возраста, с иммунодефицитными состояниями (в том числе ассоциированными с противоопухолевой терапией), хроническими заболеваниями, сопровождающимися эндотелиальной дисфункцией, а также после обширных оперативных вмешательств, включая резекции или удаление органов [40, 88].

Особую актуальность приобретает также проблема реконструкции утраченных анатомических структур – таких как холедох, участки брюшины, стенки полых органов брюшной полости и забрюшинного пространства [40, 88].

Несмотря на широкий арсенал существующих методов и средств, направленных на стимуляцию регенерации, интерес к данной проблеме остаётся высоким, что обусловлено рядом нерешённых вопросов. В частности, отсутствуют ранозаживляющие препараты с программируемым профилем действия, а также практически не реализован персонализированный подход к ведению пациентов в послеоперационном периоде. Среди существующих стратегий выделяют биологические, химические и физические методы индукции регенерации.

Наиболее распространённым биологическим агентом, а основе которого изготавливают лекарственные средства и изделия медицинского назначения является коллаген. На его основе обосновано изготовление трёхмерного матрикса, которым можно укрыть раневой дефект. Такое изделие создает благоприятные условия для активации местного иммунного ответа, пролиферации и миграции гранулоцитов, макрофагов и фибробластов, улучшения транспорта факторов роста и инициации ангиогенеза. В процессе заживления этот биоматериал постепенно и направленно замещается собственной соединительной тканью организма, предотвращая формирование избыточной или дезорганизованной грануляционной ткани, что способствует ускорению заживления и восстановлению нормальной тканевой архитектуры.

Перспективным направлением является использование коллагенового матрикса, заранее заселенного аутологичными фибробластами. Такой подход позволяет значительно повысить эффективность ранозаживляющей терапии, реализовать принципы персонализированной медицины и обеспечить монотерапевтическое воздействие при лечении спаечной болезни брюшины за счёт применения методов тканевой инженерии, а такжекратно усилить стимуляцию факторов роста, при этом предотвращая инфицирование имплантата [15, 59, 74].

В ходе диссертационного исследования была проведена комплексная работа, направленная на обоснование эффективности и безопасности применения полимерного матрикса, колонизированного дермальными

аутофибробластами, для восстановления повреждённого участка брюшины в эксперименте. Разработаны экспериментальные образцы полимерных матриц, которые были подвергнуты сравнительному анализу с изделиями, аналогичными по составу и области применения. Выполнено сравнительное изучение физико-механических и химических свойств, а также структуры разработанных образцов матриц. В ходе исследования была подтверждена возможность применения разработанных образцов на живых объектах согласно требованиям Государственной фармакопеи 15 издания от 20 июля 2023 года. Выявлено, что образец на основе коллагена морского происхождения с добавлением 10% глутарового альдегида не уступает, а по некоторым параметрам превосходит характеристики образцов на основе коллагена крупного рогатого скота и морского коллагена с добавлением альдегида щавелевой кислоты в качестве сшивающего агента. На данных этапах были исключены из эксперимента образцы, не удовлетворяющие требованиям к тканеинженерным конструкциям.

Доказано, что разработанный способ заполнения тканеинженерных конструкций культурами клеток является более рациональным, экономически эффективным в сравнении с имеющимися сейчас методиками. Изучены темпы биодegradации образцов и реакция тканей при подкожной имплантации полимерных матриц и на экспериментальных моделях. Проведены серии экспериментов *in vivo* на лабораторных животных (крысы линии Wistar), в ходе которых изучены биологические ткани животных. Результаты показали высокую эффективность матриц на основе коллагена морского происхождения, заполненного дермальными аутофибробластами. Во всех моделях, а также при подкожном размещении этих образцов обнаружено статистически значимо большее количество фибробластов и фиброцитов, причем динамика снижения первых с постепенным увеличением вторых говорит о созревании нормальной соединительной ткани, что подтверждается результатами описательной гистологии. Отдельного внимания заслуживает тот факт, что маркеры воспаления оставались невыраженными и таким

образом, очевиден улучшенный коллагеногенез и, соответственно, регенерация поврежденных тканей, а наличие культуры аутофибробластов еще сильнее стимулирует процессы регенерации, купируя воспаление

Таким образом, проведенное исследование позволило обосновать эффективность и безопасность применения разработанного полимерного матрикса для восстановления поврежденных участков брюшины, что открывает новые перспективы в области экспериментальной и клинической хирургии. Данный образец обладает следующими преимуществами: уникальное сырье – коллаген морского происхождения, обладающий лучшей биосовместимостью свойствами, чем коллаген КРС; матрикс заселен дермальными аутофибробластами, что стимулирует регенерацию тканей в зоне имплантации, при этом минимизируется риск инфицирования полотна; разработан собственный способ заселения клеточных культур на тканеинженерные 3D конструкции, который обеспечивает лучшую адгезию клеток и их выживаемость в толще матрикса, на которую также позитивно влияет пористая структура образца.

ВЫВОДЫ

1. Степень деформации образцов матриксов на основе коллагена КРС была на 8,11% ниже, чем в 1-й группе, и на 31,88% ниже, чем во 2-й группе. Сорбционная способность единицы массы в этой же группе в 7,2 раза выше, чем в 1-й группе и в 18,22 раза выше, чем во 2-й группе. Сорбционная способность единицы объёма в группе СККРС была в 4 раза выше, чем в 1-й группе и в 7,88 раз выше, чем во 2-й группе. Степень адгезии образцов СКМ с добавлением глутарового альдегида в 1,32 раза выше, чем во 2-й группе, и в 1,09 раз выше, чем в 3-й группе. Уровень pH образцов СККРС был в 1,12 раз выше, чем в 1-й группе, и в 1,17 раз выше, чем во 2-й группе;

2. Диаметр пор СК КРС в 1,5 раза больше, чем у СК ГЛИО и в 5,4 раза выше, чем у СК ГА ($p \leq 0,05$). Толщина волокон матриксов СК ГА в 2 раза больше, чем у СК КРС и в 1,9 раз выше, чем у СК ГЛИО ($p \leq 0,05$);

3. Разработан способ заполнения матриксов культурами фибробластов (приоритет по заявке № 2025107800 от 31.03.2025 г. на выдачу Патента РФ на изобретение), получены косвенные признаки высоких темпов роста культур клеток: 7-е сутки после эксперимента в 1,3 раза выше, чем после имплантации образца без фибробластов, на 15-е сутки эта разница возрастает до 1,4 раз и к 30-м суткам до 1,5 раз;

4. В результате применения СКМ, заполненного культурами дермальных аутофибробластов, очевидны ускоренный коллагеногенез, улучшенная регенерация поврежденных тканей, а добавление клеток этого же организма усиливает репаративные процессы, купируя воспаление;

5. После подкожной имплантации на 7-е сутки в группе СКМ, заполненной культурами фибробластов, количество последних в 1,3 раза выше, чем в группе неприкondиционированного СКМ и в 2,17 раз больше, чем в группе СККРС. К 30-м суткам в преkondиционированной фибробластами группе их количество в 1,5 раза больше, чем в СКМ и в СККРС. Количество

гранулоцитов на 7-е сутки в группе с внесенными клетками в 1,25 раза меньше, чем в остальных группах. К 30-м суткам в группе СКМ с клетками было в 3 раза меньше, чем в группе без клеток, а также в 4 раза меньше, чем в группе СККРС;

б. На 30-е сутки в группе №1 при повреждении брюшины количество фиброцитов в 1,6 раз выше, чем в группе №2, в 4,46 раз выше, чем в группе №3 и в 4,06 раз выше, чем в группе №4. На модели повреждения кишки на 30-е сутки в группе №1 количество фиброцитов в 1,54 раза выше, чем в группах №2 и №3, в 2,11 раз выше, чем в группе №4. При укрытии однорядного узлового шва на слепой кишке в группе №1 количество фиброцитов в 2,29 раз выше, чем в группе №2, в 2,4 раза выше, чем в группе №3 и в 4 раза выше, чем в группе №4.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предложенный полимерный матрикс на основе коллагена морского происхождения с добавлением глутарового альдегида в качестве сшивающего агента и технологию его получения рекомендовать для основы изготовления индивидуального биомедицинского клеточного препарата для нужд хирургии.

