

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЩОТКІНА НАТАЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 602:616.12-089.843](043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОІНЖЕНЕРНІ ОСНОВИ ОТРИМАННЯ ЛІОФІЛІЗОВАНОГО
ТКАНИННОМОДИФІКОВАНОГО БІОСУМІСНОГО МАТРИКСУ
ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У КАРДІОХІРУРГІЇ**

163 – Біомедична інженерія

Подається на здобуття освітнього ступеня доктора філософії

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

_____ Н.В. Щоткіна

Науковий керівник: Галкін Олександр Юрійович, доктор біологічних наук,
професор

Київ-2023

АНОТАЦІЯ

Щоткіна Н.В. Біоінженерні основи отримання ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу для використання у кардіохірургії – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 163 – Біомедична інженерія. Національний технічний університет України “Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”, Київ, 2023.

Актуальність теми дослідження. На сьогодні в світі проводиться близько 275 тис. хірургічних операцій на рік з імплантації протезів серцевого клапана як механічного, так і біологічного походження. Однак їх використання має низку недоліків, таких як ризик тромбоемболії, потреба в довічній антикоагуляційній терапії (механічні протези), недовговічність і необхідність заміни протеза (біологічні). Альтернативою виступають біоімпланти, створені на основі ксенотканин (наприклад, коней, свиней, великої рогатої худоби (ВРХ)), що за своїми механічними та біологічними властивостями близькі до тканин організму людини. Імпланти, створені на основі позаклітинного матриксу, очищеного від клітин шляхом децелюляризації (біоінженерної трансформації) тканини, все частіше використовуються в реконструктивній та регенеративній медицині, оскільки забезпечують репопуляцію власними клітинами реципієнта, швидке зростання та відновлення. Крім того, такі біоімпланти вважаються менш схильними до кальцифікації та забезпечують ідеальні гемодинамічні параметри. За своїми біомеханічними властивостями позаклітинний матрикс мало відрізняється від власне перикардіальної тканини й тому підходить для використання при заміні серцевих клапанів у дорослих і корекції вроджених вад серця у дітей.

На європейському й американському ринках представлені комерційні ксенотрансплантати для кардіохірургії, децелюляризовані за різними методиками. Однак існує низка факторів, що обмежують їх застосування. По-перше, методики їх виготовлення здебільшого передбачають використання

цитотоксичних альдегідів, що може в одиничних випадках викликати відторгнення трансплантата. В той же час безглузарові матрикси зростають у вартості в 3-4 рази. Крім економічної складової, важливим аспектом є довготривалість сертифікації закордонної медичної продукції в Україні, що особливо ускладнено під час епідеміологічних обмежень і воєнного стану.

З огляду на гостру потребу медицини в якісному біологічному матеріалі вітчизняними науковцями була розроблена унікальна методика децелюляризації тканинномодифікованого матриксу перикарда ВРХ, що вже успішно пройшла стадію доклінічних досліджень. Однак для подальшої сертифікації продукту постало завдання в налагодженні економічно вигідного виробництва із дотриманням стандартів і законодавчих вимог. У той же час потребує подальшого дослідження вплив стерилізації та ліофілізації на властивості новостворених трансплантатів, що і визначає актуальність визначення оптимальних параметрів технології, адже і стерилізація, і ліофілізація можуть суттєво впливати на стабільність тканини. Таким чином, актуальність цього дослідження обумовлена необхідністю оптимізувати параметри процесу виробництва тканинномодифікованого матриксу та забезпечити довготривале зберігання продукту без втрати функціональних особливостей. Створення унікальної технологічної карти виробництва дасть змогу сертифікувати виріб медичного призначення і пришвидшить процес його застосування в кардіохірургічній практиці.

Метою роботи було обґрунтування біоінженерних підходів до одержання ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу на основі перикарда ВРХ, придатного для використання в кардіохірургії.

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

1) удосконалити схему отримання тканинномодифікованого матриксу із перикарда ВРХ на основі аналізу критичних точок технології для покращення якісних і техніко-економічних характеристик ксеногенного біоімпланта;

2) удосконалити схему стерилізації тканинномодифікованого

матриксу на основі перикарда ВРХ;

3) розробити технологічний прийом забезпечення стабільності тканинномодифікованого матриксу на основі перикарда ВРХ за умов довготривалого зберігання з використанням технології ліофілізації;

4) розробити апаратурну та технологічну схеми виробництва ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу на основі перикарда ВРХ.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше обґрунтовано та розроблено апаратурну та технологічну схеми отримання ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу перикарда ВРХ на основі високоефективного методу децелюляризації ксеногенного біоматеріалу, яка забезпечує технологічне та біоінженерне оснащення виробництва біоімпланта. Вперше науково обґрунтовано й розроблено алгоритм стерилізації та ліофілізації тканинномодифікованого матриксу зі збереженням архітекtonіки колаген-еластинового каркасу, що дає можливість використовувати його як біоімплант у кардіохірургічній практиці. Отриманий за розробленою схемою медичний виріб являє собою латку з перикарда ВРХ, призначену для усунення дефектів у серцево-судинній хірургії шляхом імплантації в організм донора.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи до створення та довготривалого зберігання біосумісних ксеногенних матеріалів (трансплантатів) для використання в кардіохірургії.

Практичне значення отриманих результатів. За результатами проведених експериментальних досліджень було отримано оптимізовану схему децелюляризації тканини перикарда ВРХ, що дало змогу більш ніж у 3 рази скоротити час виробництва біоімпланта. Визначення раціональних умов стерилізації шляхом опромінення та ліофілізації дає змогу зберегти структуру колаген-еластинового каркасу тканинномодифікованого матриксу, близьку за своїми характеристиками до нативного перикарда, що є важливим при кардіохірургічній пластиці.

Результати роботи впроваджено з 2022/23 н.р. 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 11.07.2022 р.) та у виробничому процесі товариства з обмеженою відповідальністю «ІКСПАНД» (довідка про використання результатів дисертаційної роботи від 30.01.2023 р.).

Основні положення роботи викладені в 11 наукових працях, у тому числі в 3 статтях у наукових фахових виданнях України за спеціальністю 163 - Біомедична інженерія, у 3 що включенні до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, у тому числі в 2 статтях у закордонних фахових виданнях, у 4 тезах конгресів, з’їздів, наукових конференцій.

Ключові слова: біоінженерія, біоімплант, ліофілізація, децелюляризація, ксенотканина, стерилізація.

ANNOTATION

Shchotkina N.V. Bioengineering foundations of obtaining lyophilized tissue-modified biocompatible matrix for use in cardiac surgery - qualification scientific work in manuscript form.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 163 - Biomedical Engineering. National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, 2023.

The relevance of the research topic is that currently, around 275,000 surgical operations are performed worldwide each year for the implantation of heart valve prostheses, both mechanical and biological. However, their use has several drawbacks, such as the risk of thromboembolism, the need for lifelong anticoagulant therapy (mechanical prostheses), short lifespan, and the need for prosthesis replacement (biological prostheses). An alternative is bioimplants created based on xenotissues (for example, horses, pigs, cattles), which have mechanical and

biological properties similar to human tissue. Implants, which are based on decellularized extracellular matrix tissue (bioengineering transformation), are increasingly used in reconstructive and regenerative medicine since they ensure repopulation by the recipient's own cells, rapid growth and regeneration. In addition, such bioimplants are considered less prone to calcification and provide better hemodynamic parameters. With its biomechanical properties, the extracellular matrix differs little from native pericardial tissue, making it suitable for replacing heart valves in adults and correcting congenital heart defects in children.

Commercial xenotransplants for cardiothoracic surgery, decellularized by various methods, are available on the European and American markets. However, there are several factors that limit their use. Firstly, the manufacturing methods mostly involve the use of cytotoxic aldehydes, which can, in rare cases, cause rejection of the transplant. Additionally, the cost of glutaraldehyde-free matrices has increased three to four times. Besides the economic component, an important aspect is the lengthy certification process of foreign medical products in Ukraine, which is particularly complicated during epidemiological restrictions and a state of war.

According to the current urgent need for medicine for high-quality biological material, domestic scientists have developed a unique method for decellularization of the tissue-modified matrix of the bovine pericardium, which has already successfully passed the stage of preclinical trials. However, the aim for further certification of the product is to establish an economically viable production process that complies with standards and legislative requirements. At the same time, the impact of sterilization and lyophilization on the properties of newly created transplants requires further research, which determines the relevance of defining optimal technology parameters, as both sterilization and lyophilization can significantly affect tissue stability. Thus, the relevance of this research is driven by the need to optimize the parameters of the tissue-modified matrix manufacturing process and ensure long-term storage of the product without loss of functional features. Creating a unique technological roadmap for manufacturing will allow certification of the medical device and speed up its use in cardiac surgical practice.

The aim of the work was to justify the bioengineering approaches to obtain a lyophilized tissue-modified biocompatible matrix based on the pericardium of cattle suitable for use in cardio surgery. To achieve the goal, the following tasks were necessary:

1. Improve the scheme for obtaining tissue-modified matrix from cattle pericardium based on the analysis of critical points of the technology to improve the qualitative and techno-economic characteristics of the xenogeneic bioimplant;
2. Improve the scheme for sterilization of tissue-modified matrix based on cattle pericardium;
3. Develop a technological process to ensure the stability of the tissue-modified matrix based on cattle pericardium under conditions of long-term storage using lyophilization technology;
4. Develop hardware and technological schemes for the production of lyophilized tissue-modified biocompatible matrix based on cattle pericardium.

Scientific novelty of the obtained results. For the first time, the hardware and technological schemes for obtaining a lyophilized tissue-modified biocompatible matrix of the cattle pericardium have been substantiated and developed based on a highly effective method of decellularization of xenogenic biomaterial, which provides technological and bioengineering equipment for the manufacturing of a bioimplant. For the first time, the algorithm for sterilization and lyophilization of tissue-modified matrix while preserving the architecture of the collagen-elastin framework has been scientifically substantiated and developed, which makes it possible to use it as a bioimplant in cardiovascular surgery. The medical device obtained according to the developed scheme is a patch from the cattle pericardium intended for eliminating defects in cardiovascular surgery by implantation into the donor's body.

The results of the work complement modern scientific and methodological approaches to the creation and long-term storage of biocompatible xenogenic materials (transplants) for use in cardiovascular surgery.

The practical significance of the obtained results. As a result of experimental studies, an optimized scheme for decellularization of the cattle pericardial tissue was developed, which made it possible to reduce the manufacturing time of the bioimplant by more than in 3 times. Determination of rational sterilization conditions by irradiation and lyophilization enables preservation of the collagen-elastin framework structure of the tissue-modified matrix, which is similar in its characteristics to the native pericardium and is important in cardiac surgical plasticity.

The results of the work have been implemented since the 2022/23 academic year in the courses "Biomaterials and Biotechnology" and "Cellular, Tissue, and Biopharmaceutical Engineering" for students of the specialty 163 - Biomedical Engineering at the Department of Translational Medical Bioengineering of Igor Sikorsky KPI (confirmation of the use of dissertation results from 11.07.2022), as well as in the manufacturing process of the limited liability company "IXPAND" (confirmation of the use of dissertation results from 30.01.2023).

The main provisions of the work are presented in 11 scientific works, including 3 articles in scientific specialized publications of Ukraine on the specialty 163 - Biomedical Engineering, 3 articles included in the international scientometric database Scopus, including in 2 articles in foreign specialized publications, in 4 abstracts of congresses, congresses, scientific conferences.

Keywords: *bioengineering, bioimplant, lyophilization, decellularization, xenotissue, sterilization.*

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

СТАТТІ У ФАХОВИХ І МІЖНАРОДНИХ ВИДАННЯХ

1. **Shchotkina NV.** Aspects of lyophilization of cardiac bioimplant. Innov Biosyst Bioeng. 2021;5(4):200-6. DOI: 10.20535/ibb.2021.5.4.239725. (входить до міжнародних наукометричних баз даних: DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, аналіз літературних даних, формування висновків і підготовка до друку.*

2. Пономаренко ДІ, Луценко ТМ, Пашук ВВ, **Щоткіна НВ**. Особливості формування технічної документації на медичні вироби, що імплантують. Біомедична інженерія і технологія. 2021;6. DOI: <https://doi.org/10.20535/2617-8974.2021.6.244561> (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, Dimensions, OpenAIRE). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків.*

3. A.A. Sokol, D.A. Grekov G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, **N.V. Shchotkina**, A. A. Dovghaliuk, N.M. Rudenko, I.M. Yemets. The efficiency of decellularization of bovine pericardium of different concentration of sodium dodecyl sulfate. Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2020. – Vol. 4, № 4. – P. 189–198. (Входить до міжнародних баз даних: DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*

4. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Galkin OYu, Yemets GI, Dolinchuk LV, Rudenko NM, Yemets IM. Optimized method of bovine pericardium decellularization for tissue engineering. Wiadomości Lekarskie. 2021 Apr;74(4):815-20. DOI: 10.36740/WLek202104101 (Республіка Польща) (входить до міжнародних наукометричних баз даних: PubMed/Medline, EBSCO, Scopus, Index Copernicus, Polish Medical Library (GBL), Polish Ministry of Science and Higher Education.). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

5. **Shchotkina N**, Sokol A, Dolinchuk L, Skorohod I, Filipov R, Shepeleva O, Rudenko N, Yemets I. Different type of matrix for cardiac implants: biomedical and bioengineering aspects (Review). Cell Organ Transplantol. 2021;9(1):54-58. DOI: 10.22494/cot.v9i1.122 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Scopus, Google scholar, Crossref). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*

6. Sokol AA, Grekov DA, Yemets GI, Galkin AYU, **Shchotkina NV**, Dovghaliuk AA, Telehuzova OV, Yemets IM. Comparison of bovine pericardium

decellularization protocols for production of biomaterial for cardiac surgery. *Biopolymers Cell.* 2020;36(5):392-403 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Scopus, SJR, BIOSIS Previews, DOAJ, EBSCO, Medical Journal Links тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*

7. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Dolinchuk LV, Galkin OYu, Yemets GI, Grekov DA, Dovghaliuk AA, Skorokhod IM, Shepeleva OV, Rudenko NM, Yemets IM. The Effect of sterilization on the bovine pericardium scaffold decellularized by the glutaraldehyde-free technology. *J Biomed Eng Biosci.* 2021;8:28-35. DOI: 10.11159/jbeb.2021.004 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, Portico, Crossref, Committee on Publication Ethics (COPE)). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ

8. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Yemets GI, Galkin OYu, Dolinchuk LV, Dovghaliuk AA, Skorokhod IM, Shepeleva OV, Rudenko NM, Yemets IM. Microarchitectonic of Decellularized Bovine Pericardium Matrix. In: *Proceedings of the 7th World Congress on New Technologies (NewTech'21); 2021 Aug; Prague. Paper No. ICBB 167. DOI: 10.11159/icbb21.167. Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

9. Palamarchuk Y, **Shchotkina N**. Modern tissue engineering of bovine pericardium scaffold for using in cardiac surgery. In: *Proceedings of XXII International R&D online conference for students and emerging researchers “Science and Technology of the XXI Century”; 2021 Nov 10; Kyiv. p. 22-3. Здобувачем проведені огляд літератури, підготовка до друку.*

10. **Щоткіна НВ**, Сокол АА, Долінчук ЛВ, Скороход ІМ, Галкін ОЮ. Оптимальні умови стерилізації тканинно модифікованого імпланту на основі перикарду великої рогатої худоби. В: *Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених з міжнародною участю “Актуальні*

питання клінічної медицини”; 2021 лист; Запоріжжя. с. 341-2. *Здобувачем проведени експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

11. Sokol AA, Grekov DA, Galkin OYu, Yemets GI, **Shchotkina NV**, Yemets IM. Features of manufacture of decellularized scaffolds for use in cardiac surgery. In: Proceedings of V International Scientific Conference on Actual Problem of Biochemistry, Cell Biology and Physiology; 2020 Oct 15-16; Dnipro. p. 121-3. *Здобувачем проведени огляд літератури, підготовка до друку.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1 Класифікація та характеристика різних типів матриксів для кардіоімплантів	25
1.1.1 Синтетичні матрикси	27
1.1.2 Натуральні матрикси	28
1.1.3 Екстрацелюлярний матрикс	31
1.2 Використання ліофілизованого екстрацелюлярного матриксу в кардіохірургії	34
1.3 Сучасні підходи до ліофілізації продуктів біологічного походження	37
1.4 Несприятливі аспекти при ліофілізації біологічних тканин	39
1.5 Методи стерилізації матриксів біологічного походження	43
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	47
2.1 Матеріали та обладнання	47
2.1.1 Біологічний об'єкт	47
2.1.2 Реактиви та обладнання	47
2.2 Методи дослідження	50
2.2.1 Біоінженерна трансформація перикарда ВРХ	50
2.2.2 Гістологічні методи, фарбування гематоксилін-еозином	51
2.2.3 Скануюча електронна мікроскопія	52
2.2.4 Спектрофлуометричний метод визначення концентрації нуклеїнових кислот	52
2.2.5 Біомеханічне тестування	53
2.2.6 Стерилізація методом радіонуклідного опромінення	54

	13
2.2.7 Контроль стерильності	54
2.2.8 Ліофілізація	55
2.2.9 Статистична обробка даних	56
РОЗДІЛ 3. УДОСКОНАЛЕННЯ СХЕМ ОТРИМАННЯ ТКАНИННОМОДІФІКОВАНОГО БІОСУМІСНОГО МАТРИКСУ НА ОСНОВІ ПЕРИКАРДА ВРХ	57
3.1 Оптимізація технологічних параметрів процесу біотехнологічної трансформації перикарда ВРХ	57
3.2 Оцінка фізико-біологічних параметрів тканинномодифікованого матриксу, отриманого за оптимізованою схемою	63
РОЗДІЛ 4. УДОСКОНАЛЕННЯ СХЕМ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ТА ЛІО— ФІЛІЗАЦІЇ ТКАНИННОМОДІФІКОВАНОГО БІОСУМІСНОГО МАТРИКСУ НА ОСНОВІ ПЕРИКАРДА ВРХ	68
4.1 Дослідження впливу різних концентрацій радіонуклідів на структуру колагенових волокон матриксу	69
4.2 Дослідження впливу різних доз радіаційного опромінення на біомеханічні властивості ТМБМ	73
4.3 Оцінка стерильності/контроль стерильності	77
4.4 Дослідження впливу різних режимів ліофілізації на структуру колагенових волокон ТМБМ	85
4.5 Дослідження впливу різних режимів ліофілізації на біомеханічні властивості ТМБМ	91
РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА АПАРАТУРНОЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМ ОТРИМАННЯ ЛІОФІЛІЗОВАНОГО ТКАНИННОМОДІФІКОВАНОГО МАТРИКСУ НА ОСНОВІ ПЕРИКАРДА ВРХ І РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ЙОГО СТАНДАРТИЗАЦІЇ	96

	14
5.1 Аналіз технологій виготовлення біоімплантів і шляхи модернізації процесу	96
5.2 Розроблення технологічного процесу виготовлення біоімплантів	102
5.3 Організація робіт і виробництва: проєктування, будівництво, введення в експлуатацію	115
5.4 Оцінка ризиків виробничого процесу отримання біоімплантів	119
5.5 Система оцінки якості виробництва біоімпланта	128
5.6 Методи контролю якості виробництва біоімпланта	133
РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ПАРАМЕТРІВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ БІОІМПЛАНТАТА НА ОСНОВІ ПЕРИКАРДА ВРХ І МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЙОГО ЯКОСТІ	138
ВИСНОВКИ	142
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	144
ДОДАТКИ	163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ТМБМ – тканинномодифікований біосумісний матрикс
- ЛТМБМ – ліофілізований тканинномодифікований біосумісний матрикс
- ВРХ – велика рогата худоба
- SDS – додецилсульфат натрію (sodium dodecyl sulfate)
- ЕСМ – екстрацелюлярний матрикс (extracellular matrix)
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- ISO – міжнародна організація зі стандартизації (International Organization for Standardization)
- СЕМ – скануюча електронна мікроскопія
- EDC/NHS – 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід/N-гідроксисукцинімід
- MES – 2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота
- ДСТУ – державний стандарт України
- НПАОП – нормативно-правові акти з охорони праці
- ДБН – державні будівельні норми
- НАПБ – нормативний акт із пожежної безпеки
- ДСН – державні санітарні норми
- СНиП – будівельні норми і правила
- ДСанПіН – державні санітарні правила і норми
- СМЗ – синтетичний миючий засіб
- ДР – допоміжні роботи
- Кт – контроль технологічний
- Кмб – контроль мікробіологічний

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. На сьогодні в світі проводиться близько 275 тис. хірургічних операцій на рік з імплантації протезів серцевого клапана як механічного, так і біологічного походження [1]. Однак їх використання має низку недоліків, таких як ризик тромбоемболії, потреба в довічній антикоагуляційній терапії (механічні протези), недовговічність і необхідність заміни протеза (біологічні). Альтернативою виступають біоімпланти, створені на основі ксенотканин (наприклад, коней, свиней, ВРХ), що за своїми механічними та біологічними властивостями близькі до тканин організму людини. Імпланти, створені на основі позаклітинного матриксу, очищеного від клітин шляхом децелюляризації (біоінженерної трансформації) тканини, все частіше використовуються в реконструктивній і регенеративній медицині, оскільки забезпечують репопуляцію власними клітинами реципієнта, швидке зростання та відновлення. Крім того, такі біоімпланти вважаються менш схильними до кальцифікації та забезпечують ідеальні гемодинамічні параметри. За своїми біомеханічними властивостями позаклітинний матрикс мало відрізняється від власне перикардіальної тканини й тому підходить для використання при заміні серцевих клапанів у дорослих і корекції вроджених вад серця у дітей [2].

