

Оптимизация децеллюляризации и оценка биосовместимости сосудистых матриксов с лазерной перфорацией

Е.В. Чепелева, А.А. Докучаева, С.В. Владимиров, Е.В. Кузнецова, Д.С. Сергеевичев

Для корреспонденции: Елена Васильевна Чепелева, e_chepeleva@meshalkin.ru

Поступила в редакцию 14 ноября 2024 г.
Исправлена 23 октября 2025 г.
Принята к печати 24 октября 2025 г.

Цитировать: Чепелева Е.В., Докучаева А.А., Владимиров С.В., Кузнецова Е.В., Сергеевичев Д.С. Оптимизация децеллюляризации и оценка биосовместимости сосудистых матриксов с лазерной перфорацией. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2025;29(3):46-57. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2025-3-46-57>

Финансирование

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 124022500251-0.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн работы: Д.С. Сергеевичев
Сбор и анализ данных: все авторы
Статистическая обработка данных: С.В. Владимиров, Е.В. Кузнецова, Д.С. Сергеевичев
Написание статьи: Е.В. Чепелева, А.А. Докучаева, Д.С. Сергеевичев
Исправление статьи: Е.В. Чепелева, А.А. Докучаева, Д.С. Сергеевичев
Утверждение окончательного варианта статьи: все авторы

ORCID

Е.В. Чепелева, <https://orcid.org/0000-0003-0715-4451>

А.А. Докучаева, <https://orcid.org/0000-0002-3260-6491>

С.В. Владимиров, <https://orcid.org/0000-0002-5902-1442>

Е.В. Кузнецова, <https://orcid.org/0000-0001-5417-6624>

Д.С. Сергеевичев, <https://orcid.org/0000-0002-5027-6561>

© Чепелева Е.В., Докучаева А.А., Владимиров С.В., Кузнецова Е.В., Сергеевичев Д.С., 2025

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Для возможности адаптации биологических материалов, предназначенных для протезирования различных отделов сердечно-сосудистой системы, к физиологическим условиям организма актуальными являются исследования, направленные на сравнительный анализ протоколов децеллюляризации для создания оптимального каркаса, а также на совершенствование его свойств, в частности за счет модификации поверхности.

Цель. Путем сравнительного анализа детергентных композиций оптимизировать протокол децеллюляризации стенки легочного ствола свиньи с последующей оценкой влияния лазерной микроперфорации на биосовместимость и клеточное заселение децеллюляризованного матрикса *in vitro* и *in vivo*.

Методы. На первом этапе работы были проведены эксперименты по подбору времени инкубации фрагментов легочного ствола свиней в растворах с различной концентрацией детергентов с последующими тензометрическими испытаниями, на основании которых выбиралась наилучшая комбинация условий. Далее децеллюляризованный материал перфорировали с помощью лазерной обработки, часть полученных образцов заселяли клетками фибробластного ряда в течение 7 суток, часть образцов имплантировали подкожно в паравerteбральную область у крыс на 30 суток. Гистологические исследования биоматериалов проводили на каждом этапе.

Результаты. Оптимальным протоколом децеллюляризации стенки легочного ствола свиньи признана обработка 0,5 % раствором додецилсульфата натрия в комбинации с 0,5 % дезоксихолатом натрия, позволяющая за 16 часов получить ацеллюлярный матрикс с сохраненной ультраструктурой. При культивировании фибробластов мыши на поверхности образцов с лазерной обработкой было показано сохранение жизнеспособности клеток. При изучении клеточного состава эксплантов, извлеченных через 30 дней после экспериментальной операции, было показано, что лазерная перфорация сохраняет биосовместимость материала.

Заключение. В результате проведенного исследования был разработан и валидирован эффективный протокол децеллюляризации, позволяющий получать бесклеточный матрикс стенки легочного ствола с сохраненной внеклеточной структурой. Показано, что лазерная перфорация матриксов не нарушает их биосовместимости и увеличивает интегративный потенциал за счет расширения контактной поверхности.

Ключевые слова: биологические протезы; децеллюляризация; клеточные технологии; лазерная перфорация; рецеллюляризация; тканевая инженерия



Optimization of decellularization and biocompatibility assessment of laser-perforated vascular matrices

Elena V. Chepeleva, Anna A. Dokuchaeva, Sergey V. Vladimirov, Elena V. Kuznetsova, David S. Sergeevichev

Corresponding author:

Elena V. Chepeleva, e_chepeleva@meshalkin.ru

Received 14 November 2024. Revised 23 October 2025. Accepted 24 October 2025.

How to cite: Chepeleva E.V., Dokuchaeva A.A., Vladimirov S.V., Kuznetsova E.V., Sergeevichev D.S. Optimization of decellularization and biocompatibility assessment of laser-perforated vascular matrices. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2025;29(3):46-57. (In Russ.) <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2025-3-46-57>

Funding

This research was carried out within the state assignment of Ministry of Health of Russian Federation (theme No 124022500251-0).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Contribution of the authors

Conception and study design: D.S. Sergeevichev

Data collection and analysis: E.V. Chepeleva, A.A. Dokuchaeva, S.V. Vladimirov, E.V. Kuznetsova, D.S. Sergeevichev

Statistical analysis: S.V. Vladimirov, E.V. Kuznetsova, D.S. Sergeevichev

Drafting the article: E.V. Chepeleva, A.A. Dokuchaeva, D.S. Sergeevichev

Critical revision of the article: E.V. Chepeleva, A.A. Dokuchaeva, D.S. Sergeevichev

Final approval of the version to be published: E.V. Chepeleva, A.A. Dokuchaeva, S.V. Vladimirov, E.V. Kuznetsova, D.S. Sergeevichev

ORCID

E.V. Chepeleva, <https://orcid.org/0000-0003-0715-4451>

A.A. Dokuchaeva, <https://orcid.org/0000-0002-3260-6491>

S.V. Vladimirov, <https://orcid.org/0000-0002-5902-1442>

E.V. Kuznetsova, <https://orcid.org/0000-0001-5417-6624>

D.S. Sergeevichev, <https://orcid.org/0000-0002-5027-6561>

© 2025 Chepeleva et al.

Meshalkin National Medical Research Center,
Novosibirsk, Russian Federation

Abstract

Background: To enable the adaptation of biological materials intended for the prosthetics of various parts of the cardiovascular system to the physiological conditions of the body, research aimed at a comparative analysis of decellularization protocols for creating an optimal scaffold, as well as improving its properties, in particular through surface modification, is of current importance.

Objective: The study aims to optimize the protocol on decellularization of the porcine pulmonary trunk wall by comparative analysis of detergent compositions followed by assessment of the effect of laser microperforation on the biocompatibility and cellular repopulation of the decellularized matrix *in vitro* and *in vivo*.