2. Разработанный новый способ заполнения 3D конструкции колониями клеточных культур может быть использовать как для дальнейшей разработки персонализированных биополимерных клеточных препаратов, так и для применения в условиях клиник, на базе которых есть цитологический кластер.

3. Алгоритмы всестороннего изучения полимерных матриксов применять для интегральной оценки эффективности и безопасности новых тканеинженерных конструкций на доклиническом этапе.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты, полученные в рамках выполненного исследования, являются предпосылкой к развитию нового научного направления, главной задачей которого представляется разработка научно обоснованного персонализированного подхода к лечению пациентов, получивших ранение полых органов брюшной полости и тубулярных структур (сосуды, протоки и др.). В дальнейшем, добавление слоев морфологически различных клеток (миоцитов, эпителиоцитов и др.) возможно полное замещение поврежденных или резецированных тканей органа с полным сохранением его функции.

С учетом полученных данных открывается перспектива разработки ассортимента средств для отдельных хирургических отраслей с учетом технической специфики и клинических потребностей. Немаловажно разработать технологию управления параметрами изделия в процессе его изготовления и его влияния на клеточные культуры. Помимо этого, перспективным является, поиск новых полимерных основ для тканеинженерных конструкций. Рациональным представляется необходимость продолжения исследований по изучению и применению новых тканеинженерных конструкций, а также методологических наборов для комплексного анализа их эффективности и безопасности в условиях доклиники.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаев, Ю. К. Расстройство заживления ран и методы их коррекции / Ю.К. Абаев // Вестник хирургии имени И.И. Грекова. – 2005. – № 1. – С. 111-113.
2. Агейкин, А. В. Изготовление 3D-скаффолдов методом двухфотонной полимеризации (2PP) из различных видов PLA-материала для создания биоинженерных тканевых конструкций / А. В. Агейкин, В. А. Темников, А. Ю. Тычков // Биотехносфера. – 2016. – № 2(44). – С. 2-6.
3. Анализ перфузионных свойств скаффолда / П. М. Ларионов, Н. А. Маслов, Е. О. Папаева [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – № 3. – С. 64-70.
4. Андреев, Д. Ю. Современные раневые покрытия. Часть II / Д. Ю. Андреев, Б. А. Парамонов, А. М. Мухтарова // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2009. – Т. 168, № 4. – С. 109-112.
5. Арсентьева, Н. И. Разработка клеточных биотехнологий и опыт их применения при патологиях в эксперименте / Н. И. Арсентьева, М. А. Макарова, М. Л. Арсентьева // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2015. – № 3(103). – С. 79-89.
6. Аутогенные фибриновые матрицы: перспективы использования в хирургии / С. А. Епифанов, С. А. Матвеев, П. Е. Крайнюков [и др.] // Гены и клетки. – 2021. – Т. 16, № 2. – С. 71-74.
7. Белоусов, М. В. Скаффолд технологии для управления клеточными системами в приложении к реконструктивной и регенеративной медицине : аналитический доклад / М. В. Белоусов, И. А. Хлусов, А. Е. Полухина. – Томск : Изд-во СибГМУ, 2022. – 59 с.
8. Бесклеточная матрица на основе хитозана с повышенными хондроиндуктивными свойствами / В. В. Новочадов, П. С. Семенов,

М. П. Лябин [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2013. – № 1. – С. 238.

9. Биодegradуемые матрицы из регенерированного шелка *Bombyx mori* / И. И. Агапов, М. М. Мойсенович, Т. В. Васильева [и др.] // Доклады Академии наук. – 2010. – Т. 433. – № 5. – С. 699-702.

10. Биодобавки на основе коллагена в полимерных композиционных материалах / А. Б. Балданов, Л. А. Бохоева, Д. В. Шалбуев [и др.] // Нанотехнологии в строительстве: научный интернет-журнал. – DOI 10.15828/2075-8545-2022-14-2-137-144. – 2022. – Т. 14. – № 2. – С. 137-144.

11. Биокomпозитные матрицы из фиброина шелка и наногидроксиапатита для регенерации костной ткани / И. И. Агапов, М. М. Мойсенович, Т. В. Дружинина [и др.] // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 440. – № 6. – С. 830-833.

12. Биопластический коллагеновый материал «Коллост» при лечении ожоговой травмы / Л. И. Будкевич, Г. В. Мирзоян, Р. Б. Габитов [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2020. – № 12 (1). – С. 92-97.

13. Биорезорбируемые коллагеновые материалы в хирургии: 50 лет успеха / А. Л. Файзуллин, А. Б. Шехтер, Л. П. Истранов [и др.] // Сеченовский вестник. – DOI 10.47093/2218-7332.2020.11.1.59-70. – 2020. – Т. 11, № 1. – С. 59-70.

14. Биорезорбция пористых 3D матриц на основе коллагена в печени и мышечной ткани / П. В. Попрядухин, Г. Ю. Юкина, И. П. Добровольская [и др.] // Цитология. – 2017. – Т. 59, № 9. – С. 609-616.

15. Боброва, М. М. Биологические и механические свойства децеллюляризованной ткани печени / М. М. Боброва, Л. А. Сафонова, О. И. Агапова // XXVII Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико химической биологии и биотехнологии» : сборник тезисов, Москва, 8-11 февраля 2016 г. – Москва, 2016. – С. 163.

16. Боброва, М. М. Использование технологии децеллюляризации для создания искусственных органов и тканей / М. М. Боброва // XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2014»: тезисы докладов, Москва, 7–11 апреля 2014 г. – Москва, 2014. – С. 24-25.

17. Борзенко, С. А. Обоснование выбора биополимерных материалов для конструирования 3D матрицы искусственной роговицы / С. А. Борзенко, А. А. Желтоножко, Ю. А. Комах // Вестник офтальмологии. – 2015. – № 131 (4). – С. 94-96.

18. Бронникова, И. И. Биодegradация скаффолдов на основе естественных биополимеров / И. И. Бронникова, М. Н. Егорихина // Биосистемы: организация, поведение, управление : тезисы докладов 71 й Всероссийской с международным участием школы конференции молодых учёных, Нижний Новгород, 17-20 апреля 2018 г. – Нижний Новгород : Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 2018. – С. 42.

19. Бызова, А. Н. Скаффолды на основе природных и синтетических полимеров, полученные методом лиофильной сушки / А. Н. Бызова, Ю. А. Нащекина // Гены и Клетки. – 2020. – Т. 15, № S3. – С. 44.