На європейському й американському ринках представлені комерційні ксенотрансплантати для кардіохірургії, децелюляризовані за різними методиками [3–10]. Однак існує низка факторів, що обмежують їх застосування. По-перше, методики їх виготовлення здебільшого передбачають використання цитотоксичних альдегідів, що може в одиничних випадках викликати відторгнення трансплантата. В той же час безглутарові матрикси зростають у вартості в 3-4 рази. Крім економічної складової, важливим аспектом є довготривалість сертифікації закордонної медичної продукції в Україні, що особливо ускладнено під час епідеміологічних обмежень і воєнного стану.

З огляду на гостру потребу медицини в якісному біологічному матеріалі вітчизняні науковці розробили унікальну методику децелюляризації тканинномодифікованого матриксу перикарда ВРХ, що вже успішно пройшла стадію доклінічних досліджень [11]. Однак для подальшої сертифікації продукту постало завдання обґрунтувати біоінженерні параметри виробництва з дотриманням національних і міжнародних регуляторних вимог. У той же час потребує подальшого дослідження вплив умов стерилізації та ліофілізації на властивості новостворених трансплантатів, що і визначає актуальність підбору оптимальних параметрів методу та реагентів. Як стерилізація, так і ліофілізація можуть суттєво впливати на стабільність тканини [12–16], що потребує більш детального вивчення. Таким чином, актуальність цього дослідження обумовлена потребою в оптимізації параметрів процесу виробництва тканинномодифікованого матриксу та забезпеченні довготривалого зберігання продукту без втрати функціональних особливостей. Створення унікальної технологічної карти виробництва дасть змогу сертифікувати виріб медичного призначення та пришвидшить процес його застосування в кардіохірургічній практиці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано в рамках науково-дослідної роботи “Розробка інноваційних біомедичних технологій та продуктів для діагностики та лікування патологій людини” (державний реєстраційний номер 0119U103789) на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Мета і задачі дослідження. *Мета роботи* – обґрунтувати біоінженерні підходи до одержання ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу на основі перикарда ВРХ, придатного для використання в кардіохірургії.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі *завдання*:

– удосконалити схему отримання тканинномодифікованого матриксу із перикарда ВРХ на основі аналізу критичних точок технології для

покращення якісних і техніко-економічних характеристик ксеногенного біоімпланта;

- удосконалити схему стерилізації тканинномодифікованого матриксу на основі перикарда ВРХ;

- розробити технологічний прийом забезпечення стабільності тканинномодифікованого матриксу на основі перикарда ВРХ за умов довготривалого зберігання із використанням технології ліофілізації;

- розробити апаратурну та технологічну схеми виробництва ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу (ЛТМБМ) на основі перикарда ВРХ.

Об’єкт дослідження – біоінженерні основи отримання ЛТМБМ на основі перикарда ВРХ, придатного для використання в кардіохірургії.

Предмет дослідження – методи та засоби отримання ЛТМБМ на основі перикарда ВРХ для застосування в кардіохірургічній практиці.

Методи дослідження: біоінженерні, мікроскопічні, гістологічні, фізико-механічні, фізичні, мікробіологічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів.

Уперше обґрунтовано та розроблено апаратурну та технологічну схеми отримання ЛТМБМ перикарда ВРХ на основі вискоєфективного методу децелюляризації ксеногенного біоматеріалу, яка забезпечує технологічне та біоінженерне оснащення виробництва біоімпланта. Вперше науково обґрунтовано та розроблено алгоритм стерилізації та ліофілізації тканинномодифікованого матриксу зі збереженням архітекtonіки колаген-еластинового каркасу, що дає змогу використовувати його як біоімплант у кардіохірургічній практиці. Отриманий за розробленою схемою медичний виріб являє собою латку з перикарда ВРХ, призначену для усунення дефектів у серцево-судинній хірургії шляхом імплантації в організм донора.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи до створення та довготривалого зберігання біосумісних ксеногенних матеріалів (трансплантатів) для використання в кардіохірургії.

Практичне значення отриманих результатів. За результатами проведених експериментальних досліджень отримано оптимізовану схему децелюляризації тканини перикарда ВРХ, що дало змогу більш ніж у 3 рази скоротити час виробництва біоімпланта. Визначення раціональних умов стерилізації шляхом опромінення та ліофілізації дає змогу зберегти структуру колаген-еластинового каркасу тканинномодифікованого матриксу, близьку за своїми характеристиками до нативного перикарда, що є важливим для кардіохірургічної пластики.

Результати роботи впроваджено з 2022/23 н.р. 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 11.07.2022 р.) та у виробничому процесі товариства з обмеженою відповідальністю «ІКСПАНД» (довідка про використання результатів дисертаційної роботи від 30.01.2023 р.).

Особистий внесок здобувача. Результати роботи, що викладені в дисертації, одержані автором або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилося спільно з науковим керівником. Проведення процесу децелюляризації перикарда ВРХ із подальшим визначенням раціональних умов обробки тканини проводили спільно з к.б.н. А.А. Соколом. Стерилізацію зразків методом радіаційного опромінення здійснювали спільно з науковими співробітниками Інституту фізики НАН України, зокрема з В.Б. Неймашем. Контроль стерильності зразків проводили у ТОВ “Інститут медичної молекулярної діагностики” (м. Київ) спільно з І.М. Скороход. Розробку процесу ліофілізації проводили спільно зі співробітниками ТОВ “НПП “УКРОРГСИНТЕЗ”. Підготовка кріозрізів і

препаратів для СЕМ проводилася в лабораторії електронної мікроскопії ТОВ “Нано Технології в Медицині” спільно з М.А. Скориком.

Представлені до захисту наукові результати отримано, статистично оброблено та проаналізовано дисертантом самостійно. 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., проф. І.М. Ємцем, д.б.н., проф. Ю.О. Галкіним, д.мед.н., проф. Н.М. Руденко, к.мед.н. А.А. Довгалюком, Д.А. Грековим, к.б.н. А.А. Соколом, Г.І. Ємцем, к.б.н. Л.В. Долінчук.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідались та були обговорені на таких науково-практичних конференціях: ICBB'21: 7th International Conference on Bioengineering and Biotechnology (5–7 серпня 2021 р., Прага, Чехія); 16-й Український форум вроджених вад серця “30-річний ювілей неонатальної кардіології та кардіохірургії в Україні: досягнення, виклики та перспективи” (22–23 жовтня 2021 р., Київ, Україна); XXII Міжнародна науково-практична онлайн-конференція здобувачів вищої освіти та молодих вчених “Наука та техніка XXI століття” (10 листопада 2021 р., Київ, Україна); XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю “Актуальні питання клінічної медицини” (19 листопада 2021 р., Україна); Науково-практичний семінар “Стан і перспективи впровадження методів клітинних технологій у ветеринарній медицині” (3 грудня 2021 р., Київ, Україна); V International Scientific Conference “Actual Problem of Biochemistry, Cell Biology and Physiology”, 15–16 жовтня 2020 р., Дніпро, Україна.

Публікація матеріалів. Основні положення роботи викладені у 11 наукових працях, у тому числі в 3 статтях у наукових фахових виданнях України за спеціальністю 163 - Біомедична інженерія, у 3 що включенні до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, у тому числі в 2 статтях у закордонних фахових виданнях, у 4 тезах конгресів, з'їздів, наукових конференцій.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА
СТАТТІ У ФАХОВИХ І МІЖНАРОДНИХ ВИДАННЯХ

12. **Shchotkina NV**. Aspects of lyophilization of cardiac bioimplant. Innov Biosyst Bioeng. 2021;5(4):200-6. DOI: 10.20535/ibb.2021.5.4.239725. (входить до міжнародних наукометричних баз даних: DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, аналіз літературних даних, формування висновків і підготовка до друку.*

13. Пономаренко ДІ, Луценко ТМ, Пашук ВВ, **Щоткіна НВ**. Особливості формування технічної документації на медичні вироби, що імплантують. Біомедична інженерія і технологія. 2021;6. DOI: <https://doi.org/10.20535/2617-8974.2021.6.244561> (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, Dimensions, OpenAIRE). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків.*

14. A.A. Sokol, D.A. Grekov G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, **N.V. Shchotkina**, A. A. Dovghaliuk, N.M. Rudenko, I.M. Yemets. The efficiency of decellularization of bovine pericardium of different concentration of sodium dodecyl sulfate. Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2020. – Vol. 4, № 4. – P. 189–198. (Входить до міжнародних баз даних: DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*

15. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Galkin OYu, Yemets GI, Dolinchuk LV, Rudenko NM, Yemets IM. Optimized method of bovine pericardium decellularization for tissue engineering. Wiadomości Lekarskie. 2021 Apr;74(4):815-20. DOI: 10.36740/WLek202104101 (Республіка Польща) (входить до міжнародних наукометричних баз даних: PubMed/Medline, EBSCO, Scopus, Index Copernicus, Polish Medical Library (GBL), Polish Ministry of Science and Higher Education.). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

16. **Shchotkina N**, Sokol A, Dolinchuk L, Skorohod I, Filipov R, Shepeleva O, Rudenko N, Yemets I. Different type of matrix for cardiac implants: biomedical and bioengineering aspects (Review). Cell Organ Transplantol. 2021;9(1):54-58. DOI: 10.22494/cot.v9i1.122 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Scopus, Google scholar, Crossref). *Здобувачем проведени огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*

17. Sokol AA, Grekov DA, Yemets GI, Galkin AYU, **Shchotkina NV**, Dovghaliuk AA, Telehuzova OV, Yemets IM. Comparison of bovine pericardium decellularization protocols for production of biomaterial for cardiac surgery. Biopolymers Cell. 2020;36(5):392-403 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Scopus, SJR, BIOSIS Previews, DOAJ, EBSCO, Medical Journal Links тощо). *Здобувачем проведени огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*

18. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Dolinchuk LV, Galkin OYu, Yemets GI, Grekov DA, Dovghaliuk AA, Skorokhod IM, Shepeleva OV, Rudenko NM, Yemets IM. The Effect of sterilization on the bovine pericardium scaffold decellularized by the glutaraldehyde-free technology. J Biomed Eng Biosci. 2021;8:28-35. DOI: 10.11159/jbeb.2021.004 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, Portico, Crossref, Committee on Publication Ethics (COPE)). *Здобувачем проведени огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ

19. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Yemets GI, Galkin OYu, Dolinchuk LV, Dovghaliuk AA, Skorokhod IM, Shepeleva OV, Rudenko NM, Yemets IM. Microarchitectonic of Decellularized Bovine Pericardium Matrix. In: Proceedings of the 7th World Congress on New Technologies (NewTech'21); 2021 Aug; Prague. Paper No. ICBB 167. DOI: 10.11159/icbb21.167. *Здобувачем проведени огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

20. Palamarchuk Y, **Shchotkina N.** Modern tissue engineering of bovine pericardium scaffold for using in cardiac surgery. In: Proceedings of XXII International R&D online conference for students and emerging researchers “Science and Technology of the XXI Century”; 2021 Nov 10; Kyiv. p. 22-3.

Здобувачем проведени огляд літератури, підготовка до друку.

21. **Щоткіна НВ,** Сокол АА, Долінчук ЛВ, Скороход ІМ, Галкін ОЮ. Оптимальні умови стерилізації тканинно модифікованого імпланту на основі перикарду великої рогатої худоби. В: Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених з міжнародною участю “Актуальні питання клінічної медицини”; 2021 лист; Запоріжжя. с. 341-2. *Здобувачем проведени експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

22. Sokol AA, Grekov DA, Galkin OYu, Yemets GI, **Shchotkina NV,** Yemets IM. Features of manufacture of decellularized scaffolds for use in cardiac surgery. In: Proceedings of V International Scientific Conference on Actual Problem of Biochemistry, Cell Biology and Physiology; 2020 Oct 15-16; Dnipro. p. 121-3. *Здобувачем проведени огляд літератури, підготовка до друку.*

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 191 сторінках друкованого тексту (128 сторінок основного змісту). Робота складається з таких розділів: вступ; огляд літератури; матеріали і методи дослідження; 3 розділи власних досліджень та їх обговорення; висновки; список використаних джерел; додаток. Список використаних джерел включає 160 джерел, у тому числі 152 зарубіжних, розміщених на 19 сторінках. Роботу ілюстровано 23 таблицями і 13 рисунками, з яких 5 мікрофотографій.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Стрімкий ріст кількості захворювань серцево-судинної системи та високі показники смертності пацієнтів із вродженими вадами серця, що потребують хірургічного втручання, актуалізували пошук нових сучасних підходів до лікування таких груп пацієнтів. До основних тенденцій сьогодення можна віднести застосування кардіоімплантів синтетичного та біологічного походження. Окремий інтерес викликають трансплантати, виготовлені на основі очищеного від клітин та їх компонентів позаклітинного матриксу, який за своїми функціональними та структурними характеристиками близький до нативного перикарда. На противагу синтетичним аналогам, такі конструкції можуть повноцінно замінити дефектну частину тканини чи органу, після чого інтегруватися та повноцінно функціонувати.

Сучасна регенеративна медицина вдало поєднує дані фундаментальних досліджень і клінічну практику, що надає великий потенціал для терапевтичного застосування. В основу покладено відновлення або заміну тканин та органів, у яких є структурний чи функціональний дефіцит, за рахунок синтетичних, біологічних та естракорпоральних матриксів [17]. Синтетичні каркаси надають можливість для маніпуляцій і контролю структурних властивостей, але в той же час не гарантують такої ж функціональності, як у нативної тканини [18]. Перевага використання в тканинній інженерії біоматеріалів обумовлена їх властивістю до резорбції в організмі з подальшим заміщенням власними тканинами. Однак усе більший інтерес викликають каркаси на основі природного позаклітинного матриксу, що відтворюють мікроархітекtonіку нативної тканини [19]. Метою цього аналітичного огляду було узагальнити досвід використання різних типів матриксів для створення кардіоімплантів.

1.1 Класифікація та характеристика різних типів матриксів для кардіоімплантів

Однією з найскладніших проблем сучасної тканинної інженерії є вибір носія/матриці для заселення клітин *in vitro* та *in vivo*, що є важливим аспектом при трансплантації імпланта в організм людини. Основними функціями матриксу є забезпечення міжклітинних зв'язків, контроль структури тканини та регуляція фенотипу клітин [20]. Матрикси, виготовлені з біоматеріалу, регулюють щільність клітин і вироблення біологічно активних факторів, визначають тривимірну структуру тканини та формування нової тканини [21, 22].

Усе різноманіття матриксів може бути розділено на три великі групи:

1. Синтетичні полімери.
2. Натуральні полімери.
3. Екстракорпоральний матрикс.

Основними перевагами перших двох груп є їх природне походження і легша інтеграція в організм донора. Однак, на відміну від синтетичних полімерів, практично неможливо контролювати мікроструктуру таких речовин. У той же час природні біоматеріали забезпечують таку ж саму архітектоніку матриксу, як і в нативної тканини, з якої він отриманий.

У кардіохірургічній практиці використовують синтетичні полімери, схвалені Управлінням продовольства та медикаментів (Food and Drug Administration – FDA) для створення швів, що розсмоктуються [23]. Здебільшого синтетичні матеріали термопластичні й можуть набувати будь-якої форми, що важливо при виробництві клітинних матриць із визначеним діаметром пор.

Одним із відомих природних біоматеріалів для створення клітинних матриць є колаген. Пластичність біоматеріалу, низькі його токсичність й антигенність і в той же час висока механічна міцність визначають переваги широкого застосування колагену в хірургії [22].

Полісахарид рослинного походження – витяжку із морських водоростей – альгінат використовують для створення гелеподібних матриць із високим вмістом іонів кальцію [21, 24, 25]. Практичного застосування альгінат набув для лікування відкритих ран. Однак структурні та функціональні властивості альгінату обмежені довжиною полісахаридних ланцюгів, із яких він побудований, що лімітує можливості його застосування [21].

Екстракорпоральний матрикс створюють видаленням клітин та їх компонентів із нативної тканини перикарда за допомогою хімічних, фізичних та біохімічних методів [19, 26]. За своїми біомеханічними властивостями позаклітинний матрикс мало відрізняється від власне перикардіальної тканини й тому підходить для використання при заміні серцевих клапанів і корекції вроджених вад серця [9].

Більшість відомих нині біоматеріалів, які використовуються в тканинній інженерії, легко резорбуються в організмі й заміщуються його власними тканинами. При цьому матеріал має задовольняти такі умови: відсутність проміжних токсичних продуктів, не повинен змінювати рН тканини чи пригнічувати ріст і диференціювання клітинної культури. Матеріали, які не резорбують, сьогодні практично не застосовуються (крім кісткових протезів; хоча використання металоімплантів намагаються обмежити через їх здатність до корозії в агресивних середовищах організму), оскільки вони послаблюють регенераційну активність і можуть викликати надлишкове утворення сполучної тканини, а іноді провокують й імунну реакцію на чужорідні тіла.

З точки зору біомеханіки, за своїми властивостями функціональні матеріали для імплантації в організм повинні бути подібними до тканин організму, тобто характеризуватися еластичністю і мати близьку до тканин діаграму напруження-деформації та властиву їм величину гістерезису на діаграмі навантаження-розвантаження.