Methods: The first stage of the work was aimed at selecting the incubation time for porcine pulmonary trunk fragments in solutions with various concentrations of detergents, followed by tensometric tests to determine the optimal combination of conditions. Further, the decellularized material was perforated using laser processing. Some of the resulting samples were repopulated with fibroblast cells for 7 days, while other samples were subcutaneously implanted into the paravertebral region of rats for 30 days. Histological studies of the biomaterials were conducted at each stage.

Results: The optimal decellularization protocol for the porcine pulmonary trunk wall was determined to be its treatment with a 0.5 % sodium dodecyl sulfate solution in combination with 0.5 % sodium deoxycholate, which enables to produce an acellular matrix with preserved ultrastructure within 16 hours. Culturing mouse fibroblasts on the surface of laser-treated samples proved the sustention of cell viability. The investigation of the cellular composition of explants retrieved 30 days after the experimental surgery showed that laser perforation preserves the material's biocompatibility.

Conclusion: The conducted research resulted in the development and validation of an effective decellularization protocol for obtaining an acellular pulmonary trunk wall matrix with preserved extracellular structure. Moreover, laser perforation of the matrices does not compromise their biocompatibility and enhances their integrative potential by expanding the contact surface area.

Keywords: biological prostheses; cell technologies; decellularization; laser perforation; recellularisation; tissue engineering



Введение

На сегодняшний день одним из широко используемых методов оперативного лечения патологии клапанов сердца является их протезирование различными клапаносодержащими кондуитами [1–3]. В настоящее время используются два типа протезов – механические и биологические, каждый из которых имеет серьезные ограничения. Механические протезы требуют пожизненной антикоагулянтной терапии, увеличивающей риск тромбоэмболических и геморрагических осложнений [4]. Биологические протезы, изготовленные из химически обработанных тканей животных, не способны к росту и регенерации, что ограничивает срок их службы вследствие дегенеративных изменений [5]. В связи с этим для молодых пациентов наиболее перспективными для применения являются аллографты, обладающие рядом преимуществ: оптимальные гемодинамические характеристики, низкая тромбогенность и способность к ремоделированию [2; 3; 6–8]. Кроме того, донорские аллографты обладают хорошей биосовместимостью, что снижает риск иммунных реакций и отторжения [8–10]. Однако, несмотря на свои преимущества, аллографты также имеют свои ограничения, включая доступность донорских органов и необходимость строгого соблюдения правил трансплантации для минимизации риска передачи инфекций. В свете этих факторов продолжаются исследования, направленные на улучшение технологий обработки донорских клапанов и разработку новых методов их предимплантационной подготовки.

Современные биоматериалы и технологии тканевой инженерии открывают новые горизонты в создании клапанных протезов, которые могут сочетать в себе преимущества как механических, так и биологических решений. Децеллюляризованные биологические матриксы представляют интерес благодаря обеспечению механической анизотропии и структуре материала протеза, схожей со структурой нативного клапана сердца, а также способности замещать элементы соединительнотканного каркаса после рециеллюляризации клетками самого реципиента в будущем [9; 11; 12]. Основной проблемой при использовании децеллюляризованных матриксов остается оптимизация репопуляции интерстициальными клетками (фибробластами, миофибробластами, гладкомышечными клетками) [13–18]. В связи с этим при разработке методов заселения скаффолдов необходимо уделять особое внимание повышению эффективности миграции клеток в интерстициальные пространства [19; 20]. Кроме того, важным аспектом является изучение

взаимодействия между клетками и внеклеточным матриксом. Свойства матрикса (механическая прочность, пористость, состав) существенно влияют на пролиферацию и дифференцировку клеток [21; 22]. Односторонняя миграция интерстициальных клеток с адвентициальной стороны требует создания дополнительных путей для их проникновения с внутренней поверхности, что предполагает преодоление базальной мембраны. Химические методы разрушения или дегградации мембраны, такие как ферментативные или детергентные, не подходят, поскольку могут причинить необратимые повреждения, что, в свою очередь, нарушает архитектуру соединительнотканного каркаса и значительно ускоряет дегградацию тканеинженерного графта. Наиболее перспективными представляются физические методы перфорации базальной мембраны. Применение лазерного облучения [23] в данном контексте может позволить не только создать дополнительные пути для миграции клеток, но и решить комплекс сопутствующих задач: целенаправленно модифицировать механические свойства матрикса, повышая его эластичность и адаптируя к окружающим тканям; создать анизотропную структуру, служащую физическим ориентиром для направленной организации клеток; улучшить васкуляризацию трансплантата за счет формирования каналов для прорастания новых сосудов, а также усилить диффузию питательных веществ в толще скаффолда *in vitro*. Таким образом, лазерная перфорация может быть потенциальным инструментом для комплексного улучшения биосовместимости и функциональности децеллюляризованных материалов.

Целями настоящего исследования являются оптимизация протокола децеллюляризации стенки легочного ствола свиньи путем сравнительного анализа детергентных композиций и последующая оценка влияния лазерной микроперфорации на биосовместимость и клеточное заселение полученных матриксов в условиях *in vitro* при сокультивировании с клетками фибробластного ряда и *in vivo* на модели подкожной имплантации лабораторным животным.

Методы

Получение биоматериалов для исследований

В качестве экспериментального биоматериала использовали фрагменты легочного ствола (ЛС) свиней. Материал забирали максимально возможным чистым способом в цехе убоя скота мясокомбината. Очищенные от свободно прилегающих тканей

Табл. 1. Состав растворов для децеллюляризации биологических материалов

№ раствора	Состав раствора
1	Дезоксихолат натрия, 5 г Додецилсульфат натрия, 5 г Фосфатный буфер, до 1 л
2	Дезоксихолат натрия, 5 г Додецилсульфат натрия, 1 г Фосфатный буфер, до 1 л

(адвентиции и жировой ткани) материалы помещали в охлажденный стерильный физиологический раствор для последующей транспортировки в лабораторию. Далее в стерильных условиях образцы разрезали на фрагменты нужного размера без видимых повреждений и естественных отверстий.

Приготовление растворов для децеллюляризации

При приготовлении растворов для децеллюляризации навески дезоксихолата натрия и додецилсульфата натрия (Applichem, Германия) растворяли в необходимом объеме фосфатного буфера (Биолот, Россия) при комнатной температуре и постоянном перемешивании в течение 1 часа с помощью орбитального шейкера PSU-20 (Биосан, Латвия). Образование пены не допускалось. Стерилизующую фильтрацию растворов выполняли с помощью целлюлозных 0,22 мкм фильтров Millex-GS (Merck, Германия). Состав децеллюляризирующих растворов приведен в табл. 1.

Децеллюляризация и отмывка биоматериалов

Децеллюляризацию материалов выполняли группами по 10 образцов. Образцы помещали в стерильную коническую колбу на 500 мл, добавляли 200 мл децеллюляризирующего раствора и герметично закрывали стерильной пробкой. Колбу помещали в орбитальный термощейкер Unimax (Heidolf, Германия). Периоды химической обработки биоматериалов представлены в табл. 2.