20. Вахрушев, И. В. Тканевая инженерия кости путём трансплантации заселённых мезенхимальными стволовыми клетками скаффолдов / И. В. Вахрушев, Н. В. Ярыгин, К. Н. Ярыгин // Инновационная хирургия. – 2013. – № 1. – С. 48-53.

21. Венедиктов, А. А. Разработка метода получения внеклеточного матрикса на основе ксеноперикардальной ткани и оценка его свойств / А. А. Венедиктов, В. К. Фуки, М. Т. Генгин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2013. – № 4 (27). – С. 12-25.

22. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесённого на полилактидную матрицу /

Ю. А. Швед, Л. В. Кухарева, И. М. Зорин [и др.] // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 1. – С. 32-39.

23. Виды ран. Процесс заживления ран. Виды заживления ран [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.hartmann.info/ru-ru/our-solutions/1/ru/wounds-kind-of-wounds> (дата обращения: 05.12.2022).

24. Волков, А. В. Синтетические материалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии / А. В. Волков // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2015. – № 2. – С. 43-45.

25. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Красноярск : ИПК СФУ, 2014. – 262 с.

26. Гепатоспецифический мелкодисперсный матрикс как важный компонент имплантируемых клеточно инженерных конструкций вспомогательной печени / Н. А. Онищенко, М. Е. Крашенинников, М. Ю. Шагидулин [и др.] // Гены и Клетки. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 54-60.

27. Готье, С. В. Коррекция хронической печёночной недостаточности при трансплантации клеток печени в виде суспензии и клеточно инженерных конструкций (экспериментальное исследование) / С. В. Готье // Вестник РАМН. – 2018. – № 4. – С. 44-51.

28. Децеллюляризация ткани печени как перспективная технология получения пористого матрикса для тканевой инженерии и регенеративной медицины / М. М. Боброва, Л. А. Сафонова, О. И. Агапова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 6-13.

29. Децеллюляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца / А. С. Сотниченко, Е. А. Губарева, И. В. Гилевич [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 86-94.

30. Егорихина, М. Н. Использование компонентов крови в тканевой инженерии / М. Н. Егорихина // Сибирское медицинское образование. – 2018. – № 3. – С. 14-23.
31. Зимон, А. Д. Адгезия плёнок и покрытий / А. Д. Зимон. – Москва : Химия, 1977. – 352 с.
32. Иванов, А. Н. Барьерная функция эндотелия, механизмы её регуляции и нарушения / А. Н. Иванов, Д. М. Пучиньян, И. А. Норкин // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т. 46, № 2. – С. 72-96.
33. Иванов, А. Н. Возможности и перспективы использования скаффолд технологий для регенерации костной ткани / А. Н. Иванов, И. А. Норкин, Д. М. Пучиньян // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 8. – С. 543-548.
34. Иванов, А. Н. Возможности и перспективы использования скаффолд технологий для регенерации костной ткани / А. Н. Иванов, И. А. Норкин, Д. М. Пучиньян // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 8. – С. 543-548.
35. Иванов, А. Н. Роль эндотелиальных клеток в ангиогенезе / А. Н. Иванов, Д. М. Пучиньян, И. А. Норкин // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136, № 5. – С. 491-505.
36. Иванов, А. Н. Сравнительный анализ перфузии и динамики маркеров острой фазы воспалительной реакции при имплантации матриц на основе поликапролактона и гидроксиапатита / А. Н. Иванов, М. Н. Козадаев, С. В. Белова // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 4. – С. 15.
37. Иванов, А. Н. Структурные особенности эндотелиальных клеток млекопитающих и человека / А. Н. Иванов, И. О. Бугаева, М. О. Куртукова // Цитология. – 2016. – Т. 58, № 9. – С. 657-665.
38. Иванов, А. С. Ксенопластика в реконструктивной хирургии сердца и сосудов / А. С. Иванов, В. А. Иванов, Г. М. Балоян // Биопротезы в сердечно сосудистой хирургии : материалы Всероссийской конференции с международным участием. – 2015. – № 2. – С. 41-43.

39. Иванова, С. Ф. Особенности использования биополимера коллагена для разработки материалов медицинского назначения / С. Ф. Иванова // Актуальные вопросы медицины XXI века : сборник статей Международной научно практической конференции, Уфа, 04 марта 2014 г. / отв. ред. А. А. Сукиасян. – Уфа : Башкирский государственный университет, 2014. – С. 27-29.

40. Изучение морфологических и биodeградируемых свойств пористого скаффолда желатина для использования в тканевой инженерии лёгких / А. А. Яценко, В. А. Кушнарeв, Д. В. Леонов [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2019. – № 72. – С. 66-72.

41. Изучение ранозаживляющего действия коллагеновой матрицы / Т. Б. Тумурова, Д. В. Шалбуев, С. Н. Лебедева [и др.] // Биотехнология в интересах экологии и экономики Сибири и Дальнего Востока : материалы V Всероссийской научно практической конференции, Улан Удэ, 25-27 июня 2018 года. – Улан Удэ : Восточно Сибирский государственный университет технологий и управления, 2018. – С. 69-73.

42. Илизаров, Г. А. Бескровный компрессионно дистракционный остеосинтез при лечении ложных суставов плечевой кости / Г. А. Илизаров, В. И. Шевцов // Военно медицинский журнал. – 2014. – Т. 295, № 6. – С. 27-31.

43. Использование компонентов экстрацеллюлярного матрикса для создания биоактивного скаффолда / П. С. Еремин, П. А. Марков, И. Р. Гильмутдинова [и др.] // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2022. – Т. 99, № 32. – С. 73.

44. Исследование микро и наноструктуры биосовместимых матриксов из регенерированного фиброина *Bombux mori* методом сканирующей зондовой нанотомографии / А. Е. Ефимов, М. М. Мойсенович, А. Г. Кузнецов [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2014. – Т. 9, № 11–12. – С. 68-72.

45. Исследование наноструктурных и адгезионных свойств альгинатных клеточных микроносителей / О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, М. М.

Боброва, Л. А. Сафонова, И. И. Агапов // VIII Всероссийский съезд трансплантологов : материалы съезда, Москва, 27-29 июня 2016 г. – Москва, 2016. – С. 182.

46. Исследования биосовместимости матриц на основе поликапролактона и гидроксиапатита в условиях *in vivo* / А. Н. Иванов, М. Н. Козадаев, Н. В. Богомолова [и др.] // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 4. – С. 286-293.

47. Карасев, М. М. Новейшие достижения фармацевтической разработки, основанные на использовании коллагена / М. М. Карасев, М. А. Редина, О. В. Белоусова // Фармация и фармакология. – 2015. – № 5. – С. 12-17.

48. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы / М. А. Садовой, П. М. Ларионов, А. Г. Самохин [и др.] // Хирургия позвоночника. – 2014. – № 2. – С. 79-86.

49. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы / М. А. Садовой, П. М. Ларионов, А. Г. Самохин [и др.] // Хирургия позвоночника. – 2014. – № 2. – С. 79-86.

50. Клеточные технологии для регенеративной медицины / Г. П. Пинаев, М. С. Богданова, А. М. Кольцова (ред.). – Санкт Петербург : Издательство Политехнического университета, 2011. – 332 с.