1.1.1 Синтетичні матрикси

Синтетичний полімер за своїми властивостями (легкий, гнучкий, пружний, міцний) добре підходить для застосування в кардіохірургії. На сьогодні для створення серцево-судинних клапанів використовують поліетилен, поліпропілен, силікон, тефлон, дакрон (поліетилентерефталат), поліметилметакрилат, поліуретан, деякі види смол тощо. Однак у віддаленому періоді після імплантації спостерігається деградація полімерних сполук, що визначає головний недолік цієї групи речовин. В агресивному середовищі імпланти піддаються атакам клітин імунної системи, які мають набір окисних та гідролізуючих речовин. Також наявність окисних вільних радикалів, таких як пероксиди, ліпіди, ліпопротеїни тощо, негативно впливає на структуру синтетичних полімерів, знижуючи їх міцність. Деградація протезу супроводжується відщепленням мономерів від довгого ланцюга. Теоретично ці мономерні одиниці можуть потрапляти в кров, лімфу та викликати токсичний ефект, зміну рН у рідинах людського організму. Також серйозну занепокоєність викликає відсутність у цих полімерів біосумісних і біологічних сигналів [27]. Синтетичні матрикси позбавлені просторової складності, яку можна спостерігати в природних позаклітинних матриксах. Однак значною їхньою перевагою є те, що їх можна легко модифікувати, варіювати їхні механічні та хімічні властивості, зокрема швидкість розкладання, в широкому діапазоні.

Для корекції деяких вроджених вад серця у дітей і заміщення легеневого клапана, що використовується для протезування аортального клапана, широко використовують протези з композиційної речовини пористий політетрафторетилен, що за своїми характеристиками є біологічно та хімічно інертним, стійким до агресивних рідин організму і бактеріальних атак. Важливо відзначити, що політетрафторетилен може бути використаний для побудови артеріальних шунтів у новонароджених зі складними ціанотичними вадами серця, для паліативної реконструкції перерваної дуги аорти, для побудови позаанатомічної аорти обхідний та загальний кавопульмональний зв'язок (замість аорти роблять штучну судину). Він також підходить для

закриття дефектів перегородки, пластичної реконструкції правого та лівого шлуночкових шляхів відтоку, корекції коарктації аорти та пластичного відновлення стенозу на головній легеневій артерії та її гілках. Заплати з політетрафторетилену можна використовувати і для пластичної реконструкції атріовентрикулярних клапанів [28–30].

Пористий політетрафторетилен для виготовлення штучного протеза для кардіохірургії успішно апробований у клінічній практиці ДУ “Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України”. Порівняно з прототипами, цей синтетичний полімер має такі переваги: характеризується високим рівнем біосумісності, не чинить цитотоксичної дії, має високі біомеханічні показники, низьку адгезивність для мікроорганізмів, низький рівень післяопераційних ускладнень.

Найближчим аналогом цього полімеру є поліетилентерефталат (комерційні назви Darcon, Baxter, Gore-Tex Surgical Membrane, лавсан). Це термопластик, що використовується для створення штучних протезів із високими механічними показниками. Однак його використання має низку недоліків, одним із яких є цитотоксичність. Також порівняно з іншими синтетичними речовинами поліетилентерефталат асоціювався з більш високим ризиком розвитку інсульту, транзиторної ішемічної атаки та тромбозу сонної артерії в післяопераційний період [31].

1.1.2 Натуральні матрикси

Колаген. Колаген I типу найчастіше використовують як клітинну матрицю в тканинній інженерії, оскільки він є основним білком позаклітинного матриксу багатьох нативних тканин і забезпечує більшу частину механічної міцності та міцності на розрив. Крім того, колаген має низьку антигенність та слабку імуногенність і є біодеградуєчим [23]. Використання колагену тваринного походження викликає побоювання з приводу можливої передачі інфекційних агентів, таких як пріони. Інноваційним і перспективним альтернативним підходом є створення

супрамолекули на основі пептидів, що імітують структуру та функції колагену [32].

У кардіохірургії використовують ліофілізовану колагенову систему доставки гентаміцину Collatamp® (Collatamp® G EUSA Pharma Europe, Великобританія) при профілактиці та лікуванні післяопераційних втручань [33]. Основу імплантанта становить бичачий колаген, який швидко всмоктується і є ефективним засобом для місцевої доставки антибіотиків. Перевагою є те, що такі імплантанти деградуються колагеназами і не потребують хірургічного видалення. В той же час вони забезпечують високу дозу антибіотика в пошкодженій ділянці, забезпечуючи тим самим пришвидшення загоєння ран [33].

Фібрин. Фібринові гелі мають контрольовані характеристики біорозкладності та полімеризації. Додатковою перевагою є їх отримання з крові пацієнта, що сприяє одержанню аутологічного матриксу, який не повинен ні виробляти токсичних продуктів розкладу, ні спричиняти запальних або імунних реакцій. Крім того, фібрин біологічно взаємодіє з клітинами і може сприяти проліферації або міграції [34]. Для виготовлення клапанів серця безшовним методом у модульній формі з необхідною геометрією клапанів серця синтезували еластиноподібні рекомбінантно-фібринові гідрогелі. Цей підхід також уможливить створення багатошарових конструкцій [35].

Гідрогелі. Гідрогелі – це тривимірні каркаси, виготовлені з високогідрофільних полімерів, що дає їм змогу вміщувати визначену кількість води. Структура та хімічний склад полімерних каркасів впливають на механічні властивості таких гідрогелів, які коливаються від крихких із низькими показниками енергії руйнування (10–100 Дж·м²) до надзвичайно жорстких з енергією руйнування ~100–10000 Дж·м² [36].

Гідрогелі на основі гіалуронової кислоти все частіше використовуються для створення тканинноінженерних матриксів серцевих клапанів. Гіалуронова кислота являє собою унікальний тип глікозаміногліканів, що існує у вільній формі без ковалентно зв'язаного білка. Вона грає важливу роль у біологічних

процесах, таких як побудова матричних структур, рух і диференціація клітин. Такі гідрогелі значно збільшують продукцію позаклітинного матриксу внутрішніми клітинами клапана, а продукти деградації гідрогелю збільшують проліферацію міжклітинного матриксу клапана [37]. При посіві клітин на такий гідрогель індукується синтез еластину, в результаті чого еластинові матрикси нагадують матрикс нативного аортального клапана [38].

Також були досліджені складові гідрогелю колаген-хондроїтинсульфату типу I [39]. При посіві на хондроїтинсульфатний гідрогель збільшується пористість матриксу, покращуються біоактивність клітин і ремоделювання матриксу. Продемонстровано підвищене покриття гелів ендотеліальними клітинами і збільшене продукування позаклітинного матриксу, включаючи фібронектин, ламінін, колаген та еластин.

Таким чином, багато гідрогелевих систем, які використовувались у серцево-судинній хірургії, діють лише як біосумісні підмости для підтримки клітин [8, 40].

Шовковий фіброїн. Матрикси на основі фібрилярного білка фіброїну, отриманого від комахи тутового шовкопряда (*bombyx mori*), все частіше застосовуються для тканинної інженерії судинного ендотелію [41]. Матеріал має унікальні біофізичні та біохімічні властивості, що обумовлюють його надійність, гнучкість, біосумісність, здатність до біодеградації [42]. Для створення імплантів використовують методику електроспінінгу, що уможливорює виробництво нано/мікрОВОЛОКОН шовкового фіброїну у великій кількості з точною імітацією позаклітинного матриксу необхідного типу тканини [43]. Перевагами методики електропрядіння є утворення пористої поверхні, яка забезпечує проникнення молекул кисню та підвищення адгезивності клітин до імпланта за рахунок збільшення площі поверхні матриксу. Клітини можуть легко прилипати до таких конструкцій, розмножуватися і формувати моношари клітин зі стабільними фенотиповими характеристиками.

Таким чином, біологічні/природні матрикси мають переваги над синтетичними каркасами, оскільки здатні до міжмолекулярної передачі сигналів, сприяють проліферації, диференціюванню клітин і підтриманню їхньої функціональності. Однак контролювати механічні властивості та швидкість біодеградації таких імплантів дуже складно. Також природні матеріали можуть спровокувати небажану імунну відповідь.

1.1.3 Екстрацелюлярний матрикс

Біоматеріали, що застосовуються в тканинній інженерії та регенеративній медицині, намагаються відтворити багатофакторні аспекти функції екстрацелюлярного матриксу (extracellular matrix, ECM), проте синтетичні матеріали і матриці, сформовані з ізольованих біологічних матеріалів, таких як колаген, фібрин або гіалуронова кислота, не можуть досягти молекулярної та просторової організації матриць нативних тканин. Це мотивувало до використання найбільш природного ECM як джерела біоматеріалу.

З метою отримання біоматеріалу, що за структурними та функціональними характеристиками близький до пошкоджених тканин чи органів і в той же час є безпечним з імунологічної точки зору, була запропонована технологія для клінічного застосування ECM – децелюляризація тканин та органів від людей і тварин-донорів. У цій технології використовуються фізичні, хімічні та/або біохімічні методи для видалення й очищення від антигенних молекул у складі клітин із нативної тканини/органа ксеногенного чи алогенного походження. Цей процес спрямований на забезпечення імунологічної безпеки та збереження архітектоніки матриксу, яку становлять білки, колаген і глікозаміни. Кінцевий продукт являє собою тривимірний каркас ECM, аналогічний нативній тканині [19].

На сьогодні успішно децелюляризовані деякі органи і тканини. Серед них, зокрема, такі, як клапани серця, міокард, перикард, судини, легені,

підшлункова залоза, нирки, печінка, молочні залози або нервові волокна [26]. Децелюляризовані ксеногенні біологічні скафолди успішно використовуються в клініці для тканинної інженерії та регенеративної медицини [44]. Одним із найпоширеніших матеріалів для ксенопластики є децелюляризований бичачий перикард, що широко використовується в кардіохірургії для заміни серцевих клапанів і вроджених вад серця [9]. Структура ксенотканини багата на еластичні та колагенові волокна, що надає перикарду підвищеної стійкості до механічних впливів. Формування рівномірної шовної лінії при серцево-судинних операціях також є важливою перевагою використання децелюляризованого бичачого перикарда [45]. Для зменшення імунологічної відповіді та відторгнення трансплантата перикард фіксують за допомогою глютаральдегіду. Однак неповне його видалення може призвести до цитотоксичності та пізньої кальцифікації імплантата *in vivo* [46]. Саме це і зумовило необхідність пошуку та розробки нових методів для створення безпечних кардіоімплантів. Однією з найбільш поширених методик є обробка тканини іонними детергентами, такими як додецилсульфат натрію (SDS, sodium dodecyl sulfate). Однак використання його у високих концентраціях може призводити до структурних порушень ECM і чинити цитотоксичну дію на клітини людини [47], тоді як використання SDS у низьких концентраціях (0,1 %) є безпечним.

У табл. 1.1 розглянуто комерційні децелюляризовані трансплантати для кардіохірургії, що виготовленні за різними методиками. Здебільшого такий тип продукції представлений на європейському та американському ринках. Виробники надають перевагу використанню ксенотканини на основі перикарда свиней, ВРХ і коней.

Кардіоімплант, виготовлений на основі бичачого перикарда, має низку технічних переваг, таких як простота використання, високі біомеханічні характеристики, біосумісність, менша кровоточивість зі швів і можливість негайного проведення артеріального дуплексного дослідження на місці ангіопластики [3]. Екстракорпоральний матрикс бичачого перикарда по суті

безклітинний і являє собою чистий колаген. Тим самим він може забезпечити природну міграцію мікроелементів та проліферацію клітин реципієнта, пришвидшуючи ендотеліалізацію та регенерацію тканин [4]. Порівняння бичачого перикарда з іншими матеріалами, такими як політетрафторетилен, для закриття дефектів міжшлуночкової перегородки не показало значних відмінностей у результатах [5]. Однак хірурги віддали перевагу бичачому перикарду через його еластичність і більш низький ризик післяопераційного ендокардиту. Деякі виробники стверджують, що їх імпланти мають технологію антикальцифікації, яка може значно зменшити кальцифікацію та підтримати ендотелізацію [7, 48].

На базі ДУ “Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України” розпочато тестування унікальної методики децелюляризації бичачого перикарда, що вже успішно пройшла стадію доклінічних досліджень і яка в перспективі дає можливість сертифікувати кардіоімплант вітчизняного виробництва [9].

Таблиця 1.1

Комерційні ацелюлярні перикардальні матрикси із ксенотканин

Продукт	Вид ксенотканини	Спосіб обробки	Посилання
Bovine Pericardium Patch (<i>Braile Biomedica, São José do Rio Preto, Бразилія</i>)	Бичачий перикард	Глютаральдегідовий	[3]
Edwards Bovine Pericardial (<i>Edwards Lifesciences, Irvine, CA, США</i>)	Бичачий перикард	GA-крос-лінкінг, запатентована антикальцифікаційна обробка	[4]
PhotoFix (<i>CryoLife, Kennesaw, GA, США</i>)	Бичачий перикард	Децелюляризація та фотоокиснення	[5]
SURGIFOC (<i>FOC Medical, Buenos Aires, Аргентина</i>)	Перикард свиней/ бичачий перикард	GA-крос-лінкінг	[6]

CardioCel (<i>Admedus, Malaga, Австралія</i>)	Бичачий перикард	GA-крос-лінкінг, децелюляризація та обробка запатентованою методикою	[7]
Matrix Patch (<i>Auto Tissue Berlin, Німеччина</i>)	Перикард коней	Децелюляризація	[8]
No-React (<i>BioIntegral Surgical Mississauga, Ontario, Канада</i>)	Перикард свиней	Обробка гепарином	[9]
Peri-Guard (<i>Baxter International Inc. Deerfield, Illinois, США</i>)	Бичачий перикард	GA-крос-лінкінг	[10]
Tiflex (<i>Xrand, Україна</i>)	Бичачий перикард	Децелюляризація 0,1 % SDS + крос-лінкінг	[11]

1.2 Використання ліофілізованого екстрацелюлярного матриксу в кардіохірургії

Сучасні методи лікування серцевої недостатності спрямовані на виправлення (маскування) симптомів, у той час як новітні стратегії досліджень націлені на усунення причини їх виникнення – відновлення пошкодженого міокарда або його регенерацію, часто з використанням підходів регенеративної медицини. Незважаючи на останні успіхи в галузі, мало хто з пацієнтів повноцінно відновлює функцію серця. На сьогодні найбільш ефективним лікуванням пацієнтів із термінальною стадією серцевої недостатності є серцева алотрансплантація [49, 50]. Проте кількість пацієнтів, які потребують трансплантації, значно перевищує кількість донорських сердець [51]. Таким чином, розробка альтернативних методів лікування серцевої недостатності залишається першочерговим завданням. Одним із можливих методів є використання біоскафолдів із ксенотканин, що являють собою очищений від клітин матрикс. Такі біоскафолди використовуються для заміни або підтримки ушкодженої серцевої тканини. Звільнений від клітин

скафолд можна прикладати до поверхні серця для запобігання, або навіть для регресування, поширенню ушкоджень серця. Також трансплантат, до певної міри засіяний (заселений) клітинами та доставлений у місце ушкодження, може сприяти відновленню втрачених серцевих клітин і подальшому одужанню. Ідеальний скафолд повинен бути сумісним з усіма типами клітин серця, забезпечувати механічну міцність у потрібному місці, відповідним чином упорядковувати клітини та передавати біохімічні сигнали для належного функціонування клітин у серці [52]. Джерелами таких скафолдів можуть слугувати біологічні або синтетичні матеріали, кожен із яких має свої переваги та недоліки. Синтетичні матеріали не завжди розкладаються мікроорганізмами та часто не відповідають вимогам стосовно прикріплення та інфільтрації клітин у судинах і паренхімі, проте з них зручно виготовляти трансплантати майже будь-якого розміру та форми [53].

На відміну від синтетичних, біологічні скафолди, які зазвичай походять з ЕСМ, підтримують передачу біохімічних сигналів, необхідних для міграції клітин, їх належного розташування та диференціації. Проте вони можуть бути механічно нестійкими за впливу фізичних умов (стерилізації, ліофілізації тощо).

Одним із широко застосовуваних методів консервації донорських тканин є ліофілізація – метод висушування попередньо замороженої тканини, призначеної для тривалого зберігання і подальшого її використання (після регідратації) в клінічній практиці. Особливість цього методу полягає в тому, що висушування відбувається, коли вода переходить із твердого стану в пар, минаючи рідку фазу [54]. Висушування тканин у процесі ліофілізації приводить до дегідратації аморфного матриксу, що оточує колагенові волокна. В результаті цього відбуваються певні структурні перетворення біотехнологічно трансформованого матриксу тканин [15]. Уперше системне вивчення властивостей і якостей ліофілізованих трансплантатів припало на 50-ті роки ХХ століття. Одні з перших робіт, присвячені ліофілізації тканин, належать Е.В. Флосдорфу [55]. На сьогодні особливості фіброархітекtonіки

ліофілізованих трансплантатів та їхні біомеханічні властивості є предметом зацікавлення різних учених [56, 57]. Науковцями доведено, що в процесі ліофілізації тканини набувають стійкості до факторів зовнішнього середовища та здатності зберігати комплекс структурних і біохімічних властивостей, важливих із трансплантаційної точки зору [14, 58]. Крім того, ліофілізація ксенотканини важлива перед стерилізацією гамма-променями, оскільки без дегідратації в тканинах можуть виникати значні зміни, що перешкоджають їх клінічному використанню. Процес ліофілізації не має суттєвого впливу на структуру таких тканин, як кістка, хрящ і перикард [16].

Ліофілізовані трансплантати бичачого перикарда, що оброблені глутаровим альдегідом, використовуються в хірургії для заміни серцевого клапана. Використання таких скафолдів часто призводить до кальцифікації імпланта. Однак деякі автори повідомляють [59], що ліофілізація перед хімічною обробкою зменшує запалення і попереджає кальцифікацію, а також не змінює механічних характеристик біоматеріалу, покращує його імунні властивості та дає змогу зберігати трансплантат для майбутнього використання.

Наукові досягнення тканинної інженерії дають можливість створити трансплантати за різними методиками з використанням хімічних і фізичних методів. У той же час потребує подальшого дослідження вплив процесу ліофілізації на властивості новостворених трансплантатів, що і визначає актуальність підбору оптимальних параметрів методу і відповідних реагентів. Структура процесу ліофілізації може мати значний вплив на стабільність тканин. Для зменшення структурних пошкоджень і зберігання природних властивостей тканини необхідно поетапно проаналізувати швидкість і температуру замерзання, швидкість сушіння та вміст вологи.

1.3 Сучасні підходи до ліофілізації продуктів біологічного походження

Ліофілізація є однією з ефективних методик довготривалого зберігання тканин для хірургічного застосування. Особливість цього методу полягає в тому, що висушування відбувається при переході води з твердого стану в пару без рідкої фази [60]. Це явище випаровування твердого тіла без плавлення має назву “сублімаційна сушка”. Витіснення вологи із замороженого стану біологічної тканини зумовлене властивістю води за температури нижче нуля, під дією вакууму та за тиску менше 4,6 мм рт.ст. переходити зі стану льоду в пароподібний стан, тобто тверда речовина переходить у пар без утворення проміжного рідкого стану. Важливо під час ліофілізації створити умови, які регулюють температуру тканини і тиск водяної пари, щоб забезпечити безперервний перехід льоду в пару. Температуру кристалізації зазвичай визначають вимірюванням провідності електричного струму [61, 62]. Зневоднення відбувається завдяки підтримці рівноваги концентрації водяної пари у тканині та в навколишньому середовищі. Якщо простір навколо тканини звільняється від водяної пари, її втрата компенсується сублімацією відповідної кількості водяної пари із замороженої тканини [63].