Отмывку материалов производили, заменяя децеллюляризирующий раствор на 300 мл стерильного фосфатного буфера. После 8-кратной отмывки по 12 часов материалы использовали для дальнейших исследований.

Тензометрические испытания биоматериалов

Испытания прочности материалов после децеллюляризации проводили для 10 образцов из

Табл. 2. Наименование экспериментальных групп

№	Группа	Состав раствора и время обработки
1	ЛС1-16	Материал ЛС, обработанный раствором 1 в течение 16 часов
2	ЛС1-24	Материал ЛС, обработанный раствором 1 в течение 24 часов
3	ЛС2-16	Материал ЛС, обработанный раствором 2 в течение 16 часов
4	ЛС2-24	Материал ЛС, обработанный раствором 2 в течение 24 часов

Примечание. Цифры «1» и «2» в названиях групп обозначают растворы в табл. 1.

каждой группы. Образцы высекали из заготовок стандартной вырубной матрицей. Толщину образца трехкратно измеряли при помощи электронного цифрового толщиномера. Ширина и длина образца соответствовали размерам вырубной матрицы (9 и 28 мм соответственно). Растяжение образцов проводили в продольном и поперечном направлении относительно оси сосуда на разрывной машине ESM-301 (Mark-10, США). Скорость растяжения составляла 50 мм/мин. Удельную прочность, МПа, определяли как отношение значения максимальной силы, Н, к площади поперечного сечения, мм², фрагмента. Модуль Юнга определяли по формуле $E = F / (S \times \Delta l)$, где E – модуль Юнга, МПа; F – максимальная сила, Н; S – площадь поперечного сечения образца, мм²; Δl – максимальное изменение длины фрагмента, мм, до разрыва образца.

В качестве контроля использовали нативные образцы фрагментов ЛС свиней.

Лазерная обработка децеллюляризованного материала

Для лазерной обработки использовались децеллюляризованные образцы ЛС размером 1×1 см. Обработка материала производилась с помощью аппарата для лазерной резки листовых биологических материалов «Мелаз-Кардио» (Институт лазерной физики СО РАН, Новосибирск). Для получения слепозаканчивающихся каналов в тканях длительность облучения составляла 35 мс, расстояние между точками облучения по всей поверхности – 1 мм. После окончания лазерного туннелирования образцы помещали в комплексный спиртовой раствор для хранения по технологии, разработанной нами ранее [24].

Клеточное заселение полученных материалов *in vitro*

Для клеточного заселения децеллюляризованных фрагментов ЛС с лазерной обработкой поверхности использовали линию фибробластов мыши L-929 (ГНЦВБ «Вектор», Кольцово). Образцы размером 5×5 мм ($n = 4$) помещали в отдельные ячейки 48-луночного культурального планшета, на поверхность образца с лазерными каналами наносили 20 мкл суспензии, содержащей 20 000 клеток L-929 в культуральной среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки (FCS; Hyclone, США), 2 мм L-глутамин (ICN, США) и 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Дальхимфарм, Россия), ждали 30 минут для прикрепления клеток к поверхности образца, затем добавляли 1 мл полной культуральной среды. Дальнейшее культивирование образцов с клетками проводили при 37 °С и содержании CO₂ в атмосфере 5 % в течение 7 дней. Адгезию и жизнеспособность клеток на поверхности образца определяли путем окрашивания флуоресцентными красителями: акридиновым оранжевым (DIA M, Россия; 100 мкг/мл) и этидиум бромидом (Medigen, Россия; 100 мкг/мл). Клетки визуализировали с помощью микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

Подкожная имплантация образцов крысам

В эксперименте использовали самцов крыс Wistar в возрасте 5–6 месяцев и массой 300–350 г, полученных из вивария конвенциональных животных ИЦИГ СО РАН. Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина», воду и пищу получали без ограничения. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, (ETS No. 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург) и приказом Минздрава России от 18 мая 2021 г. № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований». Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России (протокол № 01-2024 от 12 июля 2024 г.).

Экспериментальных крыс наркотизировали препаратом Золетил-100 (50 мг/кг; Virbac Sante Animale, Франция) интраперитонеально. Непосредственно перед имплантацией от нескольких децеллюляризованных фрагментов ЛС с лазерной обработкой поверхности вырезали образцы размером 5×5 мм. В качестве контрольных использовались аналогичные образцы без лазерной обработки. После отмывки в стерильном физиологическом

растворе образцы имплантировали 5 крысам (по одному опытному и одному контрольному образцу на животное). На предварительно обработанной антисептиком спине животного по паравертебральной линии рассекали кожный и подкожно-жировой слои, тупым способом в подкожной клетчатке формировали карманы глубиной 3,5 см, в которые помещали образцы. Операционную рану ушивали, спину животного обрабатывали антисептиками. По окончании срока наблюдения (30 суток) животных выводили из эксперимента с применением сверхтерапевтических доз Золетил-100, имплантированные образцы забирали вместе с прилежащими тканями для гистологического исследования.

Гистологические исследования

Биоматериал (фрагменты ЛС до и после децеллюляризации, эксплантированные образцы с прилежащими тканями) фиксировали в 10 % формалине на фосфатном буфере (Биовитрум, Россия) в течение 48 часов. Дальнейшую проводку материалов и приготовление парафиновых блоков выполняли по общепринятой методике. Затем на ротационном микротоме HM340E (Micom, Германия) готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм, переносили на предметные стекла SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, Германия) и подсушивали 1 сутки при 40 °С. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином наборами реагентов (Биовитрум, Россия) согласно рекомендациям производителя и заключали под покровные стекла в монтирующей среде Biomount (Биовитрум, Россия). Микроскопические исследования проводили с использованием микроскопа Axioskop 40FL (Carl Zeiss, Германия), фотокамеры ADF PRO 08 и программного обеспечения ADF ImageCapture software (ADF Optics Co. Ltd, Китай).

Статистический анализ

Результаты исследований обрабатывали с помощью программного обеспечения Statistica 13 (TIBCO Software, США). Нормальность распределения проверяли при помощи критерия Шапиро – Уилка. Для сравнения двух групп использовали критерий Стьюдента. Для множественного межгруппового сравнения использовали однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Даннета. Данные представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее арифметическое, σ – стандартное отклонение; n – объем анализируемой подгруппы, p – величина статистической значимости различий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование прочностных характеристик образцов ЛС после децеллюляризации проводили в продольном и поперечном направлении. При этом исследовали общие прочностные свойства и вычисляемый модуль Юнга, с помощью которого описываются свойства материалов в области обратимой упругой деформации (табл. 3). Для показателя модуля Юнга отличия децеллюляризованного материала от нативного более чем на 30 % считались недопустимыми.