51. Клинико-морфологическая оценка эффективности разработанного способа местного лечения локальных поверхностных ожогов / А. В. Толстов, И. В. Новиков, И. В. Подсевалова [и др.] // Наука и инновации в медицине. – 2020. – № 5 (4). – С. 283–287.

52. Клинические возможности применения аутогенных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани при лечении пациентов с трофическими язвами нижних конечностей / Е. В. Баранов, С. И. Третьяк, И. Б. Василевич [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 79–84.

53. Ковылин, Р. С. Современные пористые полимерные имплантаты: получение, свойства, применение / Р. С. Ковылин, Д. А. Алейник, И. Л. Федюшкин // Высокомолекулярные соединения. – DOI 10.31857/S2308114721010039. – Серия С. – 2021. – Т. 63, № 1. – С. 33-53.
54. Коллаген и его применение при лечении ран / А. П. Остроушко, А. А. Андреев, А. Ю. Лаптиёва [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2021. – Т. 14, № 1. – С. 85-90.
55. Коллагеновые биоматрицы в реконструктивной урологии / А. А. Камалов, В. И. Кирпатовский, Д. А. Охоботов [и др.] // Урология. – 2015. – № 2. – С. 103-106.
56. Комбинированные методы исследования структуры материалов / А. Б. Юрьев, Ю. А. Рубанникова, В. Е. Громов, Ю. Ф. Иванов. – Новокузнецк : Сибирский государственный индустриальный университет, 2020. – 116 с. – ISBN 978-5-7806-0546-1.
57. Корель, А. В. Тканеинженерные стратегии для восстановления дефектов костной ткани. Современное состояние вопроса / А. В. Корель, С. Б. Кузнецов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. – № 4. – С. 228-234.
58. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор) / Д. С. Кузнецова, П. С. Тимашев, В. Н. Баграташвили [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6. – №4. – С. 201-212.
59. Лебедева, А. И. Основные тенденции создания композитных 3D-скаффолдов на основе поликапролактона и гидроксиапатита / А. И. Лебедева, Е. В. Мараева // Наука настоящего и будущего. – 2021. – Т. 1. – С. 98-101.
60. Липатов, В. А. Исследование физических и химических свойств губчатых аппликационных гемостатических материалов / В. А. Липатов, С. В. Лазаренко, Д. А. Северинов // Медицина экстремальных ситуаций. – 2020. – № 22 (2). – С. 214-222.

61. Макрофаги M1/M2: происхождение, фенотип, способы получения, взаимодействие с естественными киллерами и трофобластом / А. С. Жгулева, М. С. Зементова, С. А. Сельков [и др.] // Медицинская иммунология. – DOI 10.15789/1563-0625-ММО-2877. – 2024. – Т. 26, № 3. – С. 425-448.

62. Матрицы для тканевой инженерии, полученные методом децеллюляризации / А. А. Кокорина, М. О. Соколова, Л. П. Сигарева [и др.] // Известия Российской военно-медицинской академии. – 2020. – Т. 39, № S3-1. – С. 45-48.

63. Мельникова, Е. В. От клеточных технологий к биомедицинским клеточным продуктам: опыт использования препаратов на основе жизнеспособных клеток человека в Российской Федерации / Е. В. Мельникова // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 4. – С. 231-240.

64. Михайлова, И. Ю. Исследование гигроскопичности минеральных удобрений в учебной лаборатории / И. Ю. Михайлова, А. В. Саввина // Общество, наука, инновации. – 2016. – № 1. – С. 364-372.

65. Многофункциональные биоразлагаемые тканезамещающие материалы / Т. С. Серёгина, В. В. Мендруль, Е. В. Ивановская [и др.] // Успехи в химии и химической технологии. – 2019. – № 33 (212). – С. 26-28.

66. Мойсенович, М. М. Композитные матриксы на основе фиброина шелка, желатина и гидроксиапатита для регенеративной медицины и культивирования клеток в трехмерной культуре / М. М. Мойсенович, А. Ю. Архипова, А. А. Орлова // Acta Natur. – 2014. – Т.6. № 1(20). – С. 103-109.

67. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс / Е. А. Губарева, А. С. Сотниченко, И. В. Гилевич [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т.7. – № 4. – С. 20-28.

68. Морфология коллагеновых матриксов для тканевой инженерии в урологии (биосовместимость, биодеградация, тканевая реакция) /

А. Б. Шехтер, А. Е. Гуллер, Л. П. Истранов [и др.] // Архив патологии. – 2015. – Т. 77. – №. 6. – С. 29-38.

69. Наноструктурные особенности контактов фибробластов и двухмасштабного биосовместимого полиуретанового матрикса / А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, Л. А. Сафонова [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2016. – Т. 11, № 11–12. – С. 116-119.

70. Новочадов, В. В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща / В. В. Новочадов // Вестник Волгоградского государственного университета. – 2013. – Т. 1, № 5. – С. 19-28.

71. Омелько, Н. А. Композитные матриксы для применения в травматологии и регенеративной медицине / Н. А. Омелько, Р. И. Халимов // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2022. – № 6. – С. 89-94.

72. Основные аспекты в применении скаффолд технологий для регенерации костной ткани / Е. С. Балабаева, Л. Р. Муртазина, Е. С. Ягупов [и др.] // International scientific news 2017 : XXVIII Международная научно практическая конференция, Москва, 22 декабря 2017 г. – Москва : Научный центр «Олимп», 2017. – С. 778-779.

73. Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мышцы линии NIH/3T3 на плёнках из бактериального сополимера поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерата) с различной шероховатостью поверхности / В. А. Сургученко, А. С. Пономарёва, А. Е. Ефимов [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 72-77.

74. Оценка возможности создания фибриновых скаффолдов, заселённых стволовыми клетками пульпы зуба, для замещения костных дефектов челюсти / Ю. А. Домбровская, Н. И. Енукашвили, А. В. Котова [и др.] // Трансляционная медицина. – DOI 10.18705/2311-4495-2020-7-1-59-69. – 2020. – Т. 7, № 1. – С. 59-69.

75. Оценка репаративной эффективности коллагеновых матриц на модели термического ожога / С. Н. Лебедева, А. А. Тыхеев, Д. В. Шалбуев [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2022. – Т. 7, № 1. – С. 220-231.

76. Оценка эксплуатационных свойств губчатых аппликационных гемостатических материалов *in vitro* / Д. А. Северинов [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 139-149.

77. Пат. № 2715639 Российская Федерация, МПК С14С 1/00 (2006.01), А23J 1/10 (2006.01), С07К 14/78 (2006.01). Способ получения биоактивного коллагенового продукта / Д. В. Шалбуев, Т. Б. Тумурова; патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Малое инновационное предприятие «ЭКОМ»». – № 2019121295; заявл. 04.07.2019; опубл. 02.03.2020, Бюл. № 7.

78. Патент № 2665155 С1 Российская Федерация, МПК А61К 47/00, А61К 9/52. Способ доставки биологически активных веществ в скаффолд : № 2018100730 : заявл. 10.01.2018 : опубл. 28.08.2018 / Г. Я. Левин, М. Н. Егорихина, Л. Н. Соснина [и др.] ; заявитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

79. Патент № 2821401 С1 Российская Федерация, МПК С07К 14/78, С08К 5/07, А61L 27/24. Способ получения пористого коллагенового матрикса на основе морского коллагена с использованием глутарового альдегида : № 2023131023 : заявл. 28.11.2023 : опубл. 24.06.2024 / Т. Н. Кудрявцева, А. С. Ванина, Е. В. Грехнева [и др.] ; заявитель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный университет», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

80. Патшина, М. В. Анализ мирового рынка биоматериалов с целью определения потенциальных возможностей сырья животного происхождения / М. В. Патшина, Р. А. Ворошилин, А. М. Осинцев // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51, № 2. – С. 270-289.

