

- planning systems in the state space (MIPRA) // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2020. Vol. 747 (1). P. 012097.
14. Aladin D.V., Varlamov O.O., Chuvikov D.A., Adamova L.E., Saraev D.V. Control of machines and robots: Creation of mivar decision-making systems for controlling autonomous tractors and special vehicles of the ministry of emergencies // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2020. Vol. 747 (1). P. 012098.
 15. Varlamov O.O., Aladin D.V., Adamova L.E., Chuvikov D.A., Saraev D.V. Creation of autonomous groups of combine harvesters and tractors for agriculture based on the Mivar decision-making systems «ROBO!RAZUM» // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2020. Vol. 819 (1). P. 012002.
 16. Aladin D.V., Varlamov O.O., Adamova L.E., Chuvikov D.A., Saraev D.V. Control of vehicles and robots: Creating of knowledge bases for mivar decision making systems robots and vehicles // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2020. Vol. 747 (1). P. 012099.
 17. Aladin D.V., Varlamov O.O., Adamova L.E., Chuvikov D.A., Fedoseev D.A. About the project developing «MIPRA» – the intelligent planner in the state space for vehicles, tractors, and robots based on the architectural solutions of the Mivar systems for traffic enforcement // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2020. Vol. 819 (1). P. 012006.
 18. Chernenkiy V., Gapanyuk Y., Terekhov V., Revunkov G., Kaganov Y. The hybrid intelligent information system approach as the basis for cognitive architecture // Procedia Computer Science. 2018. Vol. 145. PP. 143-152.
 19. Skvortsova M., Terekhov V., Grout V. A hybrid intelligent system for risk assessment based on unstructured data / Proceedings of the 2017 IEEE Russia Section Young Researchers in Electrical and Electronic Engineering Conference. ElConRus. 2017. Vol. 1. 7910616. PP. 560-564.
 20. Chernenkiy V.M., Gapanyuk Y.E., Revunkov G.I., Kaganov Y.T., Fedorenko Y.S., Minakova S.V. Using metagraph approach for complex domains description // CEUR Workshop Proceedings. 2017. Vol. 2022. PP. 342-349.
 21. Chernenkiy V., Gapanyuk Y., Revunkov G., Kaganov Y., Fedorenko Y. Metagraph Approach as a Data Model for Cognitive Architecture // Advances in Intelligent Systems and Computing. 2019. Vol. 848. PP. 50-55.
 22. Terekhov V.I., Chernenkiy I.M., Buklin S.V., Yakubov A.R. Cognitive Visualization in Management Decision Support Problems // Optical Memory and Neural Networks (Information Optics). 2019. Vol. 28 (1). PP. 27-35.
 23. Sukhobokov A.A. Business analytics and AGI in corporate management systems // Procedia Computer Science. 2018. Vol. 145. PP. 533-544.
 24. Sukhobokov A.A., Galimov R.Z., Zolotov A.A. A Strategic Management System Based on Systemic Learning Algorithm // Advances in Intelligent Systems and Computing. 2019. Vol. 848. PP. 290-295.

Хохон Ким,
магистрант,
кафедра ИУ-5,
ФГБОУ ВО «МГТУ им. Н.Э. Баумана»,
Дмитрий Алексеевич Чувилов,
канд. техн. наук, начальник отдела,
НИИ МИВАР,
Дмитрий Владимирович Аладин,
аспирант,
Олег Олегович Варламов,
д-р техн. наук, профессор,
кафедра ИУ-5,
ФГБОУ ВО «МГТУ им. Н.Э. Баумана»,
Лариса Евгеньевна Адамова,
канд. психолог. наук, доцент,
кафедра общей психологии
и психологии труда
АНО ВО «Российский новый университет»,
Вячеслав Георгиевич Осипов,
зам. директора,
НИИ МИВАР,
г. Москва,
e-mail: ovar@narod.ru

А.А. Венедиктов, М.В. Гурин, С.В. Евдокимов, Р.С. Фадеев

Оценка биосовместимости говяжьего сухожилия после экспериментальной обработки для протеза связки человека на модели *in vitro*