Сравнительный анализ образцов ЛС после 16 и 24 часов инкубации в растворах № 1 и № 2 показал общую тенденцию к снижению прочностных характеристик при увеличении продолжительности химической обработки. Использование раствора № 1 приводит к постепенному снижению прочности образцов ЛС в продольном направлении: через 16 часов наблюдается уменьшение показателя, а через 24 часа – значительное снижение прочности на 31 % относительно нативного материала. Раствор № 2 демонстрирует разнонаправленное действие: через 16 часов наблюдается некоторое увеличение прочности, однако к 24 часам показатели существенно снижаются. При этом достоверных различий между всеми показателями обнаружено не было. Прочностные характеристики образцов ЛС при поперечном растяжении были более стабильны. Нативные ЛС отличались более высоким показателем напряжения в поперечном направлении, чем в продольном. Децеллюляризация любым из исследуемых растворов приводила к незначительному снижению прочности без выраженной зависимости от времени экспозиции.

Упруго-эластические свойства образцов ЛС при продольном растяжении демонстрируют выраженную зависимость от продолжительности химического воздействия. Децеллюляризация растворами № 1 и № 2 через 24 часа приводит к падению величины модуля Юнга при продольном растяжении почти в 2 раза.

Упруго-эластические характеристики образцов ЛС при поперечном растяжении были более стабильны. Нативные ЛС отличались более высоким показателем модуля Юнга в поперечном направлении, чем в продольном. Децеллюляризация любым из исследуемых растворов незначительно снижала показатель модуля Юнга.

Контрольное гистологическое исследование материалов ЛС до и после децеллюляризации показало относительно хорошую сохранность соединительнотканых структур и полную элиминацию клеток (рис. 1).

Нативный материал отличается равномерной упаковкой основных волокон соединительнотканного каркаса. Эластин выглядит относительно толстыми равномерными длинными извитыми тяжами. Стенка ЛС наполнена клетками фибробластного ряда и гладкомышечными клетками, которые залегают отдельными группами, образуя тяжи. С интимальной стороны стенка покрыта эндотелиоцитами (рис. 1, А, В). После децеллюляризации извитость эластиновых волокон снижена, имеется их диффузная микрофрагментация. Фибриллярность в строении коллагеновых волокон умеренно утрачена. При этом на препаратах после 24 часов децеллюляризации отчетливо наблюдаются пустоты в местах расположения коллагена (рис. 1, D, F).

На следующих этапах работы для децеллюляризации материала ЛС был выбран раствор 1 (0,5 % додецилсульфата и 0,5 % дезоксихолата натрия), время обработки – 16 часов. Для оценки возможности клеточного заселения *in vitro* децеллюляризованных и обработанных лазером образцов ЛС была использована линия фибробластов мыши L-929. Культивирование на поверхности образцов в течение 7 дней показало сохранение жизнеспособности клеток, которая была сравнима с жизнеспособностью в контрольной группе (клетки, растущие на поверхности культурального пластика в аналогичных условиях) (рис. 2).

Табл. 3. Влияние децеллюляризации на прочность биологических материалов

Материал и направление растяжения	Контроль	Раствор 1, 16 часов	Раствор 1, 24 часа	Раствор 2, 16 часов	Раствор 2, 24 часа
Удельная прочность продольная, кПа	456,2 ± 293,7	431 ± 131,9	315,9 ± 123,6	532,2 ± 252,3	352,5 ± 126,3
Удельная прочность поперечная, кПа	998,4 ± 475,0	805,3 ± 221,9	903,6 ± 283,2	827,5 ± 242,6	795,1 ± 337,4
Модуль Юнга продольный, кПа	358,4 ± 153,8	250,4 ± 65,6	165,4 ± 45,4*	301,1 ± 123,5	204,9 ± 95,31
Модуль Юнга поперечный, кПа	704,5 ± 246,9	490,8 ± 171,0	628,3 ± 267,2	416,1 ± 170,4	583,9 ± 266,5

* Достоверные различия с контрольной группой, $p = 0,0299$; $n = 10$.

Рис. 1. Гистологическое строение стенки легочного ствола свиней до и после децеллюляризации:

А, В – стенка ЛС в норме;
 С – стенка ЛС после децеллюляризации 16 часов раствором № 1;
 D – стенка ЛС после децеллюляризации 24 часа раствором № 1;
 E – стенка ЛС после децеллюляризации 16 часов раствором № 2;
 F – стенка ЛС после децеллюляризации 24 часа раствором № 2;
 И – интимальная сторона стенки сосуда;
 Э – эластин;
 К – коллаген. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка – 50 мкм (А, С, D, E, F); 40 мкм (В)

Примечание. ЛС – легочный ствол.

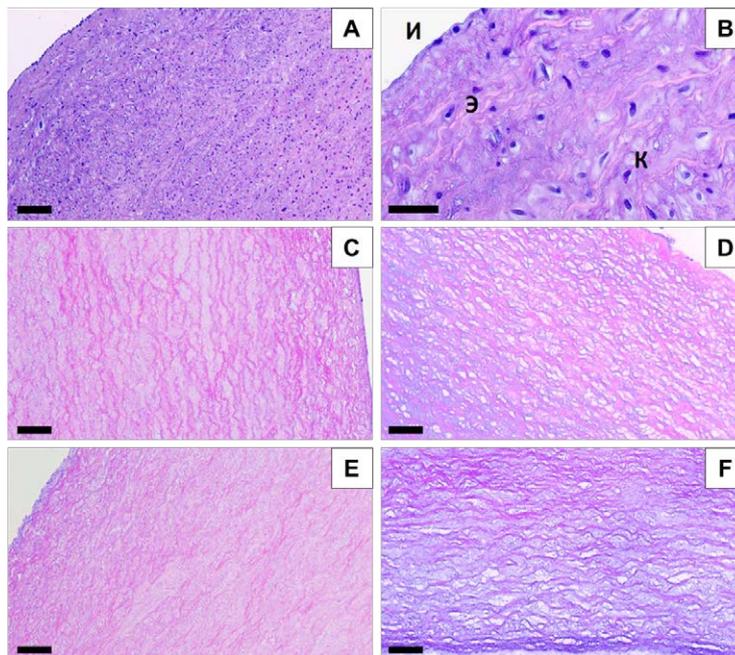
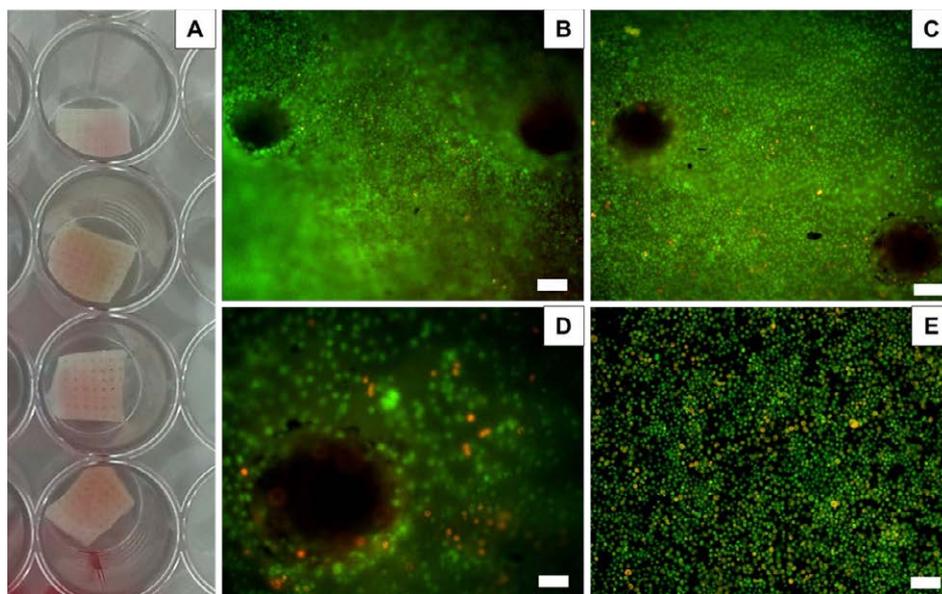