81. Перова, Н. В. Биополимерный гетерогенный гидрогель — инъекционный биodeградируемый имплантат / Н. В. Перова, В. И. Севастьянов // Практическая медицина. – 2014. – № 8. – С. 111-116.

82. Перспективные технологии 3D биопечати / Д. В. Леонов, Ю. А. Спирина, А. А. Яценко [и др.] // Цитология. – DOI 10.31857/S0041377121040064. – 2021. – Т. 63, № 4. – С. 309-321.

83. Перспективы и преимущества применения скаффолд технологий для регенерации костной ткани / Е. С. Балабаева, Е. С. Ягупов, Л. Р. Муртазина [и др.] // Актуальные вопросы научных исследований : сборник научных трудов по материалам XVII Международной научно практической конференции, Иваново, 15 декабря 2017 г. – Иваново : Индивидуальный предприниматель Цветков Алексей Александрович, 2017. – С. 39-42.

84. Перспективы и преимущества применения скаффолд технологий для регенерации костной ткани / А. А. Алхазов, Д. Я. Тяпкина, С. В. Кустодов [и др.] // Инновационный потенциал современной науки. – 2018. – С. 86–89.

85. Плёнки на основе фиброина шёлка для заживления полнослойной раны кожи у крыс / Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, О. И. Агапова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18, № 3. – С. 80-83.

86. Полимерные композиционные материалы: структура, свойства, технология / под ред. А. А. Берлина. – Санкт Петербург : Профессия, 2009. – 556 с.

87. Полимерные системы для контролируемого выделения биологически активных соединений / Л. И. Валуев, Т. А. Валуева, И. Л. Валуев [и др.] // Успехи биологической химии. – 2013. – № 43. – С. 307-309.

88. Применение биосовместимых композитных структур (скаффолдов) в онкологии / О. И. Кит, А. Ю. Максимов, И. А. Новикова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – DOI 10.21294/1814-4861-2022-21-1-130-136. – 2022. – Т. 21, № 1. – С. 130-136.

89. Применение клеточных матриц в тканевой инженерии и методы оценки их биосовместимости / Ж. М. Алпысбаева, С. А. Ворфоломеев, А. А. Зеленская [и др.] // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2016. – Т. 6, № 5. – С. 711.

90. Применение клеточных матриц в тканевой инженерии и методы оценки их биосовместимости / Ж. М. Алпысбаева, С. А. Ворфоломеева, А. А. Зеленская [и др.] // Бюллетень медицинских интернет конференций. – 2016. – № 6 (5). – С. 711.

91. Применение коллагенового скаффолда и амниотической мембраны с культивируемыми стволовыми клетками лимба для устранения лимбальной недостаточности: экспериментальное исследование / А. В. Безушко, А. С. Дубовиков, А. Н. Куликов [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – DOI 10.17238/PmJ1609-1175.2019.2.54-57. – 2019. – № 2(76). – С. 54-57.

92. Применение нативного коллагена в клинической практике / Е. В. Силина, В. А. Ступин, Л. С. Золотарёва [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2022. – Т. 7, № 1. – С. 229.

93. Пророкова, Н. П. Проблемы биоразлагаемых полимеров / Н. П. Пророкова // Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоёмкие технологии и материалы (SMARTEX). – 2013. – № 1. – С. 47-54.

94. Разработка и исследование биodeградируемых скаффолдов на основе полимолочной кислоты с модифицированной поверхностью / Р. О. Гуляев, С. И. Горенинский, К. С. Станкевич [и др.] // Высокие технологии в современной науке и технике : сборник научных трудов VI Международной научно технической конференции молодых учёных, аспирантов и студентов, Томск, 27-29 ноября 2017 г. – Томск : ТПУ, 2017. – С. 185.

95. Разработка наноструктурированного биопластического материала для комбустологии / И. Р. Гильмутдинова, Е. Ю. Костромина, Р. Д. Якупова, П. С. Еремин // Биотехнология. – DOI 10.21519/0234-2758-2020-36-4-65-68. – 2020. – Т. 36, № 4. – С. 65-68.
96. Разработка раневых покрытий для регенеративной медицины / И. С. Кудряшова, П. А. Марков, Е. Ю. Костромина [и др.] // Вестник восстановительной медицины. – 2021. – № 20 (6). – С. 84-95.
97. Рахматуллин, Р. Р. Биопластический материал для восстановительной и реконструктивной хирургии / Р. Р. Рахматуллин // Медицинские науки. – 2014. – № 3. – С. 11-33.
98. Реброва, О. Ю. Статистика анализа медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2013. – 312 с.
99. Регенеративное действие тканеинженерных конструкций на основе волокнисто пористого никелида титана / О. В. Кокорев, Г. Ц. Дамбаев, Е. С. Марченко [и др.] // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – DOI 10.52581/1814-1471/81/03. – 2022. – Т. 25, № 2 (81). – С. 25-37.
100. Результаты применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для реконструкции передней брюшной стенки в отдалённые сроки эксперимента / Р. М. Бадыров, Н. Т. Абаатов, М. М. Тусупбекова [и др.] // Наука и здравоохранение. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 24-35.
101. Рерих, В. В. Экспериментальные исследования биоактивности композитных материалов, перспективных для использования в травматологии и ортопедии: обзор литературы / В. В. Рерих, В. Д. Синявин // Травматология и ортопедия России. – 2021. – Т. 27, № 1. – С. 97-105.
102. Роль оксида азота в регуляции микроциркуляторного звена системы гемостаза (обзор литературы) / Е. В. Андронов, В. Ф. Киричук, А. Н. Иванов [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2007. – Т. 3. – № 3. – С. 39-44.

103. Саримсоков, А. А. Применение полимерных материалов в медицине / А. А. Саримсоков, А. Ж. Мирвохидова // Экономика и социум. – 2020. – № 2 (69). – С. 367-370.

104. Сафонова, Л. А. Биологические свойства плёнок из регенерированного фиброина шёлка / Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, О. И. Агапова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, № 3. – С. 6-13.

105. Севастьянов, В. И. Клеточно-инженерные конструкции в тканевой инженерии и регенеративной медицине / В. И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – № 4. – С. 127-130.

106. Семенычева Л. Л. Особенности формирования гибридных гидрогелевых скаффолдов на основе коллагена / Л. Л. Семенычева, В. О. Часова, М. Н. Егорихина // Современная химическая физика на стыке физики, химии и биологии. – 2021. – С. 275-275.

107. Семенычева, Л. Л. Олигомеры сополимеров рыбного коллагена как структурные элементы в скаффолд - технологиях / Л. Л. Семенычева, М. Н. Егорихина, Ю. Л. Кузнецова // Олигомеры-2022: Сборник трудов XIX Международной конференции по химии и физикохимии олигомеров. Тезисы докладов, Суздаль, 19-24 сентября 2022 года / Отв. редактор М. П. Березин. Том 2. – Москва-Суздаль-Черноголовка: Общество с ограниченной ответственностью «Сам Полиграфист». – 2022. – С. 179.

