*Сокол Анатолій Анатолійович, молодший науковий співробітник відділу кардіорадіології ДУ &laquo;Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України&raquo;. Назва дисертації:&laquo;Біотехнологічні основи отримання біоімпланту для використання у кардіохірургії&raquo;. Шифр та назва спеціальності 03.00.20 біотехнологія. Спецрада Д 26.002.28 Національного технічного університету України &laquo;Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського&raquo;*

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ «КИЇВСЬКИЙ  
ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА

“НАУКОВО - ПРАКТИЧНИЙ МЕДИЧНИЙ ЦЕНТР ДИТЯЧОЇ  
КАРДІОЛОГІЇ ТА КАРДІОХІРУРГІЇ”

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

СОКОЛ АНАТОЛІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК: 57.085.2:573.6:611.126

ДИСЕРТАЦІЯ

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ОТРИМАННЯ БІОІМПЛАНТУ ДЛЯ  
ВИКОРИСТАННЯ У КАРДІОХІРУРГІЇ

03.00.20 - «Біотехнологія»

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело А.А. Сокол

Науковий керівник:

Галкін Олександр Юрійович, доктор біологічних наук, професор

Київ-2021

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 18

[ВСТУП 19](#bookmark2)

[РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 27](#bookmark3)

1. Сучасні потреби кардіохірургії у використанні імплантів для корекції вад

серця 27

1. [Класифікація імплантів, що використовуються у кардіохірургії 30](#bookmark5)
2. [Способи виготовлення біоімплантів для кардіохірургії 35](#bookmark9)
3. Різновид біоматеріалу для виготовлення кардіохірургічних імплантів .. .42
4. Особливості використання перикарду великої рогатої худоби для

виготовлення кардіоімплантів 44

1. Вимоги до тканин ксенотрансплантанту для його використання у

кардіохірургії 47

[РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ 52](#bookmark14)

[2.1 Матеріали і методи досліджень 52](#bookmark15)

1. [Перикард великої рогатої худоби 52](#bookmark16)
2. Культури клітин 54
3. Лабораторні/експериментальні тварини 54
4. [Технологія виготовлення децелюляризованого матриксу 55](#bookmark17)
5. Визначення/вимірювання (дослідження) механічних властивостей

децелюляризованого матриксу 57

1. Фарбування препаратів гематоксилін еозином, Конго та триколором по

Масону 60

1. [Фарбування за методом DAPI 62](#bookmark20)
2. Спектрофлуометричний метод визначення концентрації нуклеїнових

кислот 62

1. Стабілізація децелюляризованого матриксу методом зшивання

NHS/EDC 63

1. [Визначення цитотоксичності 63](#bookmark23)
2. [Визначення біосумісності матеріалів 64](#bookmark25)
3. Методи математичного аналізу та статистичної обробки отриманих

даних 67

РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ОСНОВ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОІМПЛАНТУ 68

1. Порівняльна оцінка методів/способів отримання децелюляризованого

матриксу 68

1. Характеристика біомеханічних властивостей децелюляризованого

матриксу 77

1. Оцінка якості процесу децелюляризації зразків перикарду великої

рогатої худоби 80

1. Використання методу фарбування гематоксилін еозином для

виявлення клітинних копмпонентів матеріалу у зразках децелюляризованого матриксу 81

1. Використання методу фарбування DAPI для виявлення залишків

ядерного матеріалу у зразках децелюляризованого матриксу 85

1. Визначення концентрації нуклеїнових кислот у зразках

децелюляризованого матриксу методом спектрофлуометрії 89

[РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ БЕЗПЕЧНОСТІ БІОІМПЛАНТУ 94](#bookmark35)

1. Вивчення цитотоксичних та інтегративних властивостей

децелюляризованого матриксу *in vitro* 94

1. Дослідження біосумісності децелюляризованого матриксу в умовах *in*

*vivo* 106

РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ (ОБГОВОРЕННЯ)

РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ 117

[ВИСНОВКИ 131](#bookmark41)

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 135

ДОДАТКИ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВРХ - велика рогата худоба ВВС - вроджені вади серця