Аннотация

Повреждение сухожильно-связочного аппарата грозит серьезными последствиями для физической активности человека. Особенно часто происходят разрывы у физически здоровых людей, ведущих активный образ жизни, например у спортсменов. Для лечения этих травм в ортопедии и травматологии применяют аутопластические операции и установку протезов из синтетических и биологических материалов. На сегодняшний день протезы из биотканей все более интересны, так как при качественной обработке материала с целью удаления всех биокомпонентов кроме коллагенового каркаса, которые вызывают иммунный ответ и, как следствие, отторжение, они сохраняют биологическое строение и прочность. Очень перспективным и доступным для изготовления подобных протезов является говяжье сухожилие. В рассматриваемой работе для изготовления протеза связки применена методика обработки сырья, включающая в себя механическую обработку, химико-физические методы обработки и специальную обработку сверхкритическим флюидом углекислого газа с неионогенным поверхностно-активным веществом «Tween 80» для децеллюляризации, извлечения органических составляющих помимо коллагенового каркаса с целью придания материалу биосовместимых свойств при сохранении прочностных качеств. Были оценены биосовместимые свойства прототипа протеза связки человека из доступного материала – говяжьего сухожилия на модели *in vitro*.

Введение

Повреждение сухожильно-связочного аппарата является одной из наиболее актуальных и часто встречающихся причин, ограничивающих физическую деятельность людей, ведущих активный образ жизни [1]. Связки выполняют важнейшую

роль в организме, связывая кости между собой, – это полосы плотной соединительной ткани. Наибольшее значение в травматологии имеет передняя крестообразная связка (ПКС), направленная от бедренной к большеберцовой кости. Когда колено разогнуто, связка имеет среднюю длину 32 мм и ширину 7...12 мм. Она состоит из коллагеновых волокон. Волокна

внутри связки закручены под углом в 110 град. Связка является главной структурой в коленном суставе, так как она удерживает голень от смещения вперед и внутрь. Разрыв передней крестообразной связки является одним из наиболее частых причин серьезных костно-мышечных травм, характерных для физически активных людей [2]. Максимально допустимая теоретически нагрузка на переднюю крестообразную связку составляет от 734 (73,4 кгс/мм²) до 1725 Н (172,5 кгс/мм²), среднее значение для человека от 17 до 35 лет равно 1700 Н (170 кгс/мм²) [3]. Повреждениям коленного сустава (КС) подвержены лица наиболее трудоспособного и активного возраста, при этом мужчины травмируются в среднем в 2 раза чаще, чем женщины [4].

Совершенствование технологий артроскопической пластики передней крестообразной связки (ПКС) коленного сустава имеет высокую актуальность для травматологов-ортопедов на протяжении многих десятилетий [5]. В настоящее время в артроскопической хирургии дискуссионным остается вопрос выбора трансплантата для пластики передней крестообразной связки (ПКС) коленного сустава. С этой целью используются ауто- и аллотрансплантаты, а также синтетические протезы. В качестве аллотрансплантатов применяются консервированные различными методами донорские сухожилия. Искусственные протезы связок изготавливаются из прочных синтетических материалов, таких как капрон, лавсан, перилен, дакрон, полиэстер. К недостаткам аутопластики можно отнести увеличение времени оперативного вмешательства и его травматичности, наличие донорской раны и связанных с ней осложнений. Несмотря на многие значительные преимущества синтетических протезов ПКС, им также свойственны недостатки: рецидивирующие синовиты, низкая способность к трансформации, быстрое нарастание дегенеративно-дистрофических изменений в коленных суставах.

Этих недостатков лишены биологические протезы. К их преимуществам можно отнести варибельность размеров и структуры, увеличение запаса прочности, уменьшение случаев послеоперационного артрофиброза, улучшение косметического результата, уменьшение времени операции, возможность произвести замену сразу нескольких связок или использовать трансплантат при ревизионной операции. Недостатки алло- и ксенотрансплантатов заключаются в потенциальной возможности передачи инфекции, аутоиммунных реакций, т. е. отторжения, большем снижении их механических свойств, особенно в первые 6 месяцев. Эти проблемы связаны прежде всего с недостаточным удалением биологической составляющей, на которую отвечает организм реципиента [6], а также со снижением механической прочности материала, полученного путем обработки в агрессивных средах для удаления органического компонента. Стоит обратить особое внимание на пластические материалы биологического ксеногенного происхождения, в основе которых находится естественный белок соединительной ткани – коллаген. Биологические материалы обладают высокой схожестью по структуре с замещаемыми тканями организма, и они очень доступны.