108. Сеницына, Т. Ю. Применение модифицированных коллаген ламининовых матриц для восстановления повреждённых кожных покровов / Т. Ю. Сеницына, А. О. Димитрова // Актуальные проблемы биомедицины 2020 : сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт Петербург, 2020 г. – Санкт Петербург, 2020. – С. 474-475.

109. Скаффолд для замещения дефектов кожи на основе естественных биополимеров / М. Н. Егорихина, Г. Я. Левин, Д. Я. Алейник [и др.] // Успехи

современной биологии. – DOI 10.7868/S0042132418030055. – 2018. – Т. 138, № 3. – С. 273-282.

110. Скаффолд как искусственная ниша для мезенхимальных стволовых клеток / М. Н. Егорихина, Д. Я. Алейник, Ю. П. Рубцова [и др.] // Гены и клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 82-83.

111. Скаффолд технологии в восстановительной медицине: история проблемы, современное состояние и перспективы применения / В. И. Никольский, К. И. Сергацкий, Д. П. Шеремет [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – DOI 10.17116/hirurgia202211136. – 2022. – № 11. – С. 36-41.

112. Скаффолд технологии в лечении атрофического ложного сустава ключицы / Д. В. Давыдов, М. А. Аль Ханих, Л. К. Брижань [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. – DOI 10.25881/20728255_2021_16_3_121. – 2021. – Т. 16, № 3. – С. 121–124.

113. Скаффолд технологии: актуальные аспекты апробации и применения в регенеративной медицине / Ю. А. Монастырло, Д. А. Тяпкина, Е. П. Грабенко [и др.] // Актуальные вопросы биомедицинской инженерии : сборник материалов VIII Всероссийской молодёжной научной конференции, Саратов, 26–28 ноября 2018 года. – Саратов : Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., 2018. – С. 183-186.

114. Скаффолды – носители лекарственных средств и биологических молекул для биоинженерии костной ткани / И. А. Хлусов, Е. Д. Порохова, Е. Г. Комарова [и др.] // Цитология. – DOI 10.31857/S0041377122030051. – 2022. – Т. 64, № 3. – С. 183-207.

115. Современные подходы инженерии костной ткани / И. А. Стамболиев, Ю. В. Гажва, С. Г. Ивашкевич [и др.] // Российский стоматологический журнал. – DOI 10.18821/1728-2802-2018-22-2-111-116. – 2018. – Т. 22, № 2. – С. 111-116.

116. Современные подходы к выбору ранозаживляющих средств / П. А. Федосов, В. А. Николаевский, Ю. Н. Чернов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № 4. – С. 41-48.
117. Современные подходы к классификации спаек и спаечной болезни брюшной полости / А. А. Андреев, А. А. Глухов, А. В. Черных [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – DOI 10.18499/2070-478X-2024-17-3-120-126. – 2024. – Т. 17, № 3 (64). – С. 120-126.
118. Современные представления о применении скаффолдов в регенеративной медицине (обзор литературы) / А. Н. Митрошин, М. Г. Фёдорова, И. В. Латынова [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2019. – № 2 (50). – С. 133-143.
119. Современные раневые покрытия в местном лечении ран различного генеза / Д. В. Шаблин, С. Г. Павленко, А. А. Евглевский [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 12 2. – С. 361-365.
120. Создание биоразлагаемых материалов с иммуномодулирующими свойствами / В. В. Лисина, К. С. Станкевич, С. И. Горенинский [и др.] // Химия и химическая технология в XXI веке : материалы XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных имени профессора Л. П. Кулёва, Томск, 29 мая - 1 июня 2017 г. – Томск : Изд-во ТПУ, 2017. – С. 260-261.
121. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани и перспективы его использования в травматологии и ортопедии / П. М. Ларионов, М. А. Садовой, А. Г. Самохин [и др.] // Хирургия позвоночника. – 2014. – № 3. – С. 77-85.
122. Соколова, А. И. Зависимость биологических свойств скаффолдов из фиброина шёлка и желатина от состава и технологии изготовления / А. И. Соколова, М. М. Боброва, Л. А. Сафонова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8, № 3. – С. 6-15.
123. Соловьева, О. Обзор матриц (scaffolds) для стволовых клеток / О. Соловьева // Эндодонтия Today. – 2010. – № 4. – С. 51-53.

124. Сравнительная оценка эксплуатационных свойств кровоостанавливающих аппликационных имплантов / А. А. Панов, В. А. Липатов, Д. А. Северинов [и др.] // Человек и его здоровье. – DOI 10.21626/vestnik/2021-4/03. – 2021. – Т. 24, № 4. – С. 17-23.

125. Стратегии выбора и использования скаффолдов в биоинженерии / А. А. Иванов, О. П. Попова, Т. И. Данилова [и др.] // Успехи современной биологии. – DOI 10.1134/S0042132419020042. – 2019. – Т. 139. – № 2. – С. 196-205.

126. Структура и стабильность композитных гелей на основе коллагена и карбоксиметилцеллюлозы / Ю. А. Нащекина, В. А. Консон, М. Ю. Сироткина [и др.] // Журнал технической физики. – DOI 10.21883/JTF.2022.12.53764.221-22. – 2022. – Т. 92. – № 12. – С. 1967-1972.

127. Структурные и механические особенности, биосовместимость, биодеградация и тканевая реакция на имплантацию коллагеновых скаффолдов для тканевой инженерии / А. В. Курков, А. Е. Гуллер, Л. П. Истранов [и др.] // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – № 5. – С. 132.

128. Тасекеев, М. С. Производство биополимеров как один из путей решения проблем экологии и АПК. Аналитический обзор / М. С. Тасекеев, Л. М. Еремеева // Национальный центр научно-технической информации. – 2017. – № 4. – С. 200.

129. Терских, В. В. Поляризация и асимметричное деление стволовых клеток / В. В. Терских, А. В. Васильев, Е. А. Воротеяк // Цитология. – 2007. – № 49. – С. 933–938.

130. Тихонович, З. А. Изучение гигроскопических свойств биополимеров / З. А. Тихонович // Химия. – 2020. – № 9. – С. 143–146.

131. Трёхмерный анализ микро и наноструктуры биоматериалов и клеток методом сканирующей зондовой крионанотомографии / А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, Л. А. Сафонова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19, № 4. – С. 78-87.

132. Характеристика мирового рынка клеточных технологий / В. Зорин, В. Р. Черкасов, А. И. Зорина, Р. В. Деев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 96-115.

133. Характеристика скаффолдов и технологии их изготовления для использования в регенеративной хирургии / К. И. Сергацкий, В. И. Никольский, Д. П. Шерemet [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2022. – № 3 (63). – С. 124-133.

134. Целых, И. О. Микрочастицы из децеллюляризованной печени для регенеративной медицины и тканевой инженерии / И. О. Целых, М. М. Боброва, Л. А. Сафонова // Материалы Международного молодёжного научного форума «Ломоносов 2017» / отв. ред. И. А. Алешковский, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов. – Москва : МАКС Пресс, 2017. – 1 электрон. опт. диск (DVD ROM); 12 см. – Систем. требования: ПК с процессором 486+; Windows 95; дисковод DVD ROM; Adobe Acrobat Reader. – 1186 Мб. – 9000 экз. – ISBN 978 5 317 05504 2.