Сублімаційна сушка біологічної тканини (гомо- або гетеротрансплантата) має на меті створення банку імплантів для використання в сучасній кардіохірургії. Ліофілізація забезпечує оптимальне збереження всіх функціональних властивостей і фіброархітектоніки ЕСМ кардіоімпланта. Метод позбавлений проблеми зберігання заморожених тканин завдяки переходу тканини в суху форму. Ліофілізацію застосовують для зберігання біопротезів і в тканинній інженерії [64, 65].

Процес ліофілізації включає в себе етапи виморожування, первинного та вторинного осушування, при проведенні яких враховуються стабільність білка, характеристики інертного заповнювача, критичні температури структури [66].

Заморожування. Це початковий етап, на якому застосовують кілька заморожувальних агентів, таких як рідкий азот, рідкий кисень і сухий лід. При заморожуванні біологічних матеріалів важливу роль відіграє швидкість охолодження, від якої залежить величина кристалів льоду. При швидкому заморожуванні утворюється дрібнокристалічна структура замороженої тканини, при повільному – крупнокристалічна. Характер процесу утворення кристалів льоду, а відповідно, і їхній розмір, значно залежить від ступеня переохолодження, температури початку кристалізації, швидкості охолодження [67–69]. Для того щоб отримати заморожену тканину без мікроскопічно видимих кристалів, необхідно температуру знижувати через кожну секунду на 10–20 °С, оскільки повільне заморожування дає воді можливість викристалізовуватися [70]. Швидкість охолодження біотканини для консервації залежить головним чином від температури охолодження, характеру зовнішнього середовища та розміру тканини, що піддається обробці [71]. За оптимальних умов при заморожуванні утворюються кристали льоду великих розмірів із мінімальною площею поверхні.

Відпал – це стадія процесу виморожування, під час якої достатньо тривалий час підтримується температура продукту вища, ніж кінцева температура замерзання. Відпал сприяє кристалізації інертних заповнювачів (маніту та гліцину), що своєю чергою запобігає розпаду білків матриксу та підвищує їх стабільність під час зберігання [72–74].

Первинне осушування. Наступним етапом є випаровування розчину з льоду, що відбувається при підвищенні температури продукту, але в межах, нижчих за критичну температуру (температуру скляного переходу та температуру колапсу). Такий процес можна регулювати за рахунок тиску в камері ліофілізатора за умови, що тиск у камері нижчий за тиск насиченої водяної пари за необхідної температури [75]. Різниця між тиском у камері та тиском пари слугує рушійною силою реакції сублімації. Такі параметри процесу первинного осушування, як температура та тривалість, інтенсивність нагрівання, тиск у камері, можуть впливати на якість кінцевого продукту.

Вторинне осушування. Залишкову вологу видаляють у процесі вторинного осушування за допомогою десорбції. Порівняно з первинним процесом, температура продукту вища, а тиск у камері нижчий [76]. Під час нагрівання при первинному осушуванні до температури початку вторинного осушування не слід надмірно підвищувати інтенсивність нагрівання, щоб не денатурувати білок і не полімеризувати продукт [77]. Загалом рекомендується задавати високу температуру на короткий проміжок часу, оскільки це скорочує тривалість процесу ліофілізації. Температуру, тиск у камері та тривалість вторинного осушування потрібно оптимізувати з урахуванням потрібної вологості висушеного продукту, яка необхідна для збереження білкової структури продукту [78].

1.4 Несприятливі аспекти при ліофілізації біологічних тканин

Біоімпланти в кардіохірургії переважно являють собою очищений від клітин та їх компонентів ЕСМ, тобто очищений білок колагену. За допомогою різних методик було досліджено структуру води навколо колагену [63]. Було показано, що вода відіграє важливу роль у підтримці мікроструктури колагенового матриксу та забезпечує механічні властивості колагенових фібрил [79]. Вода може взаємодіяти з колагеном у двох станах: вільному та зв'язаному. Вільна вода заповнює простір між мікрофібрилами та фібрилами білка. В той же час зв'язана вода стабілізує подвійну спіраль колагену. Зв'язана вода відповідає за стабілізацію потрібної спіралі протеїну за рахунок формування водневих зв'язків між спіралями [71]. Ці відмінності суттєво позначаються на динаміці видалення води і на складі залишкової вологи в сухих препаратах. Кількість зв'язаної води, як і міцність її зв'язування із субстратом, що вимірюється енергією зв'язку, в різних препаратах може варіювати в широких межах залежно від виду тканини, що піддається консервації [63].

Молекули води, що виходять із тканини, можуть вести себе по-різному. Дуже часто молекули води із внутрішньої частини тканини знову

перетворюються в лід на поверхневому шарі тканини. В інших випадках молекули води вільно виходять із тканини та затримуються конденсатором ліофілізатора. Опір, що зустрічають молекули води на своєму шляху, обумовлений формою і розміром тканини, товщиною висушеного шару. Чим тонша тканина, менші її розміри, тим швидше проходить очищення від води. Важливим фактором при зневодненні тканини є її залишкова волога, яка впливає на збереження морфологічних структур тканини, що піддається консервуванню. Залишкова волога визначається як відсоткове співвідношення між вагою нативної та ліофілізованої біологічної тканини. Допустимим ступенем зневоднення для судин є поріг у межах 5 % залишкової вільної води [80].

По закінченні першого періоду висушування, коли вільна вода видалена повністю, температура підвищується приблизно до 0 °С. Залишкова волога тканини, що обумовлена наявністю зв'язаної води, залишається в цей час на рівні 5–10 % від сухої маси. Ця волога не могла бути видалена за тих фізичних умов, які супроводжують перший період висушування. В другому періоді, коли температура матеріалу підвищується до +30–40 °С, створюються умови для видалення води, що зв'язана із субстратом більш міцними зв'язками. До завершення другого періоду залишкова волога тканини знижується зазвичай до 1-2 % [81].

Таким чином, процес ліофілізації може значно пошкодити мікроструктуру ЕСМ, що важливо для ефективної роботи біопротеза. На сьогодні застосовують різні хімічні та фізичні методи, які дають змогу зберегти структуру матриксу після сублімаційної сушки. Одним із широко застосовуваних методів є використання глутаральдегіду (ГА) як зшивного агента. ГА стабілізує структуру колагену, запобігає руйнуванню тканин ферментами або бактеріями, а також зменшує антигенність матеріалу [82]. Однак при використанні ГА може відбутися нерівномірне зшивання колагену (зшивання по поверхні), що може призвести до утворення багат шаровості матеріалу і, як наслідок, до обмеження механічних властивостей ступок

клапана за циклічних навантажень. М. Лопес-Моя з колегами [83] зауважують, що основним суперечливим аспектом цього методу є поява прогресуючого процесу кальцифікації, що призводить до погіршення структури біопротеза та втрати його функції. Для запобігання процесу кальцифікації біопротезів було запропоновано декілька методик, таких як: обробка гепарином, покриття гіалуроновою кислотою, фотохімічне зшивання [84].

Повна відмова від ГА можлива при крос-лінкінгу із застосуванням розчинного карбодіїмідів (1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід) та органічної речовини, похідної проліну (N-гідроксисукцинімід). Стабілізацію процесу “зшивання” проводять у буфері MES (2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота). Ефективність використання цієї методики позитивно оцінена за результатами біомеханічних властивостей біоімпланта [85].

Однак успішний хід процесу ліофілізації залежить не тільки від наявності стабілізуючого агента, а й від таких факторів, як кристалізація, зсув рН, утворення кристалів льоду тощо. Зміна хімічної рівноваги в системі під час ліофілізації може призвести до денатурації білка та втрати його біологічної активності.

Виморожування може спричиняти структурні та конформаційні зміни в білку, які зазвичай є зворотними. При ліофілізації утворюється двофазова матриця, яка складається з льоду та замороженого матриксу, що містить у собі молекули розчинника та фракцію води, яка не замерзла. Тверднення замороженого матриксу приводить до розділення на фазу без льоду та фазу з льодом [86]. Білкові продукти під час виморожування та кристалізації можуть втрачати стабільність. Причиною нестабільності під час ліофілізації є неповна кристалізація кріопротекторів.

Такі кристалічні інертні заповнювачі, як маніт і гліцин, необхідно повністю кристалізувати під час осушування виморожуванням, тому що неповна кристалізація маніту може призвести до подальшої його кристалізації при зберіганні, що своєю чергою може призвести до втрати білком своєї

стабільності [87]. Необхідною передумовою при налагодженні виробництва стабільних білкових продуктів є врахування властивостей кристалізації та характеристик метастабільних форм при трансформації [88]. Кристалізація кріопротектора є одним із головних факторів, які дестабілізують протеїн. Отже, вибір кріопротектора з низькою схильністю до кристалізації може бути рішенням для забезпечення стабільності та збереження біологічної активності білка в замороженому стані [89, 90].

Білкові продукти стабільні за ізоелектричних значень рН (6-7). За більш високих значень розпочинається відштовхування однойменних зарядів молекул білка, що спричиняє до його денатурації або розгортання. Зміну рН у замороженому продукті можна спостерігати під час заморожування компонентів, які містять менш розчинні буферні компоненти. У ході заморожування білкового продукту з такими буферними компонентами, як фосфат натрію та сукцинат, можна спостерігати зниження рН на 3 одиниці внаслідок кристалізації буферних компонентів, що істотно дестабілізує білки [91, 92]. При використанні як буферних компонентів таких солей, як фосфати натрію або калію, різниця між точкою замерзання монойонізованих (солі) та нейонізованих (вільна кислота або основа) зразків призводить до того, що один компонент замерзає раніше за інший, спричиняючи тим самим дестабілізацію білків (денатурацію або конформаційні зміни) [93].

Таким чином, біологічні тканини, висушені за допомогою сублімаційного методу, за своїми властивостями значно відрізняються від аналогічних тканин, висушених із рідкого стану. Характерною особливістю ліофілізованих тканин є майже повне зберігання ними після висушування початкового об'єму; препарат перетворюється на суху губку. Перед використанням ліофілізовані тканини поміщають у стерильний фізіологічний розчин, який може містити антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин, гентаміцин) для подальшої регідратації. Суть регідратації полягає в тому, що ліофілізована тканина вбирає в себе вологу і знову набуває властивостей, що характерні за

первинного стану. При правильному режимі регідратації можна відновити фізико-хімічні, пластичні та структурні властивості перикарда.

Ліофілізована тканина, що упаковується в умовах вакууму, може зберігатися тривалий час як в охоложеному стані, так і за кімнатної температури. Однак на сьогодні, відповідно до стандартів, ліофілізовані ксено-та алотрансплантати рекомендують зберігати не більше 5-ти років. Транспортування і зберігання таких тканин також здійснюється без будь-яких особливих умов і застережень [80].

Таким чином, найперспективнішим методом на сьогодні є висушування біопротеза методом ліофілізації, що створює умови, за яких біологічні тканини піддаються мінімальним хімічним змінам. Ліофілізований кардіоімплант за умов вакуумного пакування може зберігатися необмежений час і не потребує спеціальних умов транспортування. Можливість довготривалого зберігання ліофілізованих біопротезів для кардіохірургії, простота транспортування надає можливості створення великого запасу біоматеріалу. Тому цей метод консервування біоматеріалів сьогодні можна вважати одним із перспективних і зручних для практичних цілей і задач.

1.5 Методи стерилізації матриксів біологічного походження

Стерилізація – це процес знешкодження (звільнення від) усіх форм мікробіологічного життя включно з грибами, пліснявою, бактеріями, вірусами, спорами та іншими нежиттєздатними інфекційними та неінфекційними агентами, такими як пріони, які знаходяться на будь-яких частинах медичних виробів, у тому числі на імплантах біологічного походження. Стерилізація досягається переважно агресивними методами обробки із застосуванням фізичних агентів (температура і тиск, іонізуюче випромінювання, ультрафіолетове та інфрачервоне випромінювання), хімічних агентів (формальдегід, перекис водню, етилен оксид, нітроген оксид, озон, пероцтова кислота, хлорвмісні сполуки, глутаровий альдегід, фталальдегід, срібло тощо) і механічними методами, до яких належить стерилізуюча фільтрація розчинів.

Стерилізації підлягають:

- усі вироби медичного та ветеринарного призначення, які проникають у тканини, контактують зі слизовими оболонками, рідинами та патологічними ділянками шкіри;
- фармацевтичні вироби, розчини для ін'єкцій, таблетовані та інгаляційні форми;
- штучні трансплантати й імпланти.

У промислових масштабах набули широкого впровадження декілька методів стерилізації, такі як, наприклад, хімічна стерилізація, стерилізація парою, гарячим повітрям, прожарюванням, газова і плазмова стерилізація, стерилізація інфрачервоним, ультрафіолетовим, гамма-випромінюванням, електронними пучками. Застосування того чи іншого методу обумовлене ступенем опірності різних видів мікроорганізмів до різноманітних засобів впливу, фізико-хімічними властивостями виробів, що стерилізуються, екологічною безпекою, економічною доцільністю, технологічністю оснастки стерилізаційного устаткування тощо. Кожний із цих методів стерилізації має свої переваги й недоліки і може бути застосований тільки до певних видів об'єктів стерилізації.

Трансплантація тканин – це метод заміни або відновлення пошкоджених тканин чи органів у організмі людини [94, 95]. Одним із методів трансплантації тканин є ксенотрансплантація, за якої отримують життєздатні або аналогічні тканинні конструкції від тварин іншого виду. Децелюляризовані ксенотрансплантати можуть бути використані в тканинній інженерії за умови повного видалення будь-яких клітин, білків і ДНК, що знижує антигенність та, відповідно, ризик виникнення запальних процесів і кальцифікації. Під час збору, обробки та інженерії тканин, призначених для трансплантації, отримані тканинні трансплантати можуть бути забруднені бактеріями, грибами та іншими організмами [96, 97]. Тому перед імплантацією ці трансплантати необхідно простерилізувати. Існує безліч методів

стерилізації, які використовуються для стерилізації м'яких тканин, включаючи тканини серця; проте кожен метод має свої переваги та недоліки.

Вплив стерилізації на різні тканинні трансплантати і сконструйовані тканини інтенсивно вивчається останнім часом [98–103]. Однак інформація про вплив стерилізації на децелюляризовані трансплантати м'яких тканин, таких як серцеві клапани, майже відсутня. Крім того, більшість методів стерилізації не продемонстрували достатньої ефективності при стерилізації тканин, про що свідчили пошкодження або зміни структури матриксу. П. Сомерс з колегами [104] показали, що гамма-опромінення змінює ультраструктуру децелюляризованих клапанів при тестуванні *in vitro* [105]. Зміни включали зшивання, молекулярну фрагментацію та деградацію білкових матеріалів за рахунок розриву пептидного ланцюга, що призвело до значної зміни механічних властивостей. Ця несприятлива структурна зміна спричиняє до адгезії нижніх клітин [106]. Вивчення впливу гамма-випромінювання на децелюляризовані клапани свиней на моделі вівці показали, що дози гамма-випромінювання, достатні для стерилізації серцевих клапанів, пошкоджують їх і призводять до дезадаптивного ремоделювання рани [107]. Це відбувається через додаткове пошкодження позаклітинного матриксу та руйнування колагену гамма-променями. Стерилізація етанолом децелюляризованої тканинної печінки свині показала значну втрату вмісту колагену, зшивання пептидних матеріалів, нездатність знищити бактеріальні спори і, в підсумку, зниження прикріплення та проліферації клітин у децелюляризованій тканині печінки [108]. Було виявлено, що при обробці пероцтовою кислотою децелюляризована тканина простерилізувалася, проте втратила 44 % глікозаміногліканів [108]. Стерилізація електролізованою водою показала зниження кількості аеробних колоній і стафілококів на поверхні, а кількість аеробних колоній залишалася нижчою рівня попереднього очищення через 48 год [109]. Однак кількість колоній *Staphylococcus aureus*, чутливих до метициліну, перевищувала вихідні рівні через 24 год після стерилізації. Щоб усунути недоліки методів стерилізації

децелюляризованих клапанів аорти свині застосовують новий метод – стерилізацію надкритичним діоксидом вуглецю ($scCO_2$). Цей метод потребує додаткового стерилізуючого агента для ефективної інактивації бактеріальних ендоспор. Як такий агент використовується пероцтова кислота для досягнення 6-го рівня забезпечення стерильності, необхідного для стерилізації виробів медичного призначення, яка може застосовуватися як до вологих, так і до сухих зразків [110–112]. Стерилізація з використанням $scCO_2$ передбачає низькі температури (31 °C) і високий тиск (498,9 кгс/см²). Низька температура робить цей метод ідеальним для матеріалів, чутливих до температури. Метод успішно застосовувався до тканини алотрансплантата кістки і сухожилля [113], а також до амніотичної тканини [114].

Висновки до розділу 1

За даними аналітичного огляду було визначено, що на сьогодні використовується велика кількість біосумісних матеріалів для створення імплантів, але жоден із них не є ідеальним, тому пошук нових матеріалів для пластики серцево-судинної тканини актуальний на нинішньому етапі розвитку тканинної інженерії. Все більше перевага надається матриксам природного походження, зокрема екстрацелюлярному матриксу на основі бичачого перикарда, що має переваги над синтетичними аналогами. Виробництво продуктів на основі ксенотканин вимагає забезпечення гарантійних строків придатності та умов транспортування. Тому активно розробляються методи ліофілізації біологічних продуктів, які можуть забезпечити довготривале зберігання без зміни функціональної активності імпланта. В розділі розглянуто сучасні методи стерилізації тканиномодифікованих матриксів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальне дослідження проводилося в лабораторії науково-діагностичного відділу координації наукових досліджень впровадження та захисту прав інтелектуальної власності та підвищення кваліфікації кадрів ДУ “Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії” МОЗ України та на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії Національного технічного університету України “Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”.

Під час проведення дослідження було дотримано біоетичних норм вітчизняного та міжнародного законодавства, в тому числі положень IV Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (ETS 123 (1986)). Цей документ ратифіковано в Україні відповідними законодавчими документами з проведення експериментів на тваринах, зокрема “Загальними етичними принципами експериментів на тваринах”, ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (20.09.2001 р.).

2.1 Матеріали та обладнання

2.1.1 Біологічний об’єкт

Біологічний об’єкт – перикардіальна сумка ВРХ, яку вилучали в безпорідних 12–18-місячних биків протягом 20 хв після забою на ТОВ “Козятинський м’ясокомбінат”. Усі тварини пройшли ветеринарний огляд і мали ветеринарний сертифікат. Максимально доступної атравматичності та врахування анатомічних особливостей тварин було дотримано в процесі вилучення органу згідно з правилами асептики [115].