Рис. 2. Клеточное заселение децеллюляризованных образцов легочного ствола свиней с нанесенными лазерными каналами в статических условиях *in vitro*: А – общий вид образцов в 48-луночной планшете; В, С, D – клетки L-929 на поверхности образца через 7 суток культивирования; E – клетки L-929 на культуральном пластике через 7 суток культивирования. Окраска акридиновым оранжевым (зеленый, живые клетки) и этидиум бромидом (красный, мертвые клетки). Масштабная линейка – 100 мкм (B, C, E); 50 мкм (D)



Подкожную имплантацию децеллюляризованных образцов ЛС свиней с нанесенными лазерными каналами и контрольных децеллюляризованных образцов выполняли 5 крысам на срок 30 дней. После выведения животных из эксперимента при макроscopicком осмотре извлеченного материала у всех эксплантов поверхность сформированной соединительнотканной капсулы была гладкой и блестящей,

без выраженных неровностей и зон воспаления, визуальных различий между контрольной и экспериментальной группами отмечено не было. Клеточная реакция на имплантат варьировалась от умеренной до интенсивной, в зависимости от индивидуальных особенностей животного, у большинства крыс тканевая реакция была умеренная, а имплантаты окружены эластичной капсулой (рис. 3).

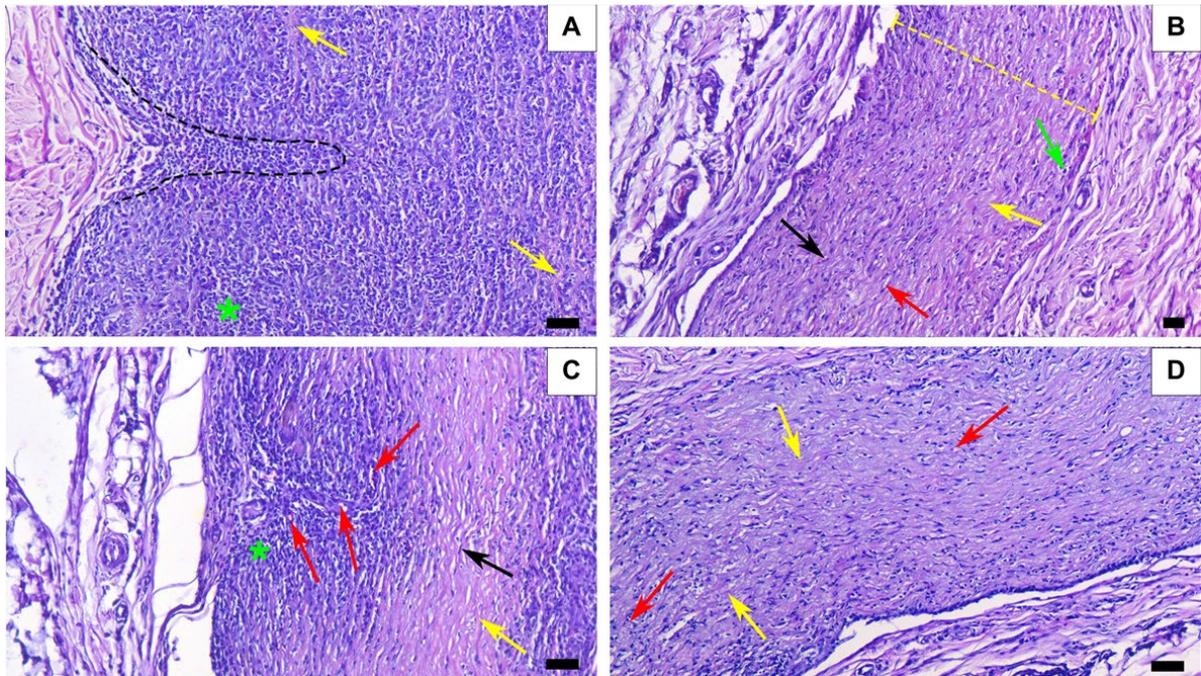


Рис. 3. Соединительнотканная капсула, сформированная вокруг децеллюляризованного образца легочного ствола свиньи, через 30 дней подкожной имплантации в паравerteбральную область у крысы: А, В, С – образцы с нанесенными лазерными каналами; D – контрольный образец; черный пунктир – границы лазерного канала; желтый пунктир – толщина имплантата; желтые стрелки – соединительнотканый матрикс имплантата; черные стрелки – фибробласты; красные стрелки – неоангиогенез; зеленые стрелки, звездочки – лимфоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабная линейка – 50 мкм

Клеточный компонент имплантатов в исследуемых группах не различается по своему составу. Клеточное наполнение как в случае контрольных, так и в случае экспериментальных образцов представлено в основном клетками, обладающими морфологическими характеристиками клеток миофибробластного ряда. В глубоких слоях имплантатов визуализируются очаги неоангиогенеза, в то время как краевые области умеренно или слабо инфильтрированы лимфоцитарными клетками. В областях, где коллагеновые пучки децеллюляризованного материала прерываются (границы пластины, срезы ткани, границы лазерных каналов), присутствует большое количество мигрирующих в материал имплантата клеток воспаления и клеток с морфологическими характеристиками фибробластов различной степени зрелости. Просвет каналов, как и контактные поверхности контрольных образцов, покрыт слоем клеток воспаления, преимущественно лимфоцитарного звена с содержанием палочко-ядерных лейкоцитов и макрофагов. Во многих случаях воспаление сопровождается неоангиогенезом

и разрешается образованием тонкой фиброзной капсулы (рис. 3, В, С, D), в нескольких препаратах в просвете лазерных каналов визуализируются полностью сформированные сосуды малого диаметра.

В целом тканевая реакция на имплантаты в двух исследуемых группах имела схожий характер. Согласно результатам анализа, лазерная перфорация не влияет на интенсивность воздействия имплантируемых образцов на организм, однако способствует увеличению площади контактной поверхности между материалом и биологическими тканями.