Наиболее перспективным направлением на сегодняшний день является разработка биоимплантатов на основе коллагенсодержащих биотканей, таких как децеллюризованный ксеноперикард, для замещения дефектов ткани в реконструктивной хирургии [7], [8]. Однако для протеза связки, в особенности крестообразной связки, требуется исходный материал с очень высокими изначальными прочностными характеристиками, выдерживающий, как минимум, пороговые нагрузки свойственные связкам, по структуре наиболее сходный со связками; необходимо также иметь возможность подбора нужных для клиницистов размеров. Наиболее подходящим материалом по этим критериям являются сухожилия. Как уже было сказано, основными недостатками биологических материалов, в том числе и ксеногенного происхождения, являются способность инфицирования и иммуногенность благодаря наличию клеточных элементов и других биологических составляющих, что повышает риск аутоиммунных реакций и отторжения. При

создании ксенотрансплантатов, снижение иммуногенности, т. е. риска воспаления окружающих тканей и потенциального отторжения трансплантата, является приоритетным требованием предимплантационной обработки донорской ткани.

Одним из методов создания тканевых имплантов, применяемых в реконструктивно-восстановительной хирургии для улучшения репаративных процессов в поврежденных тканях, является девитализация исходной донорской ткани животных. Девитализация должна решать следующие задачи: предотвращение иммунологического конфликта путем удаления либо разрушения клеток донора из имплантируемого образца (децеллюризация), стабилизация структуры ткани (консервирование), сохранение адекватных биомеханических свойств, стерильность материала. Большинство способов получения тканевых биоимплантов из ксеногенных тканей основаны на продолжительной обработке различными детергентно-энзимными и консервирующими растворами (глутаровый альдегид, эпоксиэтиленгликоль), гипо- и гипертоническими растворами. Благодаря этим способам достигается продление их функциональной полноценности в постимплантационный период [9], [10]. Также известны способы обработки материала, в том числе говяжьего сухожилия, химико-физическими методами, включающими в себя применение солевых растворов, растворов перекиси водорода, растворов поверхностно-активных веществ, сахарного сиропа, замораживание и размораживание [11], [12].

Стоит обратить отдельное внимание на использование сверхкритического флюида диоксида углерода (СКФ-СО₂) совместно с поверхностно-активными веществами (детергентами), такими как додецилсульфат и «Tween 80» с этиловым спиртом, для полноценного удаления органических составляющих с сохранением естественной архитектоники и прочностных свойств материала [13]. Метод сверхкритической флюидной экстракции является весьма перспективным известным методом децеллюляции ксеноматериала. Сверхкритический диоксид углерода, содержащий небольшое количество азеотропобразователя, является подходящей средой для извлечения ядер клеток и клеточных мембран из искусственной ткани. Он способен проникать очень глубоко в материал и воздействовать на клетки. Механическая прочность ткани не снижается даже при длительной обработке [14]. Для предотвращения передачи инфекций любые ксенотрансплантаты, применяемые в качестве медицинских изделий, необходимо стерилизовать. Ряд исследований, посвященных применению сверхкритического флюида углерода в обработке биоматериала, говорят о его способности, ко всему прочему, инактивировать многие штаммы патогенных микроорганизмов, вирусов и прионов, потенциально передаваемых от биоматериала человеку, что является большим преимуществом в его использовании [15]-[17].

В связи с этим перспективной целью на данный момент является разработка методики девитализации животного сухожилия с оценкой биосовместимости полученного материала.

Материалы и методы

Выбор сырья

В качестве исходного донорского материала было выбрано говяжье сухожилие как очень доступное сырье. Были отобраны сухожилия сгибателя и разгибателя пальца КРС как наиболее подходящие по типоразмерам для поставленных клиницистами задач, прошедшие ветеринарный контроль перед забоем.