ДПМ - децелюляризований позаклітинний матрикс ЕТС - ембріональна теляча сироватка SDS - додецилсульфат натрію

NHS/EDC-1 -етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімід/гідроксисукцинімід 2 MES - етансульфонова кислота

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. На сьогодні серцево-судинні захворювання є основними причинами смертності у світі. Згідно даних Всесвітньої організації охорони здоров’я (ВООЗ), хвороби серця забирають понад 17 мільйонів життів щороку, що складає 31% усіх випадків смертності [165]. В Україні дана група захворювань є причиною 67% усіх летальних випадків серед дорослого населення та 30 % загальної смертності серед новонароджених. Щорічно майже 25 тис. українців потребують проведення процедур ургентного коронарного стентування у випадках гострого інфаркту міокарда [МОЗ України, 2020]. Вроджені вади серця (ВВС) зустрічаються з частотою близько 9% [82]. На сьогоднішній день кардіохірургічні операції виконуються майже при всіх ВВС, де в більшості випадків проводиться повна анатомічна корекція із використанням штучних імплантів. Загальна післяопераційна летальність при даних оперативних втручаннях в провідних клініках світу становить менше 3%. В той час як в ДУ «Науково- практичному медичному центрі дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України» за даними 2017 року цей показник складав 1,4% від всіх корекції ВВС у пацієнтів різного віку. Однак використання штучних протезів має низку недоліків, що значно погіршують якість життя пацієнтів у післяопераційний період. Близько третини прооперованих потребують повторних хірургічних втручань у різні терміни у віддаленому періоді. Це пов’язано з тим, що дитячий організм має унікальну здатність рости, а матеріали, які використовуються на сьогоднішній день в кардіохірургії, на жаль, не ростуть разом з пацієнтом. Так, при імплантації кондуїту в легеневу позицію на перших місяцях життя до досягнення дорослого віку пацієнту буде проведено 2-3 операції по заміні протезу в легеневій позиції на більший за розміром. Зазвичай пацієнтам необхідно проводити пожиттєву антикоагуляційну терапію. Перспективним напрямком в подоланні вищезазначених проблем може бути використання біологічних імплантів.

Проте і їх використання обумовлює низку невирішених проблем, таких як повна або часткова біодеградація та кальцифікація після імплантації [141].

В світовій медичній практиці дедалі частіше використовують біоімпланти виготовленні із ксенотканин, наприклад із перикарду свиней, коней, великої рогатої худоби (ВРХ). За еластичністю такий матеріал близький до тканин людини [166]. Для отримання такого імпланту нативний матеріал піддається біотехнологічній трансформації - децелюляризації, при якій проходить повна елімінація клітин донора і очистка від антигенних молекул зі збереженням структури позаклітинного матриксу. Отже, тканинна інженерія виконує своє завдання по створенню ***in vitro*** таких тканинних компонентів, імплантація яких в організмі реципієнта призводить до регенерації пошкоджених або нефункціональних тканин та органів за рахунок контролю стимуляції клітин-мішеней. Передбачається, що організм сам себе виліковує за рахунок доставки в необхідну ділянку молекулярних сигналів, клітин і/або підтримуючих конструкцій. Засобами доставки цих клітин являються скафолди, очищенні позаклітинні структури біоімпланту, що виконують роль матриці на якій відбувається трансформація клітин в необхідну тканину з формуванням визначеної конструкції [162].

На сьогодні біотехнологічні схеми із використанням різних видів ксенотканин успішно застосовують для створення органних і тканинних імплантів, зокрема клапанів серця, міокарда, перикарда, судин, легень, підшлункової залози, нирок, печінки, молочних залоз [98]. Біотехнологічно траснформовані ксеногенні скафолди (безклітинні колагеново-еластинові каркаси), успішно використовуються в медичній практиці для тканинної інженерії та регенеративної медицини [167]. Децелюляризований позаклітинний матрикс (ДПМ), виготовлений із ксеноперикарда (ВРХ) є перспективним біоматеріалом для відновлення серцево-судинної тканини, оскільки структура колаген - еластинового компоненту каркасу задовільно зберігається, а антигенні молекули належним чином елімінуються і тим