Обсуждение

Децеллюляризация представляет собой процесс элиминации клеточных компонентов при сохранении структурной и функциональной целостности внеклеточного матрикса, что позволяет создать естественный биокаркас для тканевой инженерии. В настоящее время применяются три основных подхода к децеллюляризации: химические, физические и ферментативные методы [25]. Среди химических методов выделяют ионные (SDS, дезоксихолат натрия),

неионные и цвиттер-ионные детергенты. Ионные детергенты эффективно осуществляют лизис клеток, но могут вызывать структурные повреждения матрикса [26]. Физические методы (замораживание-оттаивание, ультразвуковая обработка, электропорация) обычно применяются в комбинации с химическими, причем некоторые из них не обеспечивают полной элиминации нуклеиновых кислот [27]. Ферментативный способ децеллюляризации, основанный на применении нуклеаз (ДНК- и РНКаз), коллагеназ, трипсина, липазы и диспазы, позволяет удалять клеточные компоненты и ДНК при сохранении структурной и биохимической целостности матрикса [25]. Наиболее широко используется трипсин благодаря его специфической протеолитической активности, который при достаточной экспозиции обеспечивает полную элиминацию клеточного материала. Однако, как показывают литературные данные и наши предыдущие исследования, ключевым недостатком метода является его агрессивность: чрезмерное воздействие трипсина или увеличение его концентрации приводит к повреждению базальной мембраны, разрушению структуры графта и значительному ухудшению физико-механических свойств биоматериала [28; 29]. В связи с этим в качестве основного метода в данной работе был выбран детергентный способ. В отличие от ферментативного, детергентный метод гораздо менее агрессивен по отношению к структурным белкам матрикса, что позволяет сохранить его архитектуру и биомеханические свойства, хотя и требует тщательной процедуры отмывки из-за цитотоксичности реагентов [30].

В результате экспериментов по подбору времени инкубации биоматериала в растворах с различной концентрацией детергентов было установлено, что наиболее эффективным и универсальным составом для децеллюляризации стенки ЛС свиньи является раствор 0,5 % додецилсульфата натрия и 0,5 % дезоксихолата натрия. Гистологические исследования подтвердили, что 16-часовая обработка обеспечивает полное удаление клеточного материала при сохранении пространственного строения соединительнотканного каркаса, а также показали нецелесообразность увеличения времени экспозиции до 24 часов. Таким образом, подтверждается, что выбранный детергентный способ позволяет достичь удаления клеток без критического повреждения внеклеточного матрикса. Сохранение механической прочности таких аллографтов, как показали наши испытания, способно обеспечить адекватное сопротивление гемодинамической нагрузке в условиях физиологической циркуляции.

Проблема ускорения миграции клеток в интерстициальные пространства децеллюляризованных матриксов давно и безуспешно решается многими научными группами. При планировании данного исследования было выдвинуто предположение, что создание дополнительных путей миграции для клеток, таких как лазерные каналы со стороны базальной мембраны, должно ускорить процесс заселения бесклеточного матрикса. Для проверки гипотезы была разработана методология, включающая создание децеллюляризованных матриксов, обработанных лазером для формирования каналов, слепозаканчивающихся в толщине материала. Эти каналы должны были служить «транспортными путями» для клеток, позволяя им быстрее достигать целевых участков матрикса. В схожей работе М. Grabenwöger и соавт. была показана возможность прорастания эндотелиальных клеток в поверхность биосинтетических сосудистых протезов Omniflow, перфорированных эксимерным лазером, при имплантации в сосудистое русло овец [31]. В данной работе в ходе экспериментов *in vitro* использовались клетки фибробластного ряда, которые в норме заселяют соединительнотканную строму и принимают участие в синтезе основных белков внеклеточного матрикса, таких как коллаген и эластин. При последующей микроскопической визуализации было показано, что пролиферация и жизнеспособность данного типа клеток на поверхности образцов визуально не отличается от жизнеспособности клеток на культуральном пластике. Однако при таком методе анализа было затруднительно определить возможность миграции клеток внутрь лазерных каналов или в толщу биоматериала. На следующем этапе для изучения биосовместимости и возможности клеточного заселения *in vivo* полученных в работе образцов была использована модель подкожной имплантации у крыс, которая широко применяется для оценки тканевой реакции донора и выявления локальных структурных изменений в матриксах [32; 33]. Через 30 дней после экспериментальной операции наблюдалось формирование соединительнотканной капсулы вокруг имплантированного материала, обусловленное реакцией организма на инородное тело [34; 35]. При изучении клеточного состава эксплантированных образцов были обнаружены возможность миграции клеток фибробластного ряда в строму имплантата через границы лазерных каналов, а также образование в каналах кровеносных сосудов малого диаметра.

Таким образом, лазерная перфорация, не оказывая негативного влияния на биосовместимость децеллюляризованных матриксов, может способствовать решению проблемы низкой скорости клеточной инфильтрации, потенциально создавая условия для улучшения васкуляризации и репопуляции имплантата. В ходе данного исследования количественная оценка скорости и глубины миграции клеток не проводилась, основное внимание было уделено качественной демонстрации принципиальной возможности клеточной инфильтрации и васкуляризации децеллюляризованных матриксов через лазерные каналы. Для точной сравнительной оценки эффективности метода требуются дальнейшие исследования с применением количественных гистоморфометрических методов анализа.

Заключение

В результате проведенного исследования разработан и оптимизирован протокол децеллюляризации на основе комбинации 0,5 % додецилсульфата натрия и 0,5 % дезоксихолата натрия с продолжительностью обработки 16 часов, который обеспечивает полное удаление клеточного материала при сохранении структурной целостности и механических свойств внеклеточного матрикса. Также было установлено, что лазерная перфорация поверхности децеллюляризованных матриксов может быть перспективным методом для стимуляции заселения бесклеточного графта клетками фибробластного ряда и усиления

ангиогенеза в зоне имплантации. При этом ключевым достижением является сохранение биосовместимости материала после лазерной модификации. Следует отметить, что данное исследование имело ряд ограничений. Во-первых, оценка проводилась на относительно небольшой выборке животных и в рамках краткосрочного эксперимента. Во-вторых, модель подкожной имплантации, хотя и является стандартной для оценки биосовместимости, не в полной мере воспроизводит механические и гемодинамические нагрузки, характерные для среды сердечного клапана. В-третьих, исследование было сфокусировано на морфологическом анализе, тогда как функциональные свойства матриксов (например, механическая прочность, устойчивость к кальцификации) требуют дальнейшего изучения. В дальнейших исследованиях для подтверждения клинического потенциала метода также планируется изучить долгосрочные эффекты имплантации, оптимизировать параметры лазерной обработки (глубину, диаметр и плотность каналов) для достижения максимальной эффективности репопуляции и васкуляризации, а также провести функциональные испытания в более физиологически релевантных моделях. Таким образом, комбинация лазерной перфорации с методами тканевой инженерии открывает новые возможности для создания усовершенствованных биопротезов, которые в перспективе смогут сочетать долговечность механических клапанов и биосовместимость аллогенных трансплантатов.