Методика обработки

Сухожилия вырезались, механически обрабатывались от внешних пленок, тщательно промывались в дистиллированной воде. Далее материал делился на 2 группы: 1 группа – контрольная и 2 – опытная – и обрабатывался по следующим схемам:

1-я группа: материал замораживали на 12 ч при –80 °С, лиофилизировали в «Vaco-5» в течение 3 ч;

2-я группа: испытываемый материал выдерживали в 7%-ном растворе NaCl 72, тщательно промывали от соли, затем замораживали при -80°C на 12 ч с оттаиванием при комнатной температуре в течение 3 ч, 2 цикла, потом помещали в 60%-ный сахарный сироп на 48 ч, промакивали на нетканой салфетке, расправляли по направлению волокон, затем помещали в «Tween 80» на 3 ч, извлекали и не промывая помещали в реактор установки сверхкритической флюидной экстракции «Waters» (США), обрабатывали при давлении 250...350 атм и температуре 35...45 $^{\circ}\text{C}$ из расчета 100 г жидкого углекислого газа на 1 г материала, по окончании обработки резко сбрасывали давление, материал извлекали, промакивали сухой салфеткой по поверхности и помещали в 1%-ный раствор перекиси водорода на 3 ч, промывали и погружали в 0,1%-ный раствор глутарового альдегида на 12 ч, тщательно промывали до полного прекращения пенистости, замораживали на 12 ч при -80°C и сушили в лиофильной сушке в течение 3 ч, затем снова обрабатывали сверхкритическим диоксидом углерода при давлении 350 атм и температуре 45 $^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ч.

Метод исследования

Изучали цитотоксическое воздействие образцов материала на мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека на модели *in vitro*. Исследовали фрагменты материала размером 10 х 10 мм от каждой группы, прошедшие обработку соответственно схемам обработки (1-я и 2-я группы). В работе использовали мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека. Клетки культивировали в среде «alfa MEM» («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», США), 40 мкг/мл сульфата гентамицина («Sigma-Aldrich», США), при 37 $^{\circ}\text{C}$, в условиях 5 % содержания CO_2 в воздухе. Культуру нормальных диплоидных фибробластов человека получали из участков кожи внутренней поверхности предплечья методом эксплантов. Эксплантат кожи размером 5 х 5 мм промывали в течение нескольких минут в фосфатном буфере, содержащем 400 мкг/мл сульфата гентамицина. Ткань механически измельчали на фрагменты размером 1...2 мм², далее фрагменты прикрепляли к поверхности культуральной посуды, подсушивали на воздухе в течение 5...7 мин, затем покрывали средой «alfa MEM» с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и инкубировали при 37 $^{\circ}\text{C}$ в условиях 5 % содержания CO_2 в воздухе. Смену среды около фрагментов осуществляли каждые 3...4 дня. После выхода клеток из фрагментов клетки открепляли от поверхности культурального пластика и определяли количество клеток. В экспериментах использовали клетки 1...4 пассажей. Субкультивирование клеток проводили в среде «alfa MEM» с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл сульфата гентамицина, при 37 $^{\circ}\text{C}$, в условиях 5 % содержания CO_2 в воздухе. Аспират костного мозга разводили 1:1 раствором Хенкса («Sigma-Aldrich», США) и проводили центрифугирование на градиенте «Histopaque-1077» («Sigma-Aldrich», США) при 800 G в течение 30 мин. Далее стерильной серологической пипеткой собирали клетки на границе раздела «Histopaque-1077» – жидкость, растворяли в среде «alfa MEM» (1:4) и центрифугировали при 400 G в течение 5 мин. Осадок, содержащий мононуклеарные клетки, ресуспендировали в среде «alfa MEM» с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и переносили в культуральную посуду. Далее клетки инкубировали в течение 48 ч при 37 $^{\circ}\text{C}$, в условиях 5 % содержания CO_2 в воздухе. После этого не прикрепившиеся к культуральной посуде клетки удаляли и продолжали культивирование прикрепившихся клеток. Смену питательной среды осуществляли каждые 2...3 дня. Клетки культивировали до достижения 70...80 % конfluence. В экспериментах использовали клетки 1...4 пассажей. Субкультивирование клеток проводили в среде «alfa MEM» с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл сульфата гентамицина, при 37 $^{\circ}\text{C}$, в условиях 5 % содержания CO_2 в воздухе. Определение количества живых и погибших клеток проводили посредством окрашивания клеток флуоресцентными красителями – кальцеином AM («Sigma-Aldrich», США) и йо-

дидом пропидия («Sigma-Aldrich», США). Клетки открепляли от поверхности образцов при помощи коктейля «Accutase». Клетки окрашивали в среде L-15 с 1 % эмбриональной телячьей сыворотки, содержащей 1 мкг/мл кальцеина AM и 2 мкг/мл йодида пропидия, в течение 25 мин при 37 $^{\circ}\text{C}$. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с использованием проточного цитометра «EPICS XL» («Beckman Coulter», США) [18]. Результаты опытов представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$). Опыты проводили не менее чем в трех повторях ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждения

Результаты поведения материала экспериментальных групп модели *in vitro* представлены на *рис. 1, 2*.