135. Шагидулин, М. Ю. Получение тканеспецифического матрикса печени для тканевой инженерии / М. Ю. Шагидулин, Н. А. Онищенко, М. Е. Крашенинников [и др.] // II Национальный конгресс по регенеративной медицине : материалы конгресса, Москва, 3-5 декабря 2015 г. – Москва, 2015. – С. 201.

136. Штильман, М. И. Биоматериалы – важное направление биомедицинских технологий / М. И. Штильман // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2016. – № 5. – С. 4-15.

137. Экспериментальное обоснование создания гибридной матрицы и тканеинженерной конструкции на основе сетки из полигликолида и реконструированного коллагена с целью последующей заместительной уретропластики / П. В. Глыбочко, Ю. Г. Аляев, А. Б. Шехтер [и др.] // Урология. – 2015. – Т. 6. – С. 5-13.

138. Яременко, А. И. Возможности применения полимерной матрицы на основе хитозана для возмещения дефекта верхней челюсти. Экспериментальное исследование / А. И. Яременко, Д. Н. Суслов, А. В. Лысенко [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 5, ч. 2. – С. 259-261.

139. Aldana, A. A. Current advances in electrospun gelatin based scaffolds for tissue engineering applications / A. A. Aldana, G. A. Abraham // Int. J. Pharm. – 2017. – Vol. 523, № 2. – P. 441-453.

140. An overview of the prospects of extracting collagens from waste sources and its applications / T. Lutfee, N. F. Alwan, M. A. Alsaffar [et al.] // Chem. Pap. – 2021. – Vol. 75. – P. 6025-6033.

141. Asghari, F. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review / F. Asghari, M. Samiei, K. Adibkia [et al.] // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. – DOI: 10.3109/21691401.2016.1146731. – 2017. – № 45. – P. 185-192.

142. Badiavas, E. V. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing / E. V. Badiavas, M. Abedi, J. Butmarc [et al.] // J. Cell Physiol. – 2003. – Aug. – Vol. 196, № 2. – P. 245-250.

143. Badylak, S. F. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function / S. F. Badylak, D. O. Freytes, T. W. Gilbert // Acta Biomaterialia. – 2019. – № 5. – P. 1-13.

144. Badylak, S. F. Immune response to biologic scaffold materials / S. F. Badylak, T. W. Gilbert // Seminars in Immunology. – 2008. – Vol. 20, № 2. – P. 109-116.

145. Badylak, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material / S. F. Badylak // Biomaterials. – 2007. – Vol. 28, № 25. – P. 3587-3593.

146. Badylak, S. F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction / S. F. Badylak // Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2002. – Vol. 13, № 5. – P. 377-383.

147. Baranovsky, D. S. Acellular tracheal cartilaginous scaffold producing for tissue engineered constructs / D. S. Baranovsky, A. G. Demchenko // *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. – 2017. – Vol. 72, № 4. – P. 254-260.
148. Bartlett, R. D. Mechanical properties of the spinal cord and brain: Comparison with clinical grade biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine / R. D. Bartlett, D. Ele, R. Evans [et al.] // *Biomaterials*. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120303. – 2020. – № 258. – P. 120303.
149. Bhardwaj, N. Silk fibroin keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering / N. Bhardwaj, W. T. Sow, D. Devi, K. W. Ng, B. B. Mandal, N.-J. Cho // *Integrative Biology (Cambridge)*. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 53–63.
150. Bioengineered acellular dermal matrices for the repair of abdominal wall defects in rats / A. Mohsina, N. Kumar, A. K. Sharma [et al.] // *Hernia*. – 2015. – Vol. 19, № 2. – P. 219–229. – DOI: 10.1007/s10029-014-1308-7. – Epub 2014 Oct 2. – PMID: 25273384.
151. Biological mechanisms of chronic wound and diabetic foot healing: the role of collagen / V. A. Stupin, R. B. Gabitov, T. G. Sinelnikova [et al.] // *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. – 2018. – Vol. 19, № 4. – P. 373-382.
152. Brown, B. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix / B. Brown, K. Lindberg, J. Reing, D. B. Stolz, S. F. Badylak // *Tissue Engineering*. – 2016. – № 12. – P. 519-526.
153. Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity / Q. Zhang, S. Lv, J. Lu [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – № 76. – P. 94-101.
154. Chen, G. Scaffold design for tissue engineering / G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi // *Macromolecular Bioscience*. – 2002. – Vol. 2, № 2. – P. 67-77.
155. Chomchalao, P. Fibroin and fibroin blended three dimensional scaffolds for rat chondrocyte cultures / P. Chomchalao, S. Pongcharoen, M.

Sutheerawattananonda, W. Tiyaboonchai // *BioMedical Engineering Online*. – 2013. – Vol. 8. – P. 12-28.

156. Collagen based formulations for wound healing: a literature review / S. Sharma, V. K. Rai, R. K. Narang [et al.] // *Life Sciences*. – 2021. – 290 p.

157. Collagen fibril orientation instructs fibroblast differentiation via cell contractility / J. Sapudom, S. Karaman, B. C. Quartey [et al.] // *Advanced Science*. – DOI: 10.1002/advs.202301353. – 2023. – № 10. – P. e2301353.

158. Commercial extracellular matrix scaffolds for rotator cuff tendon repair / K. A. Derwin, A. R. Baker, R. K. Spragg [et al.] // *The Journal of Bone & Joint Surgery. American Volume*. – 2016. – Vol. 88, № 12. – P. 65-72.

159. Designing a multicellular organotypic 3D liver model with a detachable, nanoscale polymeric space of Disse / A. L. Larkin, R. R. Rodrigues, T. M. Murali [et al.] // *Tissue Engineering. Part C: Methods*. – 2013. – Vol. 19, № 11. – P. 875-884.

160. Development of nanostructured bioplastic material for wound healing / I. R. Gilmutdinova, E. Kostromina, R. D. Yakupova [et al.] // *European Journal of Translational Myology*. – 2021. – Vol. 31, № 1. – P. 9388.

161. Doris, A. T. Decellularized matrices in regenerative medicine / A. T. Doris [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2018. – Vol. 74. – P. 74-89.

162. Effects of dermal multipotent cell transplantation on skin wound healing / S. Chunmeng, C. Tianmin, S. Yongping [et al.] // *Journal of Surgical Research*. – 2004. – Sep. – Vol. 121, № 1. – P. 13-19.

163. Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D printed PCL scaffolds / J. P. Temple, D. L. Hutton, B. P. Hung [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2014. – Vol. 102, № 12. – P. 4317-4325.

164. Fairand, B. P. Radiation sterilization / B. P. Fairand, D. Razem, K. Hemmerich // *Parenteral Medications*. 4th ed. – CRC Press, 2019. – P. 733-754.