Список литературы / References

1. Waqanivalagi S.W.F.R., Bhat S., Ground M.B., Milsom P.F., Cornish J. Clinical performance of decellularized heart valves versus standard tissue conduits: a systematic review and meta-analysis. *J Cardiothorac Surg.* 2020;15(1):260. PMID: 32948234; PMCID: PMC7501674. <https://doi.org/10.1186/s13019-020-01292-y>
2. Arabkhani B., Bekkers J.A., Andrinopoulou E.R., Roos-Hesselink J.W., Takkenberg J.J., Bogers A.J. Allografts in aortic position: Insights from a 27-year, single-center prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;152(6):1572-1579.e3. PMID: 27842683. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.08.013>
3. Демидов Д.П., Астапов Д.А., Богачев-Прокофьев А.В., Железнев С.И. Оценка качества жизни после протезирования аортального клапана биологическими протезами у пациентов пожилого возраста. *Патология кровообращения и кардиохирургия.* 2017;21(3):40-47. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2017-3-40-47>
Demidov D.P., Astaspov D.A., Bogachev-Prokophiev A.V., Zheleznev S.I. Quality of life after aortic valve replacement with biological prostheses in elderly patients. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery.* 2017;21(3):40-47. (In Russ.) <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2017-3-40-47>
4. Hirji S.A., Kolkailah A.A., Ramirez-Del Val F., Lee J., McGurk S., Pelletier M., Singh S., Mallidi H.R., Aranki S., Shekar P., Kaneko T. Mechanical Versus Bioprosthetic Aortic Valve Replacement in Patients Aged 50 Years and Younger. *Ann Thorac Surg.* 2018;106(4):1113-1120. PMID: 29966596. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.05.073>
5. David T. How to Decide Between a Bioprosthetic and Mechanical Valve. *Can J Cardiol.* 2021;37(7):1121-1123. PMID: 33002585. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.09.011>
6. Horke A., Tudorache I., Laufer G., Andreas M., Pomar J.L., Perea D., Quintana E., Sitges M., Meyns B., Rega F., Hazekamp M., Hübler M., Schmiady M., Pepper J., Rosendahl U., Lichtenberg A., Akhyari P., Jashari R., Boethig D., Bobylev D., Avsar M., Cebotari S., Haverich A., Sarikouch S. Early results from a prospective, single-arm European trial on decellularized allografts for aortic valve replacement: the ARISE study and ARISE Registry data. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2020;58(5):1045-1053. PMID: 32386409; PMCID: PMC7577293. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa100>
7. Спиридонов С.В., Одинцов В.О., Щетинко Н.Н., Мозгова Е.А., Гринчук И.И., Островский Ю.П. Аортальные аллогraftы в мировой кардиохирургии: исторические аспекты внедрения в клиническую практику и обзор результатов использования. *Медицинский журнал.* 2015;1:55-67.

- Spirydonau S.V., Adzintsov V.O., Shchatsinka N.N., Mazgova E.A., Hrynchuk I.I., Ostrovsky Yu.P. Aortic allografts in the world cardiac surgery: historical aspects of clinical implementation, and review of implantation outcomes. *Meditsinskii zhurnal*. 2015;1:55-67. (In Russ.)
8. Fioretta E.S., von Boehmer L., Motta S.E., Lintas V., Hoerstrup S.P., Emmert M.Y. Cardiovascular tissue engineering: From basic science to clinical application. *Exp Gerontol*. 2019;117:1-12. PMID: 29604404. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.03.022>
 9. VeDepo M.C., Detamore M.S., Hopkins R.A., Converse G.L. Recellularization of decellularized heart valves: Progress toward the tissue-engineered heart valve. *J Tissue Eng*. 2017;8:2041731417726327. PMID: 28890780; PMCID: PMC5574480. <https://doi.org/10.1177/2041731417726327>
 10. Cebotari S., Tudorache I., Ciubotaru A., Boethig D., Sarikouch S., Goerler A., Lichtenberg A., Cheptanaru E., Barnaciuc S., Cazacu A., Maliga O., Repin O., Maniuc L., Breyman T., Haverich A. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation*. 2011;124(11 Suppl):S115-23. PMID: 21911800. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.012161>
 11. Argento G., Simonet M., Oomens C.W., Baaijens F.P. Multi-scale mechanical characterization of scaffolds for heart valve tissue engineering. *J Biomech*. 2012;45(16):2893-8. PMID: 22999107. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.07.037>
 12. Converse G.L., Armstrong M., Quinn R.W., Buse E.E., Cromwell M.L., Moriarty S.J., Lofland G.K., Hilbert S.L., Hopkins R.A. Effects of cryopreservation, decellularization and novel extracellular matrix conditioning on the quasi-static and time-dependent properties of the pulmonary valve leaflet. *Acta Biomater*. 2012;8(7):2722-9. PMID: 22484150. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.047>
 13. Tefft B.J., Choe J.A., Young M.D., Hennessy R.S., Morse D.W., Bouchard J.A., Hedberg H.J., Consiglio J.F., Dragomir-Daescu D., Simari R.D., Lerman A. Cardiac Valve Bioreactor for Physiological Conditioning and Hydrodynamic Performance Assessment. *Cardiovasc Eng Technol*. 2019;10(1):80-94. PMID: 30311149; PMCID: PMC6541400. <https://doi.org/10.1007/s13239-018-00382-2>
 14. Converse G.L., Buse E.E., Neill K.R., McFall C.R., Lewis H.N., VeDepo M.C., Quinn R.W., Hopkins R.A. Design and efficacy of a single-use bioreactor for heart valve tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(2):249-259. PMID: 26469196. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33552>
 15. Koenig F., Lee J.S., Akra B., Hollweck T., Wintermantel E., Hagl C., Thierfelder N. Is Transcatheter Aortic Valve Implantation of Living Tissue-Engineered Valves Feasible? An In Vitro Evaluation Utilizing a Decellularized and Reseeded Biohybrid Valve. *Artif Organs*. 2016;40(8):727-37. PMID: 27187768. <https://doi.org/10.1111/aor.12683>
 16. Parvin Nejad S., Blaser M.C., Santerre J.P., Caldaroni C.A., Simmons C.A. Biomechanical conditioning of tissue engineered heart valves: Too much of a good thing? *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;96:161-75. PMID: 26555371. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.003>
 17. Berry J.L., Steen J.A., Koudy Williams J., Jordan J.E., Atala A., Yoo J.J. Bioreactors for development of tissue engineered heart valves. *Ann Biomed Eng*. 2010;38(11):3272-9. PMID: 20820920. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-0148-6>
 18. VeDepo M.C., Buse E.E., Paul A., Converse G.L., Hopkins R.A. Non-physiologic Bioreactor Processing Conditions for Heart Valve Tissue Engineering. *Cardiovasc Eng Technol*. 2019;10(4):628-637. PMID: 31650518. <https://doi.org/10.1007/s13239-019-00438-x>
 19. Mendibil U., Ruiz-Hernandez R., Retegi-Carrion S., Garcia-Urquia N., Olalde-Graells B., Abarrategi A. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5447. PMID: 32751654; PMCID: PMC7432490. <https://doi.org/10.3390/ijms21155447>
 20. Roosens A., Asadian M., De Geyter N., Somers P., Cornelissen R. Complete Static Repopulation of Decellularized Porcine Tissues for Heart Valve Engineering: An *in vitro* Study. *Cells Tissues Organs*. 2017;204(5-6):270-282. PMID: 29131080. <https://doi.org/10.1159/000480660>
 21. Theodoridis K., Tudorache I., Calistru A., Cebotari S., Meyer T., Sarikouch S., Bara C., Brehm R., Haverich A., Hilfiker A. Successful matrix guided tissue regeneration of decellularized pulmonary heart valve allografts in elderly sheep. *Biomaterials*. 2015;52:221-8. PMID: 25818428. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.023>
 22. Badria A.F., Koutsoukos P.G., Mavrilas D. Decellularized tissue-engineered heart valves calcification: what do animal and clinical studies tell us? *J Mater Sci Mater Med*. 2020;31(12):132. PMID: 33278023; PMCID: PMC7719105. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06462-x>
 23. Bergmeister H., Boeck P., Kasimir M.T., Fleck T., Fitzal F., Husinsky W., Mittlboeck M., Stoehr H.G., Losert U., Wolner E., Grabenwoeger M. Effect of laser perforation on the remodeling of acellular matrix grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;74(1):495-503. PMID: 15912530. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30228>
 24. Васильева М.Б., Кузнецова Е.В., Русакова Я.Л., Чепелева Е.В., Сергеевичев Д.С., Журавлева И.Ю. Механические свойства нативной и децеллюляризованной стенки аорты после длительного хранения в биоцидных растворах. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021;23(4):86-94. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-4-86-94>
Vasilyeva M.B., Kuznetsova E.V., Rusakova Ya.L., Chepeleva E.V., Sergeevichev D.S., Juravleva I.Yu. Mechanical properties of native and decellularized aortic wall after long-term storage in biocide solutions. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2021;23(4):86-94. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-4-86-94>
 25. Tzavellas N.P., Simos Y.V., Tsamis K.I., Markopoulos G.S., Lekkas P., Peschos D., Lakkas L. Decellularized scaffolds and heart valve treatment: present techniques, long-standing hurdles and the challenging future. *Biomater Adv*. 2025;177:214367. PMID: 40505382. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2025.214367>
 26. Mangani S., Vetoulas M., Mineschou K., Spanopoulos K., Vivanco M.D., Piperigkou Z., Karamanos N.K. Design and Applications of Extracellular Matrix Scaffolds in Tissue Engineering and Regeneration. *Cells*. 2025;14(14):1076. PMID: 40710329; PMCID: PMC12293650. <https://doi.org/10.3390/cells14141076>
 27. Rabbani M., Zakian N., Alimoradi N. Contribution of Physical Methods in Decellularization of Animal Tissues. *J Med Signals Sens*. 2021;11(1):1-11. PMID: 34026585. PMCID: PMC8043117. https://doi.org/10.4103/jmss.jmss_2_20
 28. Васильева М.Б., Сергеевичев Д.С., Юношев А.С., Ларионов П.М., Новрузов Р.Б., Караськов А.М. Морфофункциональная оценка ферментативного и детергентного способов децеллюляризации сердечных аллогraftов. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2012;(16)2:77-80. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2012-2-77-80>
Vasilyeva M.B., Sergeevichev D.S., Yunoshev A.S., Larionov P.M., Novruzov R.B., Karaskov A.M. Morphofunctional assessment of