2.1.2 Реактиви та обладнання

Для проведення процедури децелюляризації перикарда ВРХ були використані такі матеріали:

реактиви:

- 1) стерильна дистильована вода;
- 2) реактив натрій хлористий (NaCl);
- 3) етанол 50, 60, 70, 80, 90, 96 та 100 %;
- 4) SDS 92,5–100,5 % – синтетична органічна сполука з формулою $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$;
- 5) EDC/NHS – 1-гідрокси-2,5-піролідиндіон з формулою $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$, органічна речовина, похідна піролідину;
- 6) MES-буфер – буферний розчин 2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти з формулою $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$;
- 7) PBS – фосфатно-буферний розчин;
- 8) реактив для тесту на каталазу;
- 9) реактиви для фарбування мазків за Грамом;
- 10) імерсійна олія;

середовища:

- 11) тіогліколевий бульйон;
- 12) бульйон Сабуро;
- 13) щільне середовище Сабуро;
- 14) кров'яний агар;
- 15) середовище Макконкі;

лабораторний посуд та обладнання:

- 16) циліндри мірні 100 мл, 500 мл, 1000 мл;
- 17) колби мірні з кришкою 500 мл, 5000 мл;
- 18) стакани хімічні мірні 800 мл;
- 19) пластикові баночки з кришкою 200 мл;
- 20) пластмасова ложка для набору реактиву;
- 21) пластмасова ємність для зважування реактиву;
- 22) лабораторні ваги електронні “Техноваги” із вбудованим акумулятором ТВЕ-1-0,01-а;
- 23) шейкер орбітальний UOSlab SH-10;
- 24) медичний холодильник ШХФ-0,5 ДС Polair (лабораторний);

- 25) ламінарний бокс біологічної безпеки ESCO;
- 26) бокс біологічної безпеки AC4-4E8 Airstream, Class 2;
- 27) дозатори автоматичні змінного об'єму Піпет-Дозатор 0,5–10 мкл;
- 28) дозатори автоматичні змінного об'єму Піпет-Дозатор 5–50 мкл;
- 29) дозатори автоматичні змінного об'єму Піпет-Дозатор 20–200 мкл;
- 30) дозатори автоматичні змінного об'єму Піпет-Дозатор 100–1000 мкл;
- 31) термостат ТС 20;
- 32) центрифуга лабораторна Eppendorf 5418.
- 33) холодильник із морозильною камерою Snaige RF36SM-S10021;
- 34) термостат-інкубатор Memmert IN 75;
- 35) пальник спиртовий;
- 36) одноразові бактеріологічні петлі;
- 37) мікроскоп Optica B-192;
- 38) бактеріологічні пробірки стерильні одноразові;
- 39) наконечники для дозатора лабораторного об'ємом 100–1000 мкл;
- 40) чашки Петрі стерильні одноразові;
- 41) штатив для пробірок;
- 42) контейнер для відпрацьованих потенційно інфекційних відходів із дезінфекційним розчином (0,25 %-вий лізоформін 3000);
- 43) гумові рукавички;
- 44) фільтрувальний папір;
- 45) предметне скло;
- 46) маркер.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Біоінженерна трансформація перикарда ВРХ

В основі біоінженерної трансформації перикардіальної тканини ВРХ була застосована схема, розроблена науковцями Науково-дослідної лабораторії науково-діагностичного відділу координації наукових досліджень, впровадження та захисту прав інтелектуальної власності, підготовки та підвищення кваліфікації кадрів ДУ “Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України” [116]. Для технологічної очистки тканини від антигенів і клітинних компонентів було вибрано хімічний спосіб децелюляризації з використанням іонних і неіонних детергентів та ферментів. Технологічний процес децелюляризації зразків перикарда ВРХ (0,1 % SDS) складався з кількох етапів.

1. Зразки (по 5 зразків на 500 мл розчину) піддавалися впливу осмотичного шоку, їх поміщали в стерильну дистильовану воду за $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 72 год при постійному перемішуванні 200 об/хв. Заміну води проводили кожні 6–8 год.

2. Зразок перикарда розміром 40·40 мм поміщали в 200-мл пляшку, що містить 100 мл 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich, США), з постійним струшуванням (200 об/хв) протягом 30 днів за $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Розчин для лізису клітин змінювали один раз на день.

3. Детоксикація зразків отриманого матеріалу проводилася відмиванням у стерильній дистильованій воді протягом 7-ми днів за $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ при постійному перемішуванні 200 об/хв. Заміна дистильованої води проводилася кожні 12 год.

4. Стабілізація та фіксація зразків децелюляризованого перикарда відбувалася в розчині 70 %-вого етанолу протягом 24 год за $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ при постійному перемішуванні 200 об/хв.

5. Потім усі фрагменти децелюляризованого перикарда відмивали у стерильному розчині NaCl протягом 24 год за $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ при постійному перемішуванні 200 об/хв.

2.2.2 Гістологічні методи, фарбування гематоксилін-еозином

Підготовка зразків до фарбування проводилася фіксуванням ксеноперикарда в нейтральному (рН 7,4) 10 %-вому формаліні протягом щонайменше 3-х днів за $t = 4^{\circ}\text{C}$. Після фіксації зі зразка вирізали фрагмент розміром 10·10 мм і поміщали його в ємність із проточною водою не менше ніж на 6 год. Після цього для зневоднення зразки обробляли спиртом із підвищенням концентрації (50 і 60 % по 4–6 год; 70, 80 і 90 % по 8–12 год; у 2-х порціях 100 %-вого спирту по 12–24 год). Зневоднені зразки поміщали в чистий хлороформ на 1–1,5 год із дворазовою зміною хлороформу. Потім шматки поміщали в суміш хлороформу з парафіном (1:1) за температури 37°C на 3-6 год. Після просочування шматки викладали в силіконову форму і заливали парафіном. З парафінового блока за допомогою мікротома Leica RM2125 робили зрізи товщиною 5–7 мкм. Зрізи фіксували на предметному скельці. Перед фарбуванням гістологічні скельця з метою депарафінізації поміщали в дві порції ксилолу на 2–4 хв у кожній порції. Для видалення ксилолу скельця поміщали в спирти за зменшенням концентрації: 96 % – на 2-3 хв, 70 % – на 2 хв. Залишки спирту видаляли за рахунок занурення в дистильовану воду на 2 хв.

Фарбування гематоксилін-еозином. Фарбування передбачає використання основного барвника гематоксиліну, що фарбує базofilні клітинні структури (ядро, рибосоми, РНК-збагачені ділянки цитоплазми) в яскраво синій колір, і спиртового барвника кислого еозину, що фарбує еозинofilні структури клітини (цитоплазму) в червоно-рожевий колір. Після вилучення скельця з дистильованої води на зріз за допомогою піпетки наносили 5–7 крапель гематоксиліну і витримували протягом 1-2 хв. Після видалення гематоксиліну скельце поміщали під проточну воду на 2 хв. Після цього скельце поміщали в еозин на 2-3 хв. Для зневоднення препарат поміщали в розчини зі зростаючою концентрацією спирту: 70 % – швидко 5–10 с; 96 % – протягом 2 хв. Після зневоднення на 2 хв поміщали в ксилол.

Після ксилолу препарат накривали покривним скельцем. На фарбований зріз наносили 1-2 краплі бальзаму і накривали покривним скельцем.

Пофарбовані зразки досліджували за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX51.

2.2.3 Скануюча електронна мікроскопія

Підготовка препаратів і проведення досліджень морфологічних особливостей децелюляризованого перикарда методами растрової мікроскопії проводилися за умовами двостороннього договору із лабораторією електронної мікроскопії ТОВ "Нано Технології в Медицині", яка спеціалізується на дослідженнях матеріалів засобами растрової (скануючої) електронної мікроскопії.

Дослідження проводилося на растровому електронному мікроскопі Tescan Mira 3 LMU, що має такі основні характеристики:

- просторова роздільна здатність: $1 \text{ нм} \times 30 \text{ кВ}$, $2 \text{ нм} \times 3 \text{ кВ}$;
- прискорююча напруга: $200 \text{ В} - 30 \text{ кВ}$;
- робочий тиск у камері: режим високого вакууму $\sim 9 \cdot 10^{-3} \text{ Па}$; режим низького вакууму $7 - 150 \text{ Па}$.
- детектори: детектор вторинних електронів (ВЕ); детектор пружно відбитих електронів; детектор ВЕ, вбудований в об'єктивну лінзу; детектор ВЕ для роботи в низькому вакуумі; детектор для досліджень у просвічуючому режимі; система детекторів для реєстрації картини дифракції пружно відбитих електронів;
- енергодисперсійний і хвиледисперсійний спектрометри.

2.2.4 Спектрофлуометричний метод визначення концентрації нуклеїнових кислот

Екстракцію ДНК проводили за допомогою набору ДНК Easy Blood and Tissue (Qiagen, Німеччина). 10–25 мг тканини як із вихідних матеріалів перед децелюляризацією, так і з децелюляризованими зразками протягом

нетривалого часу обробляли протеїназою K, щоб кількісно визначити загальну кількість нуклеїнової кислоти (нг/мг сухої тканини) та розрахувати відсоток видалення ДНК після децелюляризації. Вимірювання флуоресценції (фотонів за секунду) проводили за кімнатної температури в приміщенні ($t = 23-24$ °C), використовуючи спектрофлуориметр для підрахунку фотонів Qubit 3.0. Межа виявлення ДНК становила 0,2 нг/мкг нуклеїнової кислоти.

2.2.5 Біомеханічне тестування

Біомеханічними показниками параметрів міцності екстракорпорального матриксу є його міцність, пружність і пластичність [117–119].

Пружно-міцнісні властивості ліофілізованого екстракорпорального матриксу перикарда ВРХ вивчали в лабораторії технічних випробувань ТОВ “Імпрув Медікел”. Матрикс розтягували на універсальній деформаційній машині для проведення механічних випробувань IMADA (MX2-110, Японія). Використовували стандартні розміри зразків: латки перикарда – 40×40 мм. Зразки тканин міцно фіксували з двох сторін затискачами з абразивним покриттям до робочих частин пристрою. Зразки зберігали у фізіологічному розчині, щоб запобігти висиханню. Товщину зразків вимірювали за допомогою товщиноміра ТН-10.

Деформування тканини перикарда до та після ліофілізації проводили як у поздовжньому, так і в поперечному напрямках. Швидкість деформації V становила 60 мм/хв, граничне значення навантаження F – 4,0 кг. Зразки тканин попередньо піддавалися завантаженню і розвантаженню 60 Н/м за постійної швидкості, подібно до фізіологічного навантаження листків аорти [120], і цей процес повторювався протягом 10 циклів, поки петля напруги деформації зразка не виявлялася періодичною.

Випробування на розтягнення дає можливість робити досить правильні судження про поведінку матеріалу і за інших видів деформації. Вивчення фізико-механічних властивостей тканини включало визначення таких

показників, як товщина (h) і гранична міцність на розрив унаслідок порушення цілісності матеріалу (F_{\max}) [121, 122].

Усі дані біомеханічного тестування були зіставлені з вимогами міжнародного стандарту ISO (5840:2005 “Cardiovascular implants – Cardiac valve prostheses”).

2.2.6 Стерилізація методом радіонуклідного опромінення

Радіаційна стерилізація зразків здійснювалася опроміненням однорідним потоком електронів з енергією 4 MeV різними дозами, від 5 до 30 кГр на лінійному прискорювачі електронів “Електроніка” за температури +20 °C. Час опромінення – 8 хв.

Концентрація вільних радикалів, що утворюються за такої дози опромінення, забезпечує необоротне припинення життєдіяльності будь-яких видів мікроорганізмів на рівні хірургічної стерильності 10^{-6} . Тобто виживає не більше 1 мікроба з мільйона.

Проникна здатність електронів з енергією 4 MeV у речовинах із густиною, близькою до густини води, становить приблизно 1 см, що забезпечує стерилізацію зразків разом із упаковкою за кімнатної температури. Жодних ядерних трансмутацій за такої енергії електронів не відбувається. Тому ніякої наведеної радіації в зразках і упаковці після стерилізації не залишається.

2.2.7 Контроль стерильності

Випробування проводили, використовуючи метод прямого висівання. Для достовірності результатів проводили відповідні негативні контрольні досліді. Невелика кількість зразка була взята для висівання на кожне живильне середовище. Посіви інкубували 14 діб за температури $30 \pm 2,5$ °C у тїогліколевому бульйоні та за температури $22 \pm 2,5$ °C у бульйоні Сабуро. Температуру інкубаторів контролювали та реєстрували щоденно. Паралельно з дослідними пробами ставили незасіяні пробірки для контролю стерильності

самого середовища. Посіви переглядали щоденно, відзначаючи прозорість середовища – відсутність росту (в Ж-5.5-01/01-МБ “Робочий журнал мікробіологічних досліджень”), виявлена візуально. Якщо був ріст, робили фіксовані мазки та мікроскопіювали.

Зразок витримує випробування на стерильність, якщо при візуальному контролі не виявляють ріст мікроорганізмів (помутніння середовища). За наявності росту мікроорганізмів вважають, що зразок не витримує випробування на стерильність, якщо не доведена невірогідність результатів випробування, викликана причинами, не пов’язаними з випробуванням зразка. Результати випробування можуть бути визнані невірогідними, якщо виконується одна або кілька з умов, наведених нижче:

- а) одержано незадовільні результати мікробіологічного контролю навколишнього середовища в ході проведення випробування на стерильність;
- б) виявлено помилки, допущені в ході випробування;
- в) виявлено ріст мікроорганізмів у негативному контролі;
- г) після мікроскопування визнано, що причиною виникнення росту є матеріали і/або технічні прийоми, використані при випробуванні на стерильність.

Якщо результати випробування визнані невірогідними, його повторюють на тій самій кількості зразків, що й початкове. Якщо в результаті повторного випробування не було виявлено росту мікроорганізмів, вважають, що зразок витримує випробування на стерильність. Якщо в результаті повторного випробування було виявлено ріст мікроорганізмів, зразок не витримує випробування на стерильність.

2.2.8 Ліофілізація

Ліофілізацію зразків тканинномодифікованого біосумісного матриксу проводили в постійній ліофільній камері (Ліофілізатор СВЛ-60, UOSLAB) в умовах глибокого вакууму 9×10^{-2} мбар. Розробку і підбір параметрів процесу

ліофілізації проводи на базі науково-виробничого підприємства ТОВ “НПП “УКРОРГСИНТЕЗ”.

2.2.9 Статистична обробка даних

Аналіз результатів дослідження проводився з використанням методів біостатистики [123, 124]. Для кількісних показників проводився аналіз розподілу на нормальність із використанням критерію Шапіро–Уїлка, розраховувалися їх середнє значення (M) і стандартне відхилення ($\pm SD$). Для оцінки середнього значення розраховувався його 95 %-вий довірчий інтервал (95 % ДІ). Для якісних показників розраховувалися частота (%) та, за необхідності, 95 % ДІ. При порівнянні кількісних ознак у більш ніж двох групах використано однофакторний дисперсійний аналіз [123]; постеріорні порівняння проводилися з використанням критерію Шеффе (закон розподілу не відрізнявся від нормального). Для порівняння якісних ознак використовувався критерій χ^2 -квадрат; постеріорні порівняння для більш ніж двох груп проводилися з урахуванням поправки Бонферроні [123].

При проведенні аналізу використані критерії з двосторонньою критичною областю; критичний рівень значимості покладался рівним 0,05.

Статистичний аналіз результатів дослідження проводився в пакеті статистичного пакета EZR v. 1.54 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Японія) [125], що являє собою графічний інтерфейс до R (The R Foundation for Statistical Computing, Австрія).

РОЗДІЛ 3. УДОСКОНАЛЕННЯ СХЕМ ОТРИМАННЯ ТКАНИННОМОДИФІКОВАНОГО БІОСУМІСНОГО МАТРИКСУ НА ОСНОВІ ПЕРИКАРДА ВРХ

За основу науково-технічної розробки зі створення тканинномодифікованого біосумісного матриксу (ТМБМ) було взято одну із п'яти технологій, протестованих на базі ДУ “Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України” спільно з кафедрою трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського [126]. Для тестування ефективності оптимізації технологічних умов отримання було проведено додаткові гістологічні та мікроскопічні дослідження з подальшим визначенням пружно-міцнісних характеристик матриксу.

3.1 Оптимізація технологічних параметрів процесу біотехнологічної трансформації перикарда ВРХ

Одним із головних завдань була оптимізація основних параметрів тканинної модифікації, що дасть змогу скоротити час і витрати на виробництво продукту. Технологічний процес зі створення тканинномодифікованого матриксу передбачає такі етапи:

- взяття біоматеріалу;
- транспортування біоматеріалу до лабораторії;
- препарування, нарізання на латки (шматочки заданої величини);
- осмотичний шок;
- децелюляризація;
- детоксикація;
- стабілізація та фіксація;
- крос-лінкінг (зшивання);
- відмивання.

Забір біологічного матеріалу – перикардіальної сумки ВРХ – здійснювали за розкладом планових скотобійних робіт заводу “Козятинський м'ясокомбінат”, що давало змогу ефективно планувати логістику та

препарування матеріалу в лабораторії. Впродовж 4 год від забою зразки нарізали на латки розміром 50×50 мм. У процесі роботи було визначено основні критерії вибракування матеріалу, а саме: нерівномірна товщина, подряпини, складки, вм'ятини, бляшки.

Оптимальний час для очищення від крові та екстракції водорозчинних білків – 3 год.

У табл. 3.1 наведено основні технологічні параметри технологічного процесу, що були взяті за основу і піддавались оптимізації. Загальний час, що витрачається на виробництво, – 48 днів.

Таблиця 3.1

Параметри процесу тканинної модифікації перикарда ВРХ до оптимізації

Технологічна операція	Реагент	Температурний режим	Тривалість	Центрифугування
Осмотичний шок	Стерильна дистильована вода	4 °С	74 год	–
Децелюляризація	0,1 % SDS	24 °С	35 днів	200 об/хв
Детоксикація	Дистильована вода	4 °С	7 діб	200 об/хв
Стабілізація та фіксація	70 % етанол	4 °С	24 год	200 об/хв
Крос-лінкінг	EDC/NHS-MES	24 °С	12 год	50 об/хв
Відмивання	0,9 % NaCl	4 °С	24 год	200 об/хв

Для проведення процесу децелюляризації допускається персонал, що має документально підтвержену фахову підготовку роботи в біотехнологічній лабораторії. Для забезпечення стерильності персонал має бути одягнений у лабораторний халат, захисні латексні рукавички, маску, шапочку та бахіли.

Технологія децелюляризації перикарда ВРХ шляхом осмотичного шоку за допомогою 12 %-вого розчину NaCl включає такі реактиви та обладнання:

1. Реактив NaCl 120 г.
2. Стерильна дистильована вода 1000 мл.
3. Ваги аналітичні.
4. Ємність для приготування розчину (скляний циліндр об'ємом 1000 мл).
5. Пластмасова ложка для набору реактиву.
6. Пластмасова ємність для зважування NaCl.

Технологічна схема проведення осмотичного шоку.

1. У попередньо підготовлений скляний циліндр налити 500 мл дистильованої води.
2. На аналітичних вагах зважити пластмасову ємність для NaCl. Скинути ваги у положення "0".
3. За допомогою пластмасової ложки набрати необхідну кількість реактиву NaCl – 120 г.
4. Висипати зважений реактив у скляний циліндр із водою, струшуючи розмішати.
5. Долити необхідну кількість дистильованої води у розчин – 500 мл, струшуючи розмішати до повного розчинення NaCl, тобто до прозорого кольору самого розчину.

Для визначення оптимального часу проведення осмотичного лізису було сформовано 3 групи зразків для подальшого дослідження. У групі контролю зразки були поміщені в дистильовану воду, зразки дослідної групи 1 – у 12 %-вий розчин NaCl, зразки дослідної групи 2 – у 12 %-вий розчин NaCl із постійним перемішуванням за 200 об/хв. Результати оцінювали візуально за допомогою світлової мікроскопії нативного препарату. Було визначено відсутність видимих клітин у зразках дослідної групи 2 за тривалості осмотичного лізису 24, 48, 72 год (табл. 3.2). У той же час без застосування шейкера час осмотичного лізису тривав 72 год. Ці дані дали змогу скоротити технологічний процес виробництва на 48 год.

Результати оптимізації тривалості проведення осмотичного шоку в технологічній схемі отримання тканинномодифікованого матриксу з перикарда ВРХ

Тривалість	Контроль	Дослідна група 1	Дослідна група 2
12 год	Наявність видимих клітин	Наявність видимих клітин	Наявність видимих клітин
24 год	Наявність видимих клітин	Наявність видимих клітин	Відсутність видимих клітин
48 год	Наявність видимих клітин	Наявність видимих клітин	Відсутність видимих клітин
72 год	Наявність видимих клітин	Відсутність видимих клітин	Відсутність видимих клітин

Технологія децелюляризації перикарда ВРХ за допомогою 0,1 % SDS передбачає використання таких реактивів і обладнання:

1. Реактив SDS 1 г.
2. Стерильна дистильована вода 1000 мл.
3. Ваги аналітичні.
4. Ємність для приготування розчину (скляний циліндр об'ємом 1000 мл).
5. Пластмасова ложка для набору реактиву.
6. Пластмасова ємність для зважування SDS.