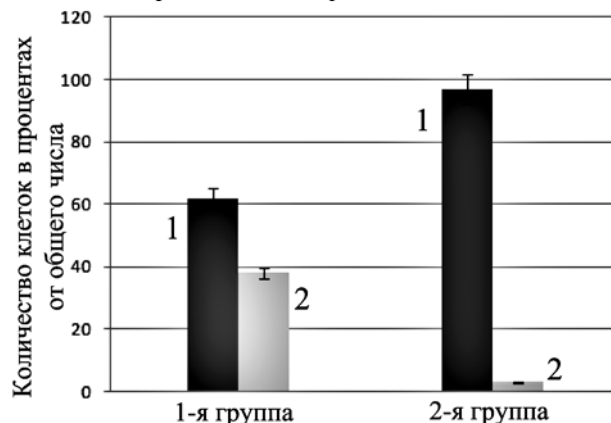


Рис. 1. Цитотоксическое действие экспериментальных биоматериалов через 24 ч в 1-й группе образцов: 1 – живые; 2 – погибшие

Из графика видно, что образцы 1-й группы (не прошедшие обработку по девитализации) обладали определенной цитотоксичностью через 24 ч культивирования на них мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека, тогда как у образцов 2-й группы (прошедших обработку по девитализации) показатели цитотоксичности были незначительны.

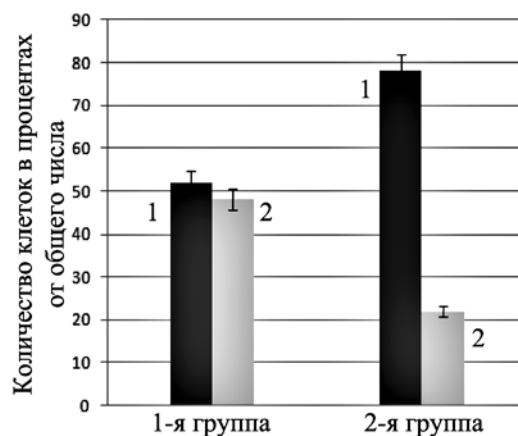


Рис. 2. Цитотоксическое действие экспериментальных биоматериалов через 96 ч во 2-й группе образцов: 1 – живые; 2 – погибшие

Через 96 ч культивирования цитотоксическое действие для образцов 1-й и 2-й групп говяжьего сухожилия повышалось, однако для 1-й группы повышение было весьма значительным, а для образцов 2-й группы наблюдался невысокий рост.

Выводы

Была произведена оценка предлагаемого экспериментального метода обработки говяжьего сухожилия для разработки протеза связок человека на модели *in vitro*.

Получены результаты, подтверждающие, что применение данного метода обработки повышает биосовместимые свойства материала, который делается гораздо менее цитотоксичным по отношению к материалу, не проходившему предложенный тип обработки.

Выбрано направление дальнейших исследований биосовместимых свойств материала. Требуется произвести дальнейшие исследования функциональных свойств на модели *in vivo*.

Список литературы:

1. Макаров С.А., Сергиенко С.А. Растяжение связок сухожилий и мышц // РМЖ. 2001. № 23. С. 1046.
2. Климов А.В., Глухов А.А. Повреждения передней крестообразной связки коленного сустава у спортсменов. Факторы риска и основные механизмы получения травм // NovaInfo. Медицинские науки. 2018. Т. 1. № 91. С. 140-145.
3. Евсеев В.И. Биомеханика повреждений коленного сустава / Монография. – М.: РУСАЙНС, 2018.
4. Лисицин М.П., Заремук А.М., Ткаченко Е.А., Бухарь С.В., Горевич И.И. Ревизионная хирургия передней крестообразной связки при ограничении разгибания в коленном суставе // Эндоскопическая хирургия. 2011. № 17 (6). С. 29-30.
5. Заяц В.В., Дулаев А. К., Дыдыкин А.В., Ульяновченко И.Н., Коломойцев А.В., Ковтун А.В. Анализ эффективности технологии артроскопической пластики передней крестообразной связки коленного сустава // Вестник хирургии. 2017. Т. 2. С. 77-82.
6. Рыбин А.В., Кузнецов И.А., Румакин В.П., Нетьлько Г.И., Ломая М.П. Экспериментально-морфологические аспекты несостоятельности сухожильных ауто- и аллотрансплантатов после реконструкции передней крестообразной связки коленного сустава в раннем послеоперационном периоде // Травматология и ортопедия. 2016. Т. 22. № 4. С. 60-75.
7. Белов Ю.В., Лысенко А.В., Леднев П.В., Салагаев Г.И. Применение заплаты из децеллюляризованного ксеноперикарда в хирургии брахиоцефальных артерий // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2018. Т. 11 (2). С. 31-34.
8. Сиваконь С.В., Девин И.В., Сретенский С.В., Чиж А.А., Космынин Д.А. Результаты применения протезов из ксеноперикарда в хирургическом лечении подкожных дегенеративных разрывов ахиллова сухожилия // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 6. С. 125-131.
9. Манченко А.А., Михайлова И.П., Сандомирский Б.П. Морфология тканевой реакции у крыс при подкожной имплантации ксеноперикарда и створок аортального клапана свиной, девитализированных криорационным методом // Оригинальные исследования. 2016. Т. 4. № 1. С. 30-38.
10. Сергеевичев Д.С., Сергеевичева В.В., Субботовская А.И., Васильева М.Б., Докучаева А.А., Краськов А.М., Козлов В.А. Децеллюляризация как способ предотвращения иммунного ответа на аллогенные легочные клапаны сердца // Гены и клетки. 2013. Т. 8. № 4. С. 55-60.
11. Педросо Д., Эли М. Ксеногенные имплантаты мягких тканей и способы изготовления и использования / RU 2665366 С2. 2018. Бюл. № 25.
12. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Зайнутдинова Г.Х., Кудоярова К.И., Лукьянова Е.Э. Способ получения трансплантата для офтальмофирургии / RU(11)2 607 185(13) С1. 2015. Бюл. № 1.
13. Бритиков Д.В., Чащин И.С., Хугаев Г.А., Бакулева Н.П. Девиализация аллогraftов сверхкритическим диоксидом углерода и детергентами. Экспериментальная оценка // Бюллетень НИЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2019. Т. 20. № 5. С. 389-459.
14. Sawada K., Terada D., Yamaoka T., Kitamura S., Fujisato T. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue // Chemical Technology and Biotechnology. 2008. Vol. 83. № 6. PP. 943-949.
15. Газизов Р.А., Шамсетдинов Ф.Н. Исследования инактивации *Bacillus atrophaeus* с использованием чистого и модифицированного сверхкритического диоксида углерода // Медицинские науки. 2018. № 12 (78). Ч. 1. С. 165-168.
16. Заленугин Д.Ю., Тилькунова Н.А., Чернышова И.В., Власов М.И. Стерилизация в сверхкритических средах // Сверхкритические флюиды. Теория и практика. 2015. Т. 10. № 4. С. 11-17.
17. Шадрин А.Ю., Мурзин А.А., Дормидонтова А.С., Суслов А.В., Суслова И.Н., Яровой Б.Ф. Действие сверхкритического CO₂ на клетки микроорганизмов экстремофилов // Сверхкритические флюиды. Теория и практика. 2009. Т. 4. № 2. С. 29-33.
18. Булкина Н.В., Зюлькина Л.А., Иванов П.В., Ведяева А.П., Шастин Е.Н., Кавтаева Г.Г. Исследование экспериментальных биоматериалов как биологических матриц для клеток *in vitro* // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 5. С. 177.

Алексей Александрович Венедиктов,
канд. биолог. наук, управляющий,
Максим Вячеславович Гурин,
инженер-исследователь,
ООО «Кардиоплант»,
Сергей Васильевич Евдокимов,
канд. техн. наук, управляющий,
ЗАО НПП «МедИнж»,
г. Пенза,
Роман Сергеевич Фадеев,
канд. биолог. наук, зав. лабораторией,
ФБУН «Институт теоретической
и экспериментальной биофизики РАН»,
г. Пуцино, Московская обл.,
e-mail: gmv7981@mail.ru

* * * * *