самим знижується антигенність такого матеріалу [98, 120]. Широке

застосування даний матеріал знайшов в серцево-судинній хірургії, його використовують для корекції набутих і вроджених вад серця (закриття дефектів міжпередсердної і міжшлуночкової перегородок); створення штучних трикуспідального, мітрального і аортального клапанів серця; протезування та пластики судин, стулок клапанів серця; профілактики спайкових процесів у середостінні; біопротезування і пластики магістральних судин (пластика висхідної аорти); пластики кореня аорти [3, 11, 34, 44, 124]. Оскільки децелюляризований перикард має безліч властивостей, необхідних для використання в техніці заміни клапанної тканини, включаючи адекватні механічні властивості, мінімальну цитотоксичність, чудовий потенціал репопуляції клітин та схильність до ремоделювання матриксу [34, 44].

На жаль, на сьогодні як в Україні, так і в Світі, немає ідеального біоматеріалу, який би відповідав усім вимогам кардіохірургії і володів атромбогенністю, еластичністю, довговічністю, мінімальною антигенністю, відсутністю імуногенності і цитотоксичності, та міцністю, тобто був за своїми властивостями близьким до характеристик природних тканин. Тому продовжується пошук, розробка та вдосконалення методів біотехнологічної трансформації ксенотканини, які б могли забезпечити отримання високоякісного матеріалу.

Розробка нових біологічних матеріалів і біоімплантів є відносно новим науково-практичним напрямком, який інтенсивно розвивається на межі багатьох наук: біотехнології, медицини, хімії, біохімії, біофізики, гістології, генетики, імунології. Біотехнологічна розробка біосумісних матеріалів для кардіохірургії дозволить значно покращити якість життя дітей з ВВС, зменшити кількість повторних кардіохірургічних операцій, знизити вартість лікування.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертацію виконано в рамках науково-дослідних робіт: «Розробка та

дослідження нових біосумісних матеріалів для кардіохірургії» (ДР № 0119U001437) у лабораторії науково-діагностичного відділу координації наукових досліджень, впроваджень та захисту прав інтелектуальної власності, підготовки та підвищення кваліфікації кадрів і відділі кардіорадіології ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України» та «Розробка інноваційних біомедичних технологій та продуктів для діагностики та лікування патологій людини» (ДР № 0119U103789) на кафедрі трансляційної медичної

біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Мета і задачі дослідження. ***Мета роботи*** - обґрунтувати біотехнологію отримання тканинних імплантів на основі перикарда ВРХ.

Для досягнення поставленої мети необхідно було розв’язати такі задачі:

1. Провести експериментальну оцінку відтворюваності та ефективності існуючих технологій отримання тканинних імплантів, визначити їх критичні недоліки та теоретично обґрунтувати оригінальні модифікації технологій, що мають забезпечувати кращі показники якості, безпечності та біосумісності імплантів.
2. Провести порівняльні дослідження різних методів децелюляризації перикарда ВРХ і визначити характер морфологічних змін біоматеріалу після впливу іонних і неіонних детергентів у процесі децелюляризації (в умовах in vitro).
3. Дослідити ефективність очистки децелюляризованого

позаклітинного матриксу від донорських клітин.

1. Вивчити характер зміни пружно-міцнісних властивостей перикарда в процесі біотехнологічної трансформації.
2. Визначити цитотоксичний вплив децелюляризованого

позаклітинного матриксу на культуру клітин людини (в умовах ***in vitro).***

1. Дослідити динаміку тканинної реакції на ксенотрансплантацію імпланту, отриманого різними технологіями (в умовах ***in vivo).***

Об’ єкт дослідження - біотехнологія тканинних імплантів на основі перикарда ВРХ та їх біосумісність.

Предмет дослідження - методи децелюляризації перикарда ВРХ, морфологічні, імунобіологічні, біомеханічні, цитотоксичні характеристики трансформованого біоматеріалу та його біосумісність.