- enzymatic and detergent methods of decellularization of cardiac allografts. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2012;(16)2:77–80. (In Russ.) <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2012-2-77-80>
29. Liao J., Joyce E.M., Sacks M.S. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. *Biomaterials*. 2008;29(8):1065-1074. PMID: 18096223; PMCID: PMC2253688. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.007>
30. Сергеевичев Д.С., Сергеевичева В.В., Субботовская А.И., Подхватилина Н.А., Васильев В.Ю., Русакова Я.Л. Токсическое влияние детергентов на мезенхимальные стромальные клетки человека при заселении графтов. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2013;17(2):67–71. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2013-2-67-71>
- Sergeevichev D. S., Sergeevicheva V. V., Subbotovskaya A. I., Podkhvatilina N. A., Vasiliev V. Yu., Rusakova Ya. L. Toxic effect of detergents on human mesenchymal stromal cells during graft colonization. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2013;17(2):67-71. (In Russ.) <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2013-2-67-71>
31. Grabenwöger M., Fitzal F., Sider J., Csekö C., Bergmeister H., Schima H., Husinsky W., Böck P., Wolner E. Endothelialization of biosynthetic vascular prostheses after laser perforation. *Ann Thorac Surg*. 1998;66(6 Suppl):S110-4. PMID: 9930428. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(98\)00982-5](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(98)00982-5)
32. Anderson J.M. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res*. 2001;31(1):81-110. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.31.1.81>
33. Иванов А.В., Липатов В.А., Лазаренко С.В., Жердев Н.Н., Северинов Д.А. Исследование реакции тканей лабораторных животных на имплантацию новых образцов сосудистых эндопротезов. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2016;20(2):87-94. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2016-2-87-94>
- Ivanov A.V., Lipatov V.A., Lazarenko S.V., Zherdev N.N., Severinov D.A. Studying the response of tissues of laboratory animals to implantation of vascular endoprotheses. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2016;20(2):87-94. (In Russ.) <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2016-2-87-94>
34. Мелконян К.И., Накохов Р.З., Русинова Т.В., Козмай Я.А., Быков И.М., Редько А.Н., Алексеенко С.Н. Показатели цитокинового профиля в сыворотке крови крыс при подкожной имплантации децеллюляризованного матрикса пищевода. *Гены и клетки*. 2020;15(4):46-56. <https://doi.org/10.23868/202012008>
- Melkonyan K.I., Nakokhov R.Z., Rusinova T.V., Kozmai Y.A., Bykov I.M., Redko A.N., Alekseenko S.N. Serum cytokine profile indicators after subcutaneous implantation of the decellularized esophagus matrix in rats. *Genes & Cells*. 2020;15(4):46-56. (In Russ.) <https://doi.org/10.23868/202012008>
35. Adam K., Günay H., Vaske B., Flohr M., Staufenbiel I. The granulation tissue preservation technique in regenerative periodontal surgery—a randomized controlled clinical trial. *Clin Exp Dent Res*. 2022;8(1):9-19. PMID: 35018724; PMCID: PMC8874108. <https://doi.org/10.1002/cre2.532>