Для проведення процесу децелюляризації допускається персонал, що має документально підтверджену фахову підготовку роботи в біотехнологічній лабораторії. Для забезпечення стерильності персонал має бути одягнений у лабораторний халат, захисні латексні рукавички, маску, шапочку та бахіли.

Нами було розроблено технологічну схему децелюляризації:

1. У попередньо підготовлений скляний циліндр налити приблизно 700–800 мл дистильованої води.

2. На аналітичних вагах зважити пластмасову ємність для SDS. Скинути ваги в положення “0”.

3. За допомогою пластмасової ложки набрати необхідну кількість SDS – 1 г, намагаючись при цьому взагалі не дихати.

4. Висипати зважений реактив у скляний циліндр із водою, струшуючи розмішати.

5. Долити необхідну кількість дистильованої води у розчин – 200–300 мл, струшуючи розмішати до повного розчинення SDS, тобто до однорідного розчину з мильними бульбашками.

Для визначення оптимального часу проведення децелюляризації було сформовано 2 групи зразків із різним температурним режимом. У групі 1 процес децелюляризації проводили за температури +4 °С, а в групі 2 – за +24 °С. Результати оцінювали спектрофлуориметрично за кількістю нуклеїнових кислот у зразках. Ефективною вважали децелюляризацію при <50 нг дволанцюгової ДНК у 1 мг сухої ваги позаклітинного матриксу. За результатами експерименту встановлено, що за температури +4 °С найнижчий рівень нуклеїнових кислот спостерігається на 5-й день децелюляризації, а за +24°С – лише на 35-й день. Таким чином, вдалося скоротити час експозиції на 30 днів (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Результати оптимізації тривалості проведення децелюляризації в технологічній схемі отримання тканинномодифікованого матриксу із перикарда ВРХ

Досліджувана група	Тривалість децелюляризації, днів	Наявність нуклеїнових кислот, нг/мг (M ± SD)
Група 1 (+4 °С)	1	120 ± 7,37
	2	50 ± 2,10
	3	15,5 ± 1,71
	4	7,3 ± 0,64

	5	$\leq 5 \pm 0,33$
	6	$\leq 5 \pm 0,13$
	7	$\leq 5 \pm 0,21$
Група 2 (+24 °C)	1	$140 \pm 8,64$
	2	$134 \pm 6,61$
	3	$132 \pm 5,32$
	4	$130 \pm 6,12$
	5	$130 \pm 5,45$
	10	$88 \pm 4,63$
	15	$50 \pm 3,52$
	20	$20 \pm 1,32$
	25	$9,8 \pm 1,11$
	30	$6,1 \pm 0,68$
	35	$\leq 5 \pm 0,33$

Технологія стабілізації та фіксації 70 %-вим етанолом децелюляризованого перикарда ВРХ передбачає застосування таких реактивів та обладнання.

1. Спирт 100 %.
2. Стерильна дистильована вода.
3. Ємність для приготування 70 %-вого етанолу (скляний циліндр об'ємом 1000 мл).

У попередньо підготовлений скляний циліндр налити 300 мл дистильованої води. У скляний циліндр із водою долити 700 мл спирту і розмішати. Отримано 70 %-вий етанол.

Загальний час виробництва тканиномодифікованого матриксу після оптимізації основних параметрів становить **16 діб**.

3.2 Оцінка фізико-біологічних параметрів тканинномодифікованого матриксу, отриманого за оптимізованою схемою

Відомо, що клітинні компоненти, включаючи нуклеїнові кислоти ксеногенних тканин, є сильними антигенами, які запускають імунологічні реакції в реципієнта, що провокує відторгнення трансплантата. Процес децелюляризації, покладений в основу біотехнологічної трансформації тканини, забезпечує повне очищення колагенового матриксу перикарда ВРХ від клітин та їх компонентів [19]. Використання високих концентрацій SDS і глутаральдегіду може призвести до порушення архітекtonіки матриксу. Тому оптимізована технологія передбачає відмову від токсичного альдегіду, що також сприяє формуванню кальцифікатів при імплантації *in vivo*, та використання низької концентрації розчину SDS (0,1 %). Для етапу фіксації було запропоновано 10 мМ 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїміду та 10 мМ N-гідроксисукциніміду за наявності 0,05 М MES-буферу (2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти). Ефективність процесу оцінювали для неліофілізованого матриксу.

Для оцінки процесу децелюляризації проводили дослідження зразків методом світлової мікроскопії (зразки, пофарбовані гематоксилін-еозином) та методом СЕМ. Використання гістологічного методу дає змогу оцінити ступінь очистки матриксу від клітин і ступінь структурних змін колагенових волокон. Як контроль використовували нативний перикард ВРХ, що мав вигляд вузької пластинки із товстими колагеновими і тонкими еластиновими волокнами та зі щільно оформленою сполучною тканиною. У контрольних зразках нативного перикарда спостерігали в невеликій кількості веретеноподібної форми фібробласти з паличкоподібним темно-фіолетовим ядром і слабо-фіолетовою цитоплазмою (рис. 3.1, А). Структура колагену нагадувала щільні звиті пучки, що розташовувались паралельно один до одного. Така архітекtonіка волокна забезпечує стійкість перикарда до механічної напруги.

У оптимізованій технології отримання децелюляризованого позаклітинного матриксу (ДПМ) ефект повної очистки від клітин і

компонентів спостерігався через 21 день децелюляризації (рис. 3.1, Б). У всіх зразках структура колаген-еластинового каркасу була подібною до нативного перикарда. Колагенові волокна були більш ущільненими, міжпучкові простори практично відсутні. В деяких полях зору фіксували зменшення амплітуди звивистості волокон відносно нативної тканини і навпаки – місцями вигини волокон збільшували свою амплітуду. Пучки формували товсті тяжі, між якими локально формувалися простори з тонкими фрагментованими волокнами.

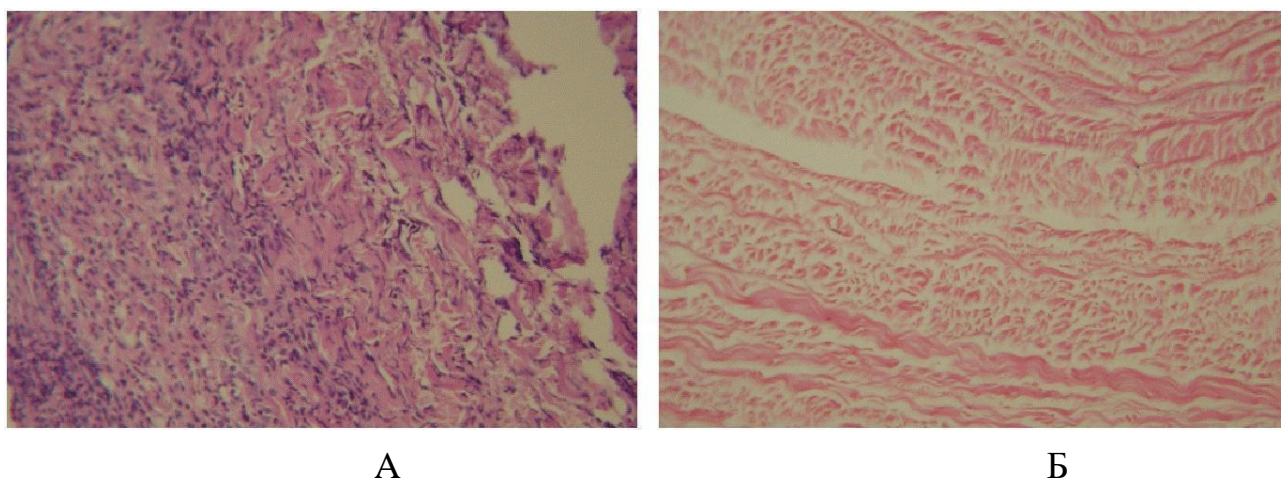


Рис. 3.1. Мікрофотографії гістологічних препаратів нативного та децелюляризованого перикарда ВРХ (фарбування гематоксилін-еозином, світлова мікроскопія, $\times 200$): А – наявність видимих фіолетово зафарбованих клітин, колаген-еластинові волокна щільні, структуровані (нативний перикард ВРХ); Б – відсутність видимих клітин, колагенові та еластинові волокна меншої щільності, але без структурних змін (децелюляризований перикард 0,1 % SDS та EDC/NHS крос-лінкінг)

Якісний мікроструктурний аналіз СЕМ-зображень також підтвердив відсутність очевидних змін у структурі та розподілі між колагеновими та еластиновими волокнами ДПМ перикарда ВРХ (рис. 3.2). Волокна компактно розташовані одне відносно одного.

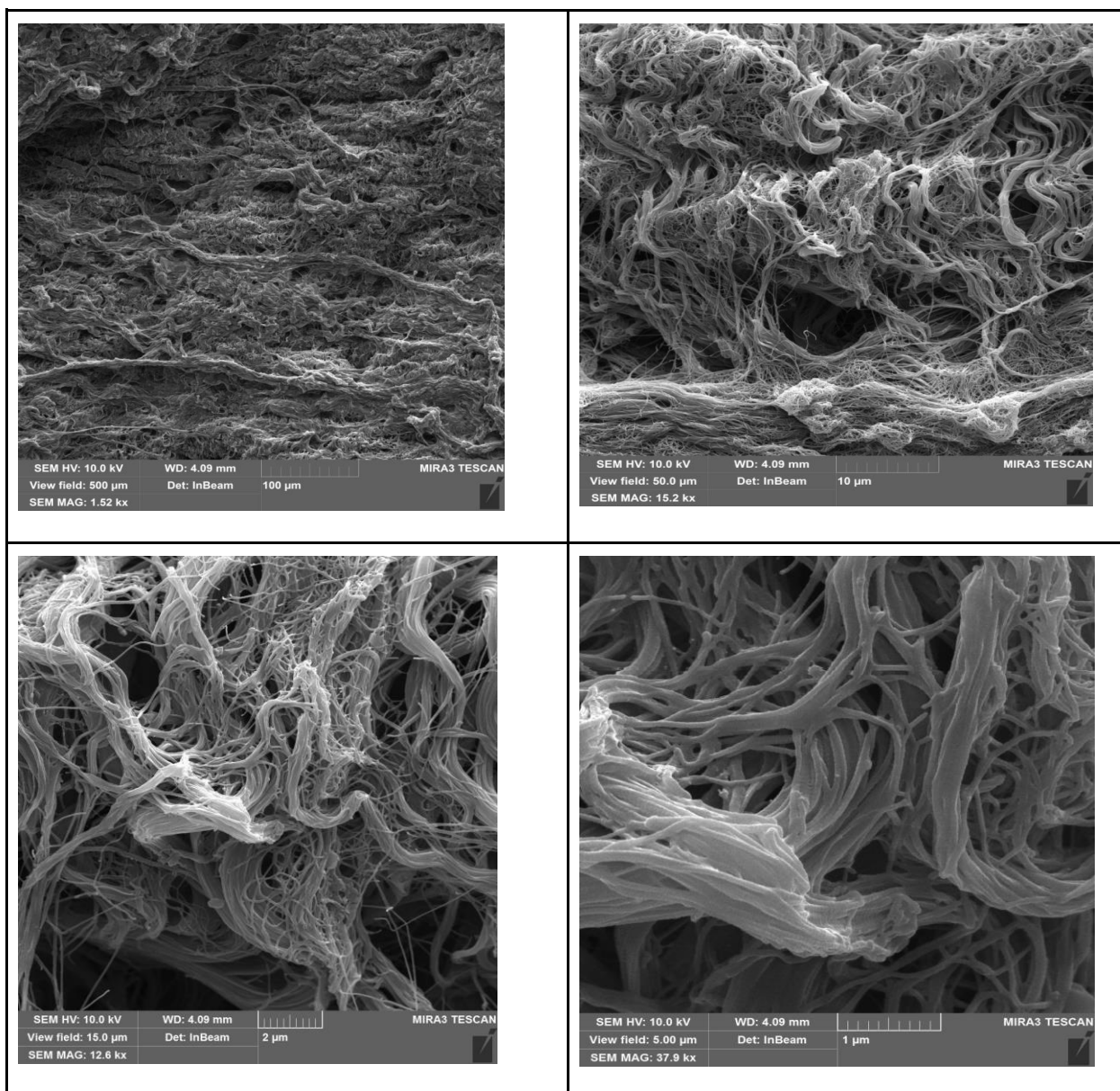


Рис. 3.2. Мікрофотографії СЕМ децелюляризованого перикарда ВРХ (0,1 % SDS та EDC/NHS крос-лінкінг)

Вивчення біомеханічних властивостей показало, що децелюляризована матриця не тільки не змінила своїх природних властивостей, але й набула більшої міцності після процесу очищення та зшивання. Про це свідчить підвищення майже у 2 рази значення граничної міцності на розрив у зразках дослідної групи, що було визначено поздовжнім тестуванням тканин (табл. 3.4).

Порівняльна характеристика нативного та децелюляризованого перикардів

Дослідження	Гранична міцність на розрив F_{\max} , кГс ($M \pm SD$)	
	Контроль ($n = 25$)	Експеримент ($n = 25$)
Поздовжнє дослідження тканини	6,84 ± 0,69	9,55 ± 0,65*
Поперечне дослідження тканини	3,78 ± 0,36	4,56 ± 0,37*

*Відмінність статистично значима порівняно з контрольною групою ($P < 0,05$).

Результати нашого дослідження дали можливість отримати скафолд із ксенотканини, який за своїми біомеханічними та біологічними характеристиками подібний до нативного перикарда ВРХ. У процесі децелюляризації використовували іонний мийний засіб SDS, здатний зв'язуватися з волокнами колагену, тим самим руйнуючи їх та сприяючи набряку тканини, викликаному потенційним розривом водневих зв'язків колагенових волокон [19, 127]. Повідомлялося, що SDS сильно взаємодіє з білками ЕСМ, і це ускладнює його повне видалення [128]. Н. Лі з колегами [129] також зазначають, що залишковий SDS у децелюляризованих тканинах може призвести до недостатньої репопуляції з клітинами-господарями після імплантації, що спричиняє зниження міцності імплантата й інгібування росту. Це чітко корелювало з результатами досліджень імплантації ксенотканини щурам, де навколо 1 % імплантів, оброблених SDS, був виявлений періімплантаційний некроз.

SDS, дія якого спрямована на очищення матриксу солюбілізацією цитоплазматичних і ядерних компонентів при збереженні архітектоники матриксу та без впливу на біосумісні властивості скафолду, є ефективним у використанні. Наше дослідження підтверджує гіпотезу та демонструє ефективне використання 0,1 %-вого детергенту SDS із низькою концентрацією та зшиванням EDC/NHS для децелюляризації бичачого перикарда. Х.Л.Б. Тран із колегами [130] також показали, що 0,1 %-вий розчин

SDS краще підходить для перикардiальної децелюляризації свиней, ніж 0,3 або 0,5 %-вий розчин SDS, оскільки біологічні властивості ешафоту є більш стійкими.

У нашому дослідженні аналіз мікроструктури зразків, отриманих методами світлової мікроскопії (зафарбовані гематоксилін-еозином) і СЕМ, також підтвердив відсутність будь-яких змін у структурі колагену. На підставі цих фактів була підтверджена гіпотеза, що використання розчину SDS у низькій концентрації (0,1 %) дасть змогу здійснити ефективну децелюляризацію. Встановлено, що децелюляризований бичачий перикард мав більш високі біомеханічні характеристики, ніж природний перикард. Деякі вчені повідомляли, що колагенові фібрили більш щільно упаковані після зшивання з EDC/NHS і їх структура є більш однорідною, ніж структура незшитих [131]. Крім того, зшиті скафолди EDC мали відмінні механічні властивості та біосумісність.

Таким чином, дослідження фізико-біологічних особливостей ТМБМ, отриманого за оптимізованою схемою виробництва, підтвердило високу якість продукту.

Висновки до розділу 3

У результаті експериментальних досліджень вдалося оптимізувати тривалість виробництва тканинномодифікованого матриксу із перикарда ВРХ. Зміна температурного режиму процесу децелюляризації та залучення додаткового процесу перемішування при осмотичному лізису клітин дає змогу значно скоротити час експозиції – із 48-ми до 16-ти діб. Така оптимізація вкрай важлива, адже зменшується ризик структурних змін і пошкодження колагенових волокон тканини. Ефективність оптимізованих режимів обробки перикарда підтверджено гістологічно та мікроскопічно. Пружно-міцнісні властивості матриксу не тільки не знизились, а й стали вищими порівняно з нативним перикардом.

РОЗДІЛ 4. УДОСКОНАЛЕННЯ СХЕМ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ТА ЛЮФІЛІЗАЦІЇ ТКАНИННОМОДІФІКОВАНОГО БІОСУМІСНОГО МАТРИКСУ НА ОСНОВІ ПЕРИКАРДА ВРХ

Медичною дозою стерилізації вважається концентрація вільних радикалів, що утворюються за дози опромінення 25–30 кГр. Така доза забезпечує необоротне припинення життєдіяльності будь-яких видів мікроорганізмів на рівні хірургічної стерильності 10^{-6} . Тобто виживає не більше 1 мікроба із мільйона. При радіаційній стерилізації електрони прискорюються до високих енергій, що дає їм змогу проникати в середовище зі щільністю, близькою до щільності води, на глибину до 2,5 см. У продукті виникає іонізація, яка призводить до пошкодження внутрішньоклітинних структур і подальшої загибелі мікроорганізмів. Зі збільшенням дози опромінення ефективність антимікробної дії зростає. Жодних ядерних трансмутацій за такої енергії електронів не відбувається. Тому іонізуюче випромінювання у великих дозах (>10 кГр) широко використовується для стерилізації біопрепаратів, медичних інструментів і медичних виробів [12]. Проте слід зазначити, що високі дози радіації можуть необоротно впливати на білкову структуру колагенових та еластинових волокон матриксу [13].

У нашому дослідженні було проведено підбір стерилізаційної дози опромінення біотканини для досягнення оптимального балансу стерильність/пошкодження колагенового каркасу матриксу. Зразки ТМБМ у формі пластин розміром $50 \times 50 \pm 5$ мм товщиною $0,3 \pm 0,025$ мм були герметично упаковані в поліетиленові пакети товщиною 0,1 мм із розчином стерильної води для ін'єкцій.

Радіаційна стерилізація зразків здійснювалася опроміненням однорідним потоком електронів з енергією 4 МеВ різними дозами – 5, 10, 15, 20, 25, 30 кГр – на лінійному прискорювачі електронів “Електроніка” за температури +20 °С. Час опромінення – 8 хв.

4.1 Дослідження впливу різних концентрацій радіонуклідів на структуру колагенових волокон матриксу

Для дослідження було використано по 5 гістологічних препаратів із кожного досліджуваного зразка. Облік ступеня пошкодження колагенових волокон проводили в 5-ти різних полях зору (на 1 дослідну групу – 25 полів зору). Для оцінки впливу радіонуклідів на структуру волокон матриксу визначали кількість колагенових волокон на досліджувану площу поля зору мікроскопа. Результати маркували за такою схемою:

0 – кількість непошкоджених колагенових волокон, що відповідає нативному перикарду ВРХ;

1 – 61–90 % непошкоджених колагенових волокон відносно нативного перикарда ВРХ;

2 – 41–60 % непошкоджених колагенових волокон відносно нативного перикарда ВРХ;

3 – 40 % і менше непошкоджених колагенових волокон відносно нативного перикарда ВРХ.