Методи дослідження: біохімічні, мікроскопічні, гістологічні,

молекулярно-генетичні, фізико-механічні, культуральні, статистичні,

цитотоксичний тест, ксеноімплантація лабораторним тваринам (біологічні).

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше в Україні розроблено оригінальну добре відтворювану

безглютаральдегідну біотехнологічну схему отримання ксенотрансплантату для використання в кардіохірургії на основі децелюляризованого матриксу перикада ВРХ. Експериментально доведено високу ефективність розробленої технології, безпечність отримуваного біоматеріалу ***in vitro*** та його біосумісність ***in vivo.***

Розроблено схему оцінки якості та безпечності ксеногенних

біоматеріалів, призначених для трансплантації у кардіохірургічній практиці, яка передбачає визначення ступеню очистки від антигенних молекул, вивчення біомеханічних властивостей, дослідження на цитотоксичність та біосумісності.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення біосумісних ксеногенних матеріалів (трансплантатів) для використання у кардіохірургії.

Практичне значення отриманих результатів. У результаті проведених експериментальних досліджень було відпрацьовано відтворювані методики оцінки якості біоімплантів для кардіохірургії, а також методи їх біологічного оцінювання згідно з вимогами стандартів серії ISO 10993 «Medical devices. Biological evaluation of medical devices».

Отриманий за розробленою технологією біоімплант характеризувався задовільними біомеханічними властивостями, антигенністю та відсутністю цитотоксичного впливу in vitro. Висока біосумісність отриманого імпланту, продемонстрована на експериментальних моделях in vivo (відсутність імуногенних реакцій, заміщення скафолду розростаючою незрілою сполучною тканиною, посилена васкуляризація), є підставою для проведення клінічних досліджень і подальшої сертифікації біоімпланту (Акт впровадження науково-методичної розробки від 18.12.2020 р., ДУ «Науково практичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України»).

Інформаційний лист № 226-2020 «Біотехнологічна схема отримання біоімпланту із перикарду великої рогатої худоби для потреб кардіохірургії» використовується органом з оцінки відповідності ТОВ «Імпрув Медикел» при оцінці відповідності медичних виробів, що регламентується постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753 «Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів» (Акт впровадження інформаційного листа від 18.12.2020 р.).

Результати роботи впроваджено у викладання курсів «Біоматеріали і біотехнології» та «Клітинна, тканинна та біофармацевтична інженерія» для студентів спеціальності 163 Біомедична інженерія на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського (довідка про використання результатів дисертаційної роботи від 14.12.2020 р.).

Особистий внесок здобувача. Результати роботи, що викладено в дисертації, одержані автором самостійно або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилося спільно з науковим керівником. Забір біологічного матеріалу та підготовку гістологічних препаратів проводили спільно з Н.В. Щоткіною та Д.А. Грековим. Визначення концентрації ДНК у децелюляризованих тканинах перикарда

ВРХ проводилося дисертантом особисто. Дослідження на розтяг і розрив децелюляризованого перикарда з визначенням біомеханічних властивостей проводилося дисертантом особисто. Підготовка кріозрізів і препаратів для флуоресцентної мікроскопії проводилася спільно з Н.В. Щоткіною. Культивування фібробластів людини на скафолдах із подальшим визначенням цитотоксичності проводили спільно з Д.А. Грековим. Імплантацію тканин в організм лабораторних тварин проводили разом із Г.І. Ємцем, серцевосудинним хірургом ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України». Представлені до захисту наукові результати отримано, статистично оброблено і проаналізовано дисертантом особисто. Спільно з науковим керівником підготували наукові публікації та розробили основні положення і висновки дисертації. Аналіз літературних даних за деякими темами проводили спільно із д.мед.н. І.М. Ємцем, д.мед.н. Н.М. Руденко, д.мед.н. О.М. Романюком, к.мед.н. А.А. Довгалюком.