165. Gacto Sanchez, P. Surgical treatment and management of the severely burned patient: review and update / P. Gacto Sanchez // *Medicina Intensiva*. – 2017. – Vol. 41, № 6. – P. 356-364.
166. García Garetá, E. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration / E. García Garetá, M. J. Coathup, G. W. Blunn // *Bone*. – 2015. – Vol. 81. – P. 112-121.
167. Gownolla, M. Nanotechnology applications for tissue engineering / M. Gownolla, V. Kokkarachedu, J. Tippabattini // *WA*. – 2015. – P. 21–44.
168. Hollister, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering / S. J. Hollister // *Nature Materials*. – 2005. – Vol. 4, № 7. – P. 518-524.
169. Human acellular dermal matrix for repair of abdominal wall defects: review of clinical experience and experimental data / L. H. Holton 3rd, D. Kim, R. P. Silverman // *Journal of Long Term Effects of Medical Implants*. – DOI: 10.1615/jlongtermeffmedimplants.v15.i5.70. – 2015. – Vol. 15, № 5. – P. 547-558.
170. Hypoxia generated superoxide induces the development of the adhesion phenotype / N. M. Fletcher, Z. L. Jiang, M. P. Diamond [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – № 45. – P. 530-536.
171. Hypoxic fibrous adhesion production: chemical pathway and clinical importance / G. C. Murrell [et al.] // *Integrative Diagnostics*. – 2023. – Vol. 154, № 3. – P. 506-510.
172. In vivo quantitative and qualitative assessment of foreign body giant cell formation on biomaterials in mice deficient in natural killer lymphocyte subsets, mast cells, or the interleukin 4 receptor α and in severe combined immunodeficient mice / J. Yang, B. Jao, A. K. McNally, J. M. Anderson [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2014. – Vol. 102, № 6. – P. 2017-2023.
173. Influence of gelatin and collagen incorporation on peroxidase mediated injectable pectin based hydrogel and bioactivity of fibroblasts / M. Ahmadian, A. B. Khoshfetrat, N. Khatami [et al.] // *Journal of Biomaterials*. – DOI: 10.1177/0885328220977601. – 2021. – № 36. – P. 179-190.

174. Intracellular PO₂ kinetics at different contraction frequencies in *Xenopus* single skeletal muscle fibers / R. A. Howlett [et al.] // *Journal of Applied Physiology*. – 2017. – Vol. 102, № 4. – P. 1456-1461.

175. Kasuya, J. Microporous membrane based liver tissue engineering for the reconstruction of three dimensional functional liver tissues in vitro / J. Kasuya // *Biomaterials*. – 2012. – № 4. – P. 290-295.

176. Levy Mishali, M. Effect of scaffold stiffness on myoblast differentiation / M. Levy Mishali, J. Zoldan, S. Levenberg // *Tissue Engineering. Part A*. – 2009. – Vol. 15, № 4. – P. 935-944.

177. Liu, B. The adjuvant use of stromal vascular fraction and platelet rich fibrin for autologous adipose tissue transplantation / B. Liu // *Tissue Engineering*. – 2013. – № 19. – P. 1-14.

178. Liu, H. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications / H. Liu // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – № 5. – P. 299-313.

179. Malinowski, M. Using X ray technology to sterilize medical devices / M. Malinowski // *American Journal of Biomedical Science & Research*. – 2021. – Vol. 12, № 3. – P. 272-276.

180. Mathew Steiner, S. S. Collagen in wound healing / S. S. Mathew Steiner, S. Roy, C. K. Sen // *Bioengineering*. – 2021. – Vol. 8, № 5. – P. 63.

181. McEvoy, B. X ray: an effective photon / B. McEvoy [et al.] // *Biomedical Instrumentation & Technology*. – 2020. – Vol. 54, № s1. – P. 23-30.

182. Morphologic assessment of extracellular matrix scaffolds for patch tracheoplasty in a canine model / T. W. Gilbert, S. Gilbert, M. Madden [et al.] // *The Annals of Thoracic Surgery*. – 2008. – Vol. 86, № 3. – P. 923-925.

183. Murphy, C. M. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering / C. M. Murphy, M. G. Haugh, F. J. O'Brien // *Biomaterials*. – 2014. – № 3. – P. 461-466.

184. Nair, D. G. Recent advances in liver tissue engineering as an alternative and complementary approach for liver transplantation / D. G. Nair, R. Weiskirchen // *Current Issues in Molecular Biology*. – DOI: 10.3390/cimb46010018. – 2023. – № 46. – P. 262–278.
185. Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review / S. Gayathri, J. Josna, C. Prabhakumari [et al.] // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2021. – Vol. 70, № 9. – P. 593-604.
186. Offeddu, G. S. Multi scale mechanical response of freeze dried collagen scaffolds for tissue engineering applications / G. S. Offeddu, J. C. Ashworth, R. E. Cameron [et al.] // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2015. – № 42. – P. 19-25.
187. Polo Corrales, L. Scaffold design for bone regeneration / L. Polo Corrales, M. Latorre Esteves [et al.] // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 15-56.
188. Recent advances in the development and application of cell loaded collagen scaffolds / Q. He, T. Feng, Y. Xie // *International Journal of Molecular Sciences*. – DOI: 10.3390/ijms26094009. – 2025. – Vol. 26, № 9. – P. 4009.
189. Regeneration of full thickness abdominal wall defects in rats using collagen scaffolds loaded with collagen binding basic fibroblast growth factor / Sh. Chunying, Ch. Wei, Zh. Yannan [et al.] // *Biomaterials*. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.038. – 2021. – Vol. 32, № 3. – P. 753-759.
190. Silk fibroin/collagen and silk fibroin/chitosan blended three dimensional scaffolds for tissue engineering / K. Sun, H. Li, R. Li [et al.] // *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. – 2015. – Vol. 25. – P. 243–249.
191. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: an evolving research field / S. P. Tarassoli, Z. M. Jessop, A. Al-Sabah [et al.] // *J. Plast. Reconstr. Aesth. Surg.* – 2018. – V. 71., № 5. – P. 615-623.

192. Stem cell therapy on skin: mechanisms, recent advances and drug reviewing issues / G. Y. Chu, Y. F. Chen, H. Y. Chen [et al.] // *J. Food Drug Anal.* – 2017. – V. 26. – № 1. – P. 14-20.
193. Structure, evolution and expression of collagen XXVIII / J. M. Gebauer, B. Kobbe, M. Paulsson [et al.] // *Matrix Biology.* – 2015. – P. 111-115.
194. The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds – an in vitro evaluation using mesenchymal stem cells / T. Suchý, M. Šupová, P. Sauerová [et al.] // *Biomedical Materials.* – 2015. – № 10. – P. 065008.
195. The potential of collagen-based materials for wound management / R. Zhu, Z. Huang, J. Zhang [et al.] // *Materials Today Chemistry.* – DOI: 10.1016/j.mtchem.2024.102295. – 2024. – № 41. – P. 102295.
196. Vroman, I. Biodegradable polymers / I. Vroman // *Materials.* – 2009. – № 2. – P. 307-344.
197. Zhang, S. A robust high throughput sandwich cell-based drug screening platform / S. Zhang, W. Tong, B. Zheng // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32, № 4. – P. 1229-1241.
198. Zou, Y. Aligned collagen scaffold combination with human spinal cord derived neural stem cells to improve spinal cord injury repair / Y. Zou, D. Ma, H. Shen // *Biomaterials Science.* – DOI: 10.1039/D0BM00431F. – 2020. – № 8. – P. 5145-5156.
199. 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart / A. Lee, A. R. Hudson, D. J. Shiwarski [et al.] // *Science.* – 2019. – Vol. 365. – P. 482–487. – DOI: 10.1126/science.aav9051.