Таким чином, не виявлено статистично значимої відмінності показника кількості колагенових волокон між групами ($p = 0,103$ за критерієм Крускала–Уолліса) (табл. 4.1). У той же час слід відзначити наявність тенденції до зростання вираженості зміни (зменшення) кількості колагенових волокон з підвищенням дози опромінення ($p = 0,014$ за критерієм Джохнієра–Терпста). За дози опромінення 5–15 кГр середнє значення колагенових волокон у полі зору відповідає кількості волокон тканиномодифікованого матриксу, що не піддавався впливу радіаційного опромінення. Це свідчить, що такі дози не спричиняють структурних змін у матриксі й можуть бути використані для стерилізації імпланта. В той же час дози опромінення 20, 25, 30 кГр призводять до розшарування волокон матриксу і порушення його щільності у 40 % і менше випадків.

**Гістологічне дослідження кількості колагенових волокон на
тестовану/досліджувану площу зразків перикарда ВРХ**

Досліджувана група	Середнє значення кількості колагенових волокон, % (M ± SD)	Рівень значимості відмінності <i>p</i>
Нативний перикард ВРХ (<i>n</i> = 25)	0,08 ± 0,28	0,103
ТМБМ до опромінення (<i>n</i> = 25)	0,12 ± 0,33	
ТМБМ, опромінений дозою 5 кГр (<i>n</i> = 25)	0,16 ± 0,37	
ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр (<i>n</i> = 25)	0,2 ± 0,41	
ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр (<i>n</i> = 25)	0,24 ± 0,44	
ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр (<i>n</i> = 25)	0,32 ± 0,56	
ТМБМ, опромінений дозою 25 кГр (<i>n</i> = 25)	0,4 ± 0,71	
ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр (<i>n</i> = 25)	0,56 ± 0,82	

Примітка: для порівняння між групами використано критерій Крускала–Уолліса.

Наступним критерієм оцінки впливу різних доз радіаційного опромінення на ТМБМ було визначення структури та просторової орієнтації колагенових волокон. Визначали відсоткову частку волокон із порушеною орієнтацією та структурними змінами на товщину зрізу розміром 530 мкм. Результати маркували за такою схемою:

0 – орієнтація і структура колагенових волокон повторюють непошкоджений нативний перикард ВРХ;

1 – порушені орієнтація та цілісність 61–90 % колагенових волокон;

2 – порушені орієнтація та цілісність 41–60 % колагенових волокон;

3 – порушені орієнтація та цілісність 40 % і менше колагенових волокон відносно непошкодженого нативного перикарда ВРХ.

Таким чином, не виявлено статистично значимої відмінності показника орієнтації та структури колагенових волокон між групами (*p* = 0,094 за

критерієм Крускала–Уолліса) (табл. 4.2). У той же час слід відзначити наявність тенденції до посилення вираженості порушення структури та орієнтації колагенових волокон перикарда ВРХ із підвищенням дози опромінення ($p = 0,018$ за критерієм Джохніера–Терпста). Дози опромінення 20 та 25 кГр призводять до порушення орієнтації та цілісності близько 30 % колагенових волокон (рис. 4.1, Е, Є), а доза 30 кГр – більше 50 % (рис. 4.1, Ж), що унеможлиблює їх використання для стерилізації біологічної тканини. В той же час дози опромінення 5, 10, 15 кГр не чинять суттєвого впливу на структуру та орієнтацію колагенових волокон (рис. 4.1, В, Г, Д).

Таблиця 4.2

**Гістологічне дослідження структури та орієнтації колагенових волокон
ТМБМ за різних доз радіаційного опромінення**

Дослідна група	Середнє значення порушення структури та орієнтації колагенових волокон, % ($M \pm SD$)	Рівень значимості відмінності p
Нативний перикард ВРХ ($n = 25$)	$0,04 \pm 0,2$	0,094
ТМБМ до опромінення ($n = 25$)	$0,08 \pm 0,28$	
ТМБМ, опромінений дозою 5 кГр ($n = 25$)	$0,12 \pm 0,33$	
ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр ($n = 25$)	$0,2 \pm 0,41$	
ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр ($n = 25$)	$0,2 \pm 0,41$	
ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр ($n = 25$)	$0,28 \pm 0,54$	
ТМБМ, опромінений дозою 25 кГр ($n = 25$)	$0,36 \pm 0,64$	
ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр ($n = 25$)	$0,52 \pm 0,87$	

Примітки: для порівняння між групами використано критерій Крускала–Уолліса.

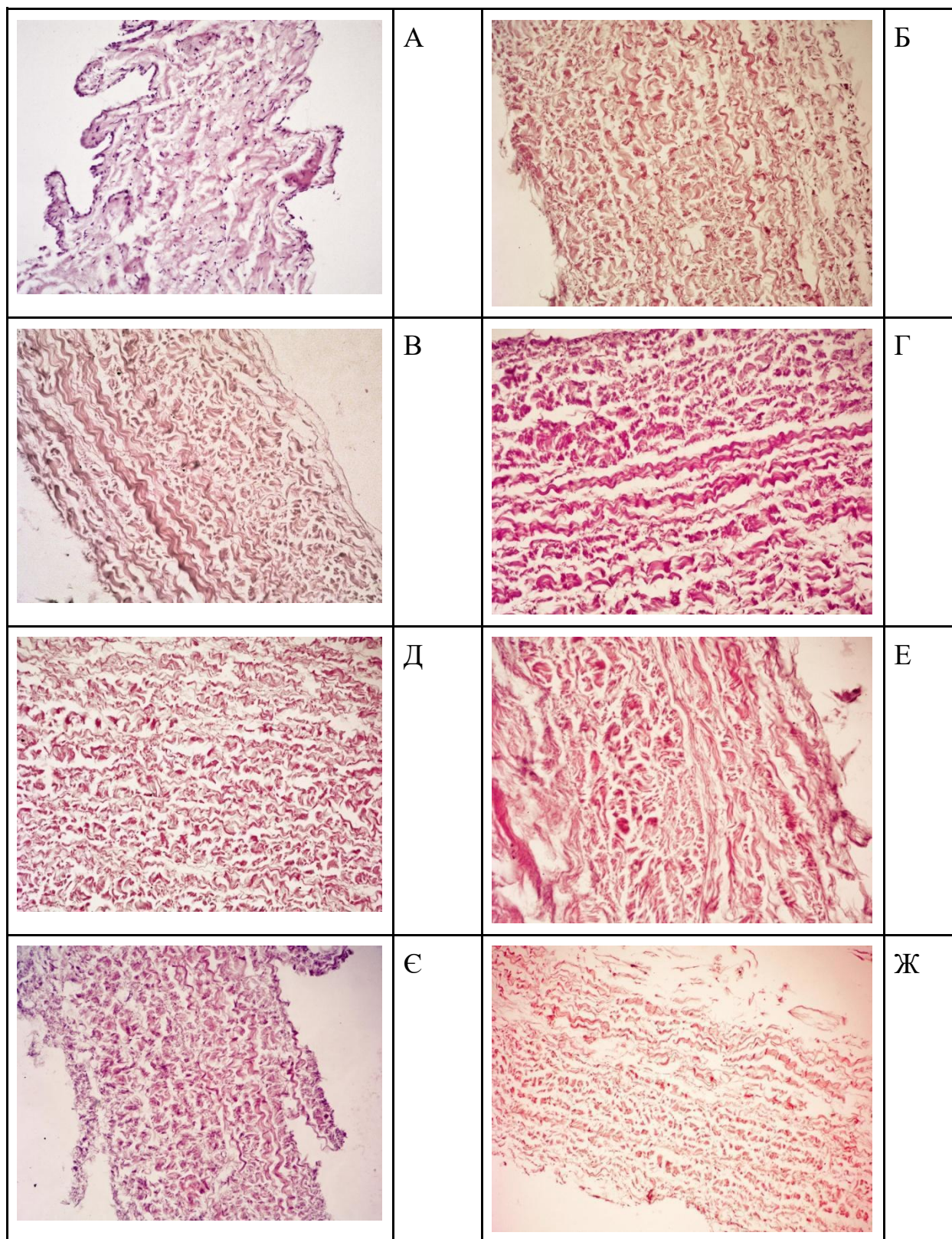


Рис. 4.1. Кількість, структура та орієнтація колагенових волокон децелюляризованого позаклітинного матриксу (0,1 % SDS і EDC/NHS крос-лінкінг), виготовленого на основі перикарда ВРХ після стерилізації різними дозами опромінення. Світлова мікроскопія, фарбування гаматоксилін-еозином, $\cdot 200$. А – нативний перикард ВРХ; Б – ТМБМ до опромінення; В –

ТМБМ, опромінений дозою 5 кГр; Г – ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр; Д – ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр; Е – ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр; Є – ТМБМ, опромінений дозою 25 кГр; Ж – ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр

4.2 Дослідження впливу різних доз радіаційного опромінення на біомеханічні властивості ТМБМ

Біомеханічні показники параметрів міцності сполучнотканинних структур є важливими і загальноприйнятими характеристиками біоматеріалу [132, 133]. Вони характеризують міцність, пружність і пластичність матеріалу. В результаті дослідження впливу різних доз радіаційного опромінення встановлено, що гранична міцність на розрив зразків перикарда ВРХ із поздовжньою орієнтацією волокон статистично значимо ($p < 0,001$ за ANOVA) відрізняється (табл. 4.3). На рис. 4.2 показано середні значення граничної міцності на розрив зразків перикарда ВРХ із поздовжньою орієнтацією колагенових волокон із розрахованим 95 % ВІ. Проведений аналіз свідчить про значиме ($p < 0,05$) зниження показника для груп 5, 6, 7 порівняно з групами 0, 1, 2, 3, 4 (табл. 4.3, рис. 4.2).

Таблиця 4.3

Показники граничної міцності на розрив при поздовжній орієнтації волокон зразків ТМБМ за різних доз радіаційного опромінення

Дослідна група	Середнє значення граничної міцності на розрив, Н ($M \pm SD$)	Рівень значимості відмінності p
Нативний перикард ВРХ ($n = 10$)	$167,5 \pm 5,5^{1,5,6,7}$	<0,001
ТМБМ до опромінення ($n = 10$)	$176,8 \pm 7,1^{0,5,6,7}$	
ТМБМ, опромінений дозою 5 кГр ($n = 10$)	$171 \pm 3,9^{5,6,7}$	
ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр ($n = 10$)	$173,2 \pm 5,6^{5,6,7}$	

ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр ($n = 10$)	$171 \pm 5^{5,6,7}$
ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр ($n = 10$)	$158,1 \pm 4,7^{0,1,2,3,4,7}$
ТМБМ, опромінений дозою 25 кГр ($n = 10$)	$156,9 \pm 4,5^{0,1,2,3,4,7}$
ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр ($n = 10$)	$145,7 \pm 3,2^{0,1,2,3,4,5,6}$

Примітки: для порівняння між групами використано дисперсійний аналіз, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Шеффе:

⁰ – відмінність від показника групи “Нативний перикард ВРХ” статистично значима, $p < 0,05$;

¹ – відмінність від показника “ТМБМ до опромінення” статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від показника для 5 кГр статистично значима, $p < 0,05$;

³ – відмінність від показника для 10 кГр статистично значима, $p < 0,05$;

⁴ – відмінність від показника для 15 кГр статистично значима, $p < 0,05$;

⁵ – відмінність від показника для 20 кГр статистично значима, $p < 0,05$;

⁶ – відмінність від показника для 25 кГр статистично значима, $p < 0,05$;

⁷ – відмінність від показника для 30 кГр статистично значима, $p < 0,05$.

При цьому слід відзначити деяке підвищення поздовжньої міцності для зразків тканиномодифікованого матриксу порівняно із нативними зразками ($p < 0,05$). Також для зразків ТМБМ, опромінених дозою 30 кГр, показник граничної міцності на розрив у волокон поздовжньої орієнтації є найнижчим ($p < 0,05$ для всіх груп порівняння, табл. 4.3, рис. 4.2).

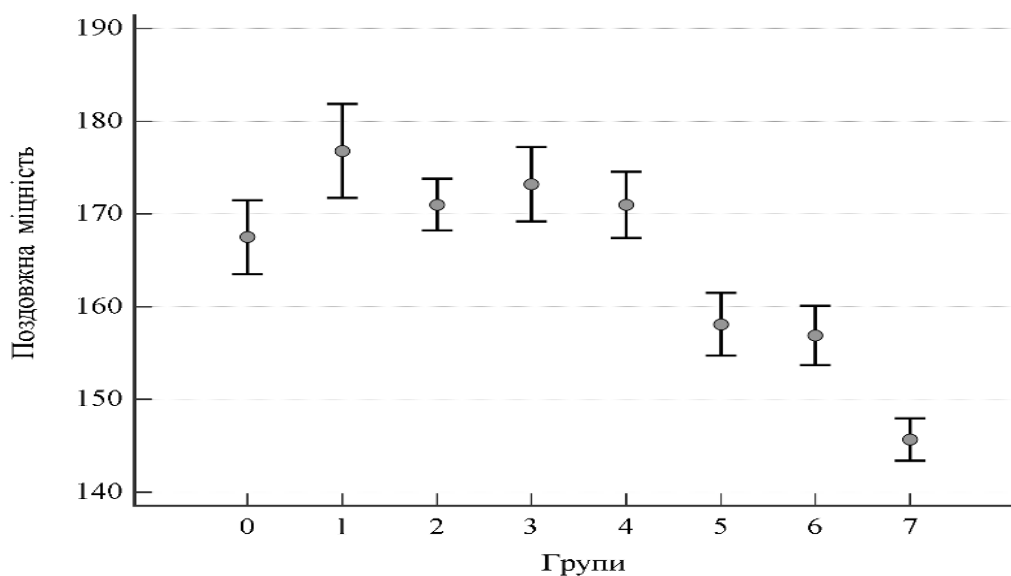


Рис. 4.2. Середні значення граничної міцності на розрив зразків перикарда ВРХ, поздовжня орієнтація волокон (указаний 95 % ВІ) в різних

групах: 0 – нативний перикард ВРХ, 1 – ТМБМ до опромінення, 2 – ТМБМ, опромінений дозою 5 кГр, 3 – ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр, 4 – ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр, 5 – ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр, 6 – ТМБМ, опромінений дозою 25 кГр, 7 – ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр

Таким чином, дози опромінення в 20, 25 і 30 кГр, порушуючи поздовжню структуру та орієнтацію колагенових волокон, призводять до зниження пружно-міцнісних властивостей перикарда, що є незадовільним результатом процесу виготовлення біоімпланта. Дози опромінення 5, 10, 15 кГр не спричиняють порушень поздовжньої структури волокон матриксу і можуть бути застосовані для забезпечення стерильності біоімпланта.

Таблиця 4.4

Показники граничної міцності на розрив при поперечній орієнтації волокон зразків ТМБМ за різних доз радіаційного опромінення

Дослідна група	Середнє значення граничної міцності на розрив, Н (М ± SD)	Рівень значимості відмінності <i>p</i>
Нативний перикард ВРХ (n = 10)	65,7 ± 4,4 ^{4,5,6,7}	<0,001
ТМБМ до опромінення (n = 10)	69,4 ± 2,8 ^{4,5,6,7}	
ТМБМ, опромінений дозою 5 кГр (n = 10)	70,5 ± 3,2 ^{4,5,6,7}	
ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр (n = 10)	71,5 ± 4 ^{4,5,6,7}	
ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр (n = 10)	58,6 ± 3,3 ^{0,1,2,3,5,6,7}	
ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр (n = 10)	42 ± 3,3 ^{0,1,2,3,4,6,7}	
ТМБМ, опромінений дозою 25 кГр (n = 10)	32,1 ± 4,1 ^{0,1,2,3,5}	
ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр (n = 10)	26,5 ± 2,2 ^{0,1,2,3,5}	

Примітки: для порівняння між групами використано дисперсійний аналіз, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Шеффе:

⁰ – відмінність від показника “Нативний перикард ВРХ” статистично значима, *p* < 0,05;

¹ – відмінність від показника “ТМБМ до опромінення” статистично значима, *p* < 0,05;

- ² – відмінність від показника для 5 кГр статистично значима, $p < 0,05$;
³ – відмінність від показника для 10 кГр статистично значима, $p < 0,05$;
⁴ – відмінність від показника для 15 кГр статистично значима, $p < 0,05$;
⁵ – відмінність від показника для 20 кГр статистично значима, $p < 0,05$;
⁶ – відмінність від показника для 25 кГр статистично значима, $p < 0,05$;
⁷ – відмінність від показника для 30 кГр статистично значима, $p < 0,05$.

Встановлено, що гранична міцність на розрив для зразків із поперечною орієнтацією волокон статистично значимо ($p < 0,001$ за ANOVA) відрізняється (табл. 4.4). На рис. 4.3 представлено середні значення граничної міцності на розрив зразків із поперечною орієнтацією волокон із розрахованим 95 % ВІ.

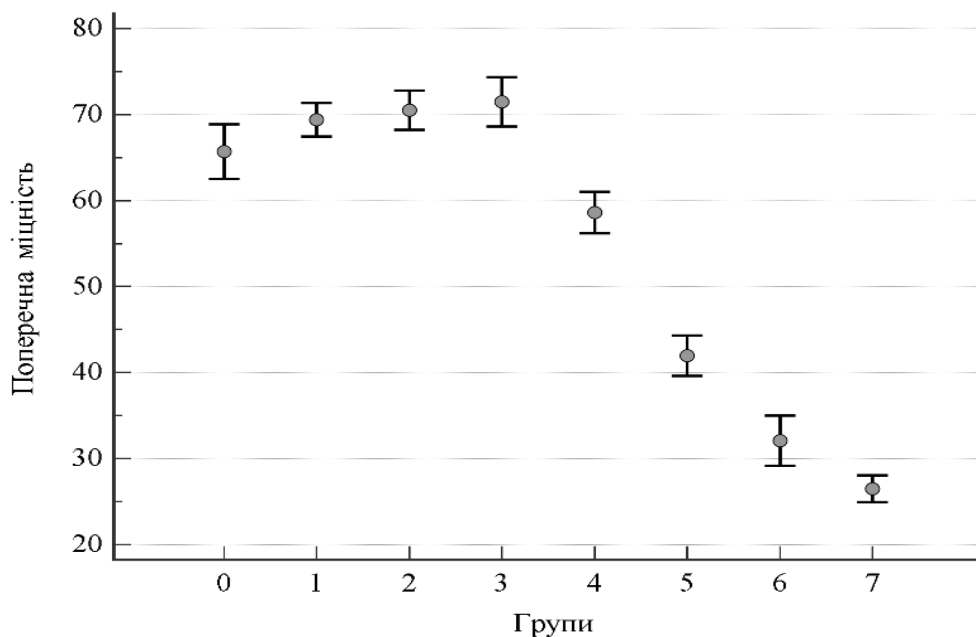


Рис. 4.3. Середні значення граничної міцності на розрив зразків перикарда ВРХ, поперечна орієнтація волокон (указаний 95 % ВІ) в досліджуваних групах: 0 – нативний перикард ВРХ, 1 – ТМБМ до опромінення, 2 – ДТМБМ, опромінений дозою 5 кГр, 3 – ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр, 4 – ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр, 5 – ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр, 6 – ТМБМ, опромінений дозою 25 кГр, 7 – ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр

Проведений аналіз свідчить про відсутність відмінності показників граничної міцності на розрив у зразках перикарда із поперечною орієнтацією волокон для груп 0, 1, 2, 3 ($p > 0,05$, табл. 4.4, рис. 4.3). За доз опромінення 15 кГр і вище починається різке зниження ($p < 0,05$, табл. 4.4, рис. 4.3)

показника міцності на розрив у досліджуваних зразках, і за дози 30 кГр показник досягає значення всього лише $26,5 \pm 2,2$ Н.