Автор висловлює щиру вдячність доктору медичних наук, професору І.М. Ємцю за підтримку та цінні поради під час планування й виконання роботи.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідались і були обговорені на науково-практичних конференціях: IX International Conference «Medical physics - current state, issues, development directions. New technologies» (Київ, Україна, 23-25 вересня 2020); V International Scientific Conference «Actual problems of biochemistry, cell biology and physiology» (Дніпро, Україна, 1-2 жовтня 2020); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та медичної біохімії», присвяченій 100-річчю з дня народження проф. О.О. Столярчука (Вінниця, Україна, 15-16 жовтня 2020 р.); 15th Annual Ukrainian Forum on Congenital Heart Diseases (Київ, Україна, 22- 23 жовтня 2020); ІІІ Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, Україна, 19 листопада 2020 р.).

Публікація матеріалів. Основні положення роботи викладені в 10 наукових працях, у т.ч. у 5 статтях у наукових фахових виданнях (2 статті у виданнях України, що включені до міжнародної наукометричної бази Scopus, та 1 стаття у науковому виданні країни, що входить до Європейського Союзу), 5 тезах конгресів, з’їздів, наукових конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 161 сторінках друкованого тексту (117 сторінок основного змісту). Робота складається з наступних розділів: вступ; огляд літератури; матеріали і методи дослідження; 2 розділи власних досліджень і їх обговорення; аналіз і узагальнення результатів дослідження; висновки; список використаних джерел літератури; додаток. Список літератури включає 170 джерел, у тому числі 135 зарубіжних розміщених на 20 сторінках. Роботу ілюстровано 16 таблицями і 19 рисунками, з яких 12 мікрофотографій.

ВИСНОВКИ

У дисертації теоретично узагальнено й наведено нові шляхи розв’язання наукової задачі, що стосується розробки біотехнології створення тканинних імплантів для застосування в кардіохірургії. Результати досліджень дають змогу зробити такі висновки.

1. Розроблено п’ять оригінальних модифікованих технологій виготовлення децелюляризованого матриксу перикарда ВРХ, які відрізнялися за умовами процесингу, а саме: збільшення тривалості осмотичного лізису до 72 год; підвищення до +24 °С температурного режиму децелюляризації для Технології 3; підбір оптимального часу децелюляризації для Технологій 1, 2 - 42 доби, для Технології 3 - 14 діб, для Технології 4 - 28 діб, для Технології 5 - 35 діб; додано новий етап процесингу - крос-лінкінг.
2. На підставі результатів вивчення морфологічних змін децелюляризованих тканин перикарда ВРХ визначено найбільш ефективні технологічні схеми, що забезпечують повну елімінацію клітин донора. Модифіковані Технології 4 і 5, що передбачають використання ферменту трипсину + 1 % іонного детергенту SDS та 0,1 % SDS, продемонстрували задовільні децелюляризаційні властивості. Повна елімінація клітин донора після процесу очистки для Технології 4 фіксувалась через 14 днів, а для Технології 5 - через 21 день. Результати гістологічного дослідження показали відсутність ядрових елементів у тканин Технологій 1 і 2 на 28-й день культивування, а для Технології 3 такий результат зафіксовано вже на 14-й день біотехнологічного процесу. Для Технологій 1 і 3 відсутність клітинних елементів у тканин відзначена у 88,0 % (95 % ДІ 71,8-97,8 %) зразків, для Технології 2 - у 84,0 % (95 % ДІ 66,4-95,9 %) зразків, для Технології 4 - у 92,0 % (95 % ДІ 77,6- 99,4 %) зразків, для Технології 5 - у 96,0 % (95 % ДІ 84,3-100 %) зразків. Морфологічний аналіз структури тканини, обробленої 1 % SDS за кімнатної температури, відповідно до схеми Технології 3, показав зміну просторової Забір біоматеріалу (перикард великої рогатої худоби, 12-18-місячні бики) Децелюляризація Гістологічне дослідження децелюляризованого перикарда Молекулярногенетичне тестування Оцінка біомеханічних властивостей тканини Дослідження на цитотоксичність in vitro Дослідження на біосумісність in vivo (імплантація лабораторним тваринам) Біоімплант для клінічних тестувань структури колагенових волокон із незворотним і дегенеративним ефектом на тканину перикарда.
3. Визначено ступінь очистки від нуклеїнових кислот для досліджуваних

технологій. Люмінесценція за методом DAPI спостерігалась у зразків Технологій 1, 2 і 3 навіть при повній елімінації живих клітин, що свідчить про низький ступінь очистки від біомолекул при використанні таких детергентів, як гідроксид амонію, тритон Х-100 та 1 % SDS у

біотехнологічному процесі трансформації тканини. Найефективнішим очищення тканини ядрового матеріалу було при застосуванні трипсину + 1 % SDS та 0,1 % SDS. Для Технології 4 відсутність люмінісценції спостерігалась на 14-й день децелюляризації у 92,0 % (95 % ДІ 77,6-99,4 %) зразків, для Технології 5-у 96,0 % (95 % ДІ 84,3-100 %) зразків на 21-й день децелюляризації.

1. Показано зменшення кількості ДНК у біоімпланті при збільшенні часу процесингу в усіх тестових групах. Встановлено, що в Технологіях 4 і 5 видалення нуклеїнових кислот пройшло 99,9 % (р < 0,05), при детекції ДНК 0,54 ± 0,57 та 3,22 ± 0,87 нг/мг через 28 і 35 днів відповідно. ^Висока кількість біомолекул ядрового матеріалу фіксувалась при застосуванні протоколів 1 і 2, що становило 158 ± 18 і 128 ± 14 нг/мг відповідно навіть на 42-й день біотехнологічної трансформації перикарда ВРХ.
2. Визначено зміни пружно-міцнісних властивостей децелюляризованого різними технологіями перикарда ВРХ. Показано найнижчий рівень Fmax - максимальної сили розтягнення - (1,33 ± 0,75 кгс) для зразків Технології 3, що в 5 разів нижче (р < 0,01) порівняно з контролем (6,84 ± 0,70 кгс). Не встановлено ефективності використання технологічних протоколів 1 і 2 для отримання біоімпланту, де показники Fmax майже в 2 рази нижчі порівняно з нативним перикардом. Доведено наявність високих пружно-міцнісних властивостей для скафолдів, отриманих за технологічними схемами 4 і 5. Fmax унаслідок порушення цілісності матеріалу становила 7,28 ± 0,46 і 9,54 ± 0,65 кгс відповідно, що вище контролю (p < 0,05).
3. Показано, що децелюляризований позаклітинний матрикс перикарда ВРХ за допомогою трипсину в поєднанні з 1 % SDS не дає цитотоксичного ефекту при культивуванні протягом 1-го місяця. При спостереженні до 2-х місяців фіксується вогнищева деструкція фібробластів людини з морфологічними змінами структури волокон матриксу. Для Технології 4 відсутність цитотоксичного ефекту відзначена у 64,0 % (95 % ДІ 43,6-82,1 %) зразків, тоді як для Технології 5 - у 92,0 % (95 % ДІ 77,6-99,4 %) зразків (р = 0,04). Клітини були нормальної морфології, формували на поверхні скафолду рівномірні пласти, значна частина яких проникла в товщу тканини не більше ніж на 150-200 мкм.
4. Встановлено розвиток запальної реакції в м’язових волокнах лабораторних тварин при ксеноімплантації тканини, децелюляризованої за Технологією 4 з використанням 1 %-ного іонного детергенту SDS у поєднанні з ферментом трипсином і процесом крос-лінкінгу. Гістологічно доведено значне руйнування імпланту після 2-місячного експерименту in vivo, що свідчить про відторгнення цього скафолду і неможливість його подальшого використання в кардіохірургії.

Доведено високу біоінтергацію імпланту, децелюляризованого за Технологією 5 з використанням 0,1 % SDS із подальшим крос-лінкінгом. Гістологічне дослідження показало часткове заміщення матриксу розростаючою незрілою сполучною тканиною та посиленою її васкуляризацією з формуванням капілярів, наповнених еритроцитами. Відсутність запальної імунної реакції для Технології 5, що відзначена у 96,0 % (95% ДІ 84,3-100 %) зразків, доводить сприйнятливість біотехнологічно модифікованої тканини, що робить її перспективною для подальшої розробки до застосування в клінічній практиці.