Таким чином, згідно з отриманими даними з біомеханічного тестування ТМБМ, стерилізованого радіаційним опроміненням, встановили, що дози опромінення 5 і 10 кГр є такими, що не спричиняють порушень міцності біоімпланта.

4.3 Оцінка стерильності/контроль стерильності

Важливим критерієм оцінки стерилізаційного впливу радіаційного опромінення є відсутність будь-яких мікроорганізмів при посіві матеріалу на живильні середовища. Для контролю стерильності ТМБМ, опроміненого 5, 10, 15, 20, 25, 30 кГр, використовували тіогліколевий бульйон та середовище Сабуро для визначення росту грибів. У результаті тестування встановлено статистично достовірну різницю при виявленні стерильності в досліджуваних групах, $p < 0,001$ (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Результати аналізу зразків ТМБМ на стерильність

Група	Середнє значення кількості стерильних зразків, %	Рівень значимості відмінності p
Нативний перикард ВРХ ($n = 10$)	0 (0) ^{3,4,5,6,7}	<0,001
ТМБМ до опромінення ($n = 10$)	0 (0) ^{3,4,5,6,7}	
ТМБМ, опромінений дозою 5 кГр ($n = 10$)	0 (0) ^{3,4,5,6,7}	
ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр ($n = 10$)	10 (100) ^{0,1,2}	
ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр ($n = 10$)	10 (100) ^{0,1,2}	
ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр ($n = 10$)	10 (100) ^{0,1,2}	
ТМБМ, опромінений дозою 25 кГр ($n = 10$)	10 (100) ^{0,1,2}	

ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр ($n = 10$)	10 (100) ^{0,1,2}	
--	---------------------------	--

Примітки: для порівняння між групами використано критерій хі-квадрат, постеріорні порівняння проводилися за точним критерієм Фішера з урахуванням поправки Бонферроні:

⁰ – відмінність від показника “Нативний перикард ВРХ” статистично значима, $p < 0,05$;

¹ – відмінність від показника “ТМБМ до опромінення” статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від показника для 5 кГр, статистично значима, $p < 0,05$;

³ – відмінність від показника для 10 кГр, статистично значима, $p < 0,05$;

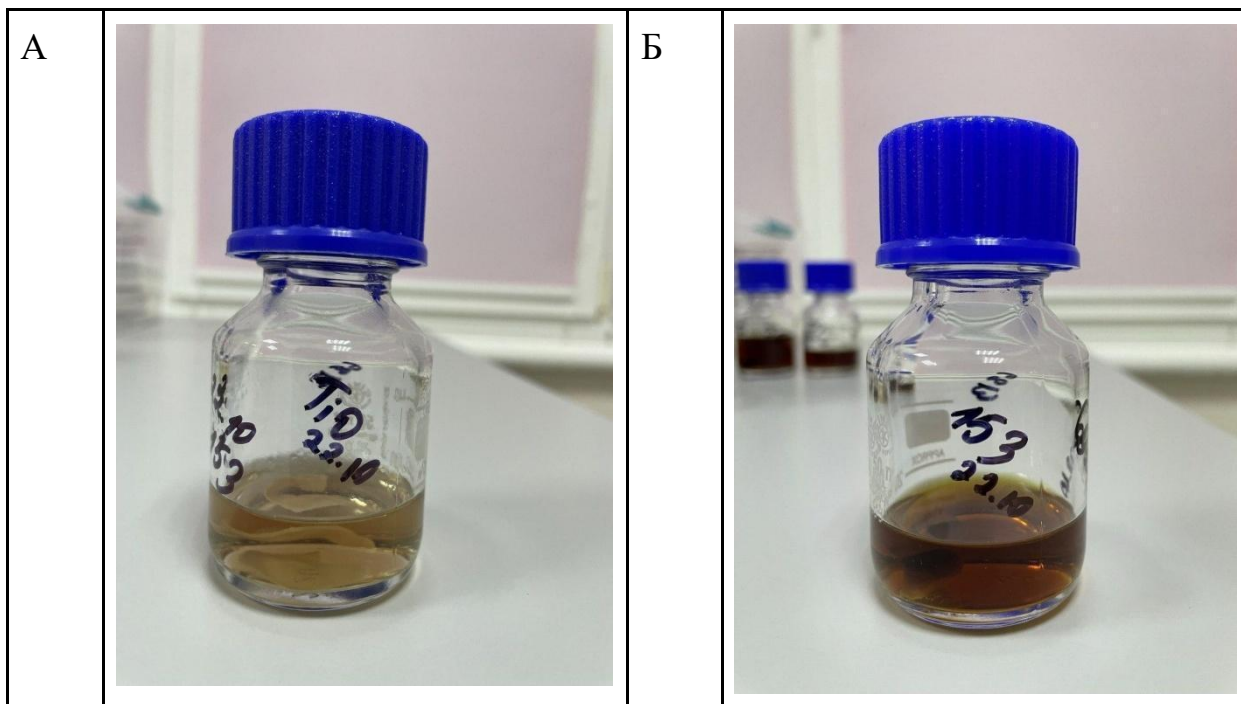
⁴ – відмінність від показника для 15 кГр, статистично значима, $p < 0,05$;

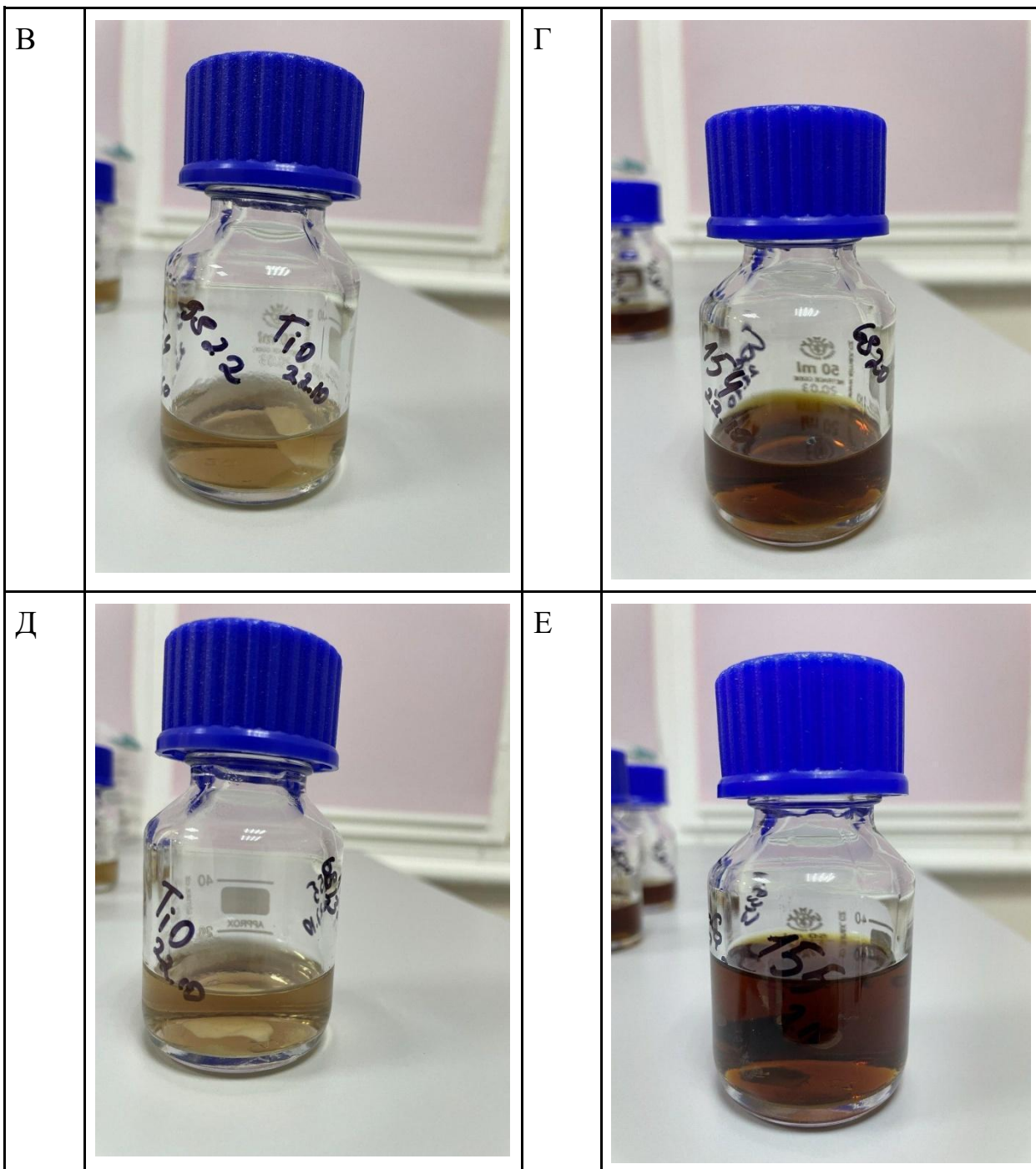
⁵ – відмінність від показника для 20 кГр, статистично значима, $p < 0,05$;

⁶ – відмінність від показника для 25 кГр, статистично значима, $p < 0,05$;

⁷ – відмінність від показника для 30 кГр, статистично значима, $p < 0,05$.

На першому етапі оцінку стерильності для різних груп проводили візуально за наявністю помутніння в рідкому живильному середовищі, що свідчило про ріст і розвиток мікрофлори та контамінацію матриксу мікроорганізмами (рис. 4.4).





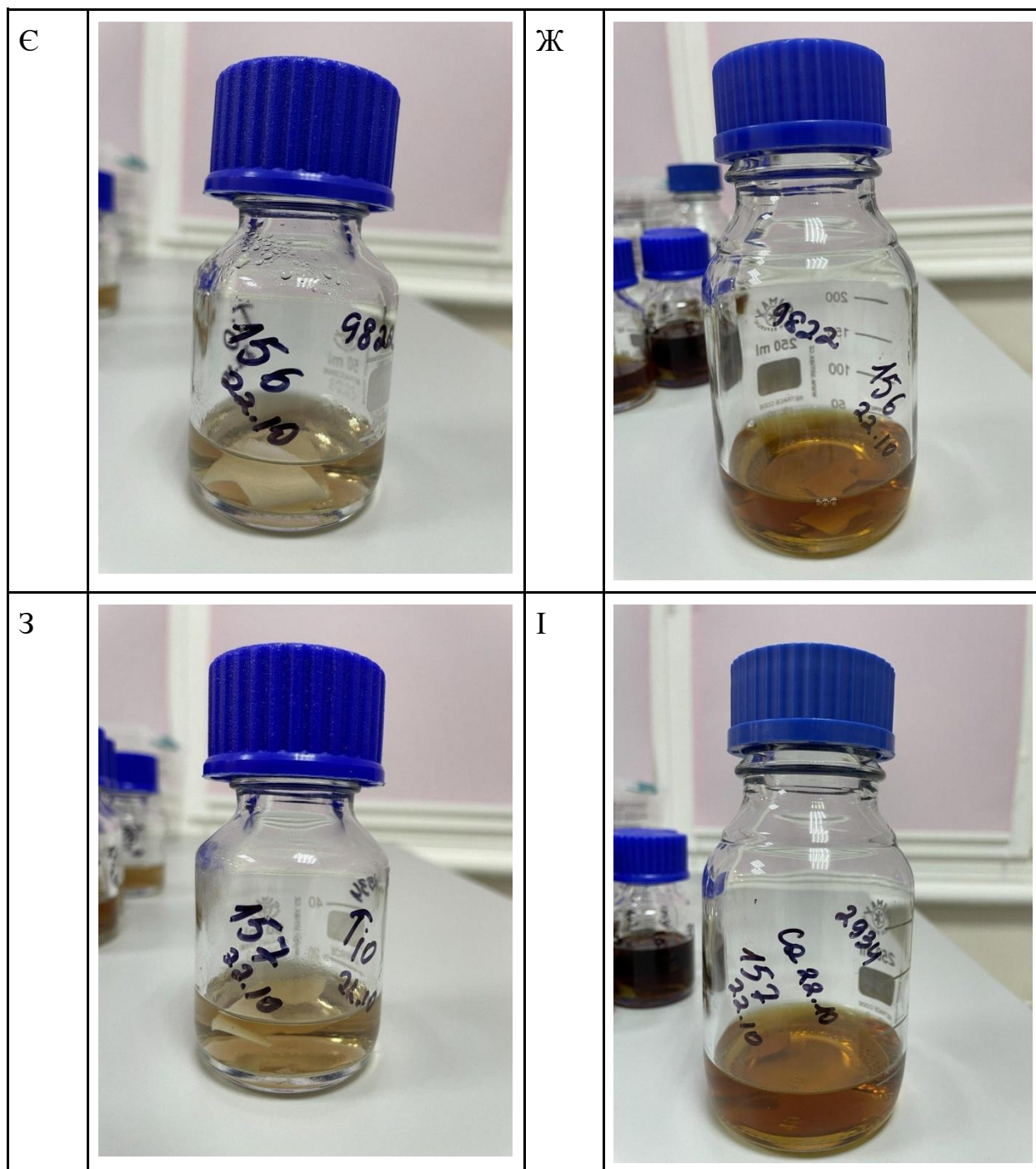
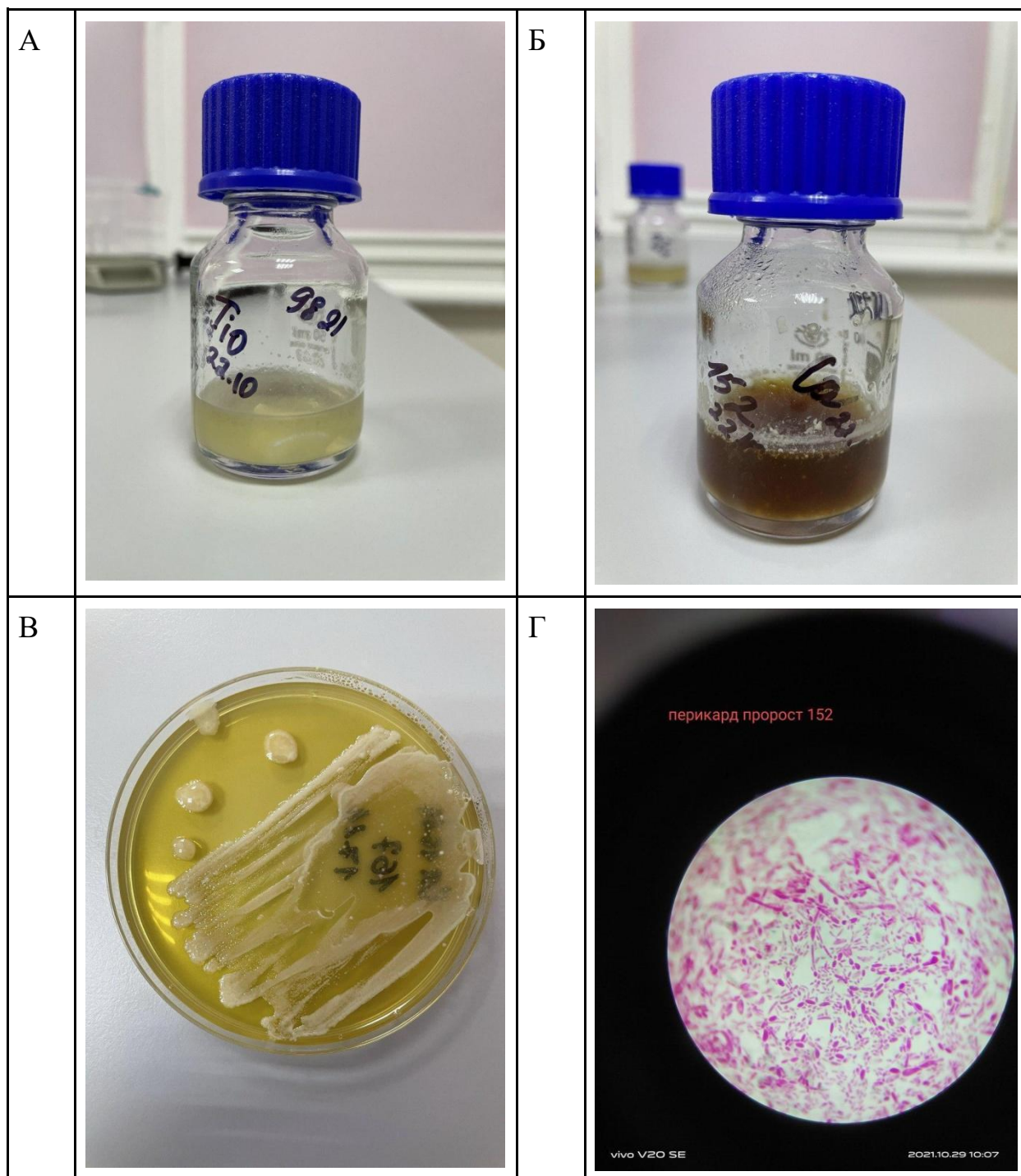


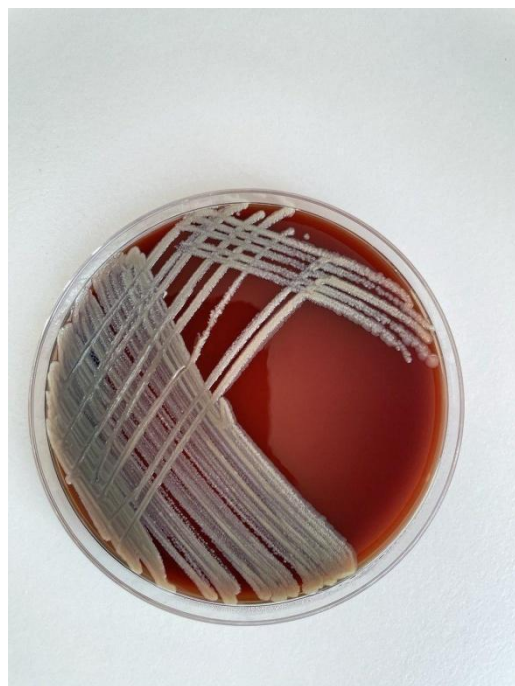
Рис. 4.4. Тестування на стерильність ТМБМ за дії різних доз опромінення: А, В, Д, Є, З – ріст мікроорганізмів на тіогліколевому бульйоні після опромінення 10, 15, 20, 25, 30 кГр відповідно (прозоре середовище); Б, Г, Е, Ж, І – ріст мікроорганізмів на рідкому середовищі Сабуро після опромінення 10, 15, 20, 25, 30 кГр відповідно (прозоре середовище)

Первинно було оцінено якісне мікробіологічне навантаження зразків нативного перикарда до процесу децелюляризації. Після 24 год інкубації за температури $+37^{\circ}\text{C}$ у рідкому живильному середовищі спостерігали дифузне

помутніння. Подальша мікроскопічна та біохімічна ідентифікація дала змогу виявити наявність у нативному перикарді ВРХ грам-негативної (*Klebsiella oxytoca*, *Ralstonia insidiosa*) та грам-позитивної (*Aerococcus viridans*) флори (рис. 4.5). На 6-й день інкубації на твердому живильному середовищі Сабуро спостерігали білі колонії великого розміру, що мали сметанкову консистенцію. При мікроскопії метиленовим синім було виявлено псевдоміцелій, характерний для грибів роду *Candida*.



Д



Е



Є



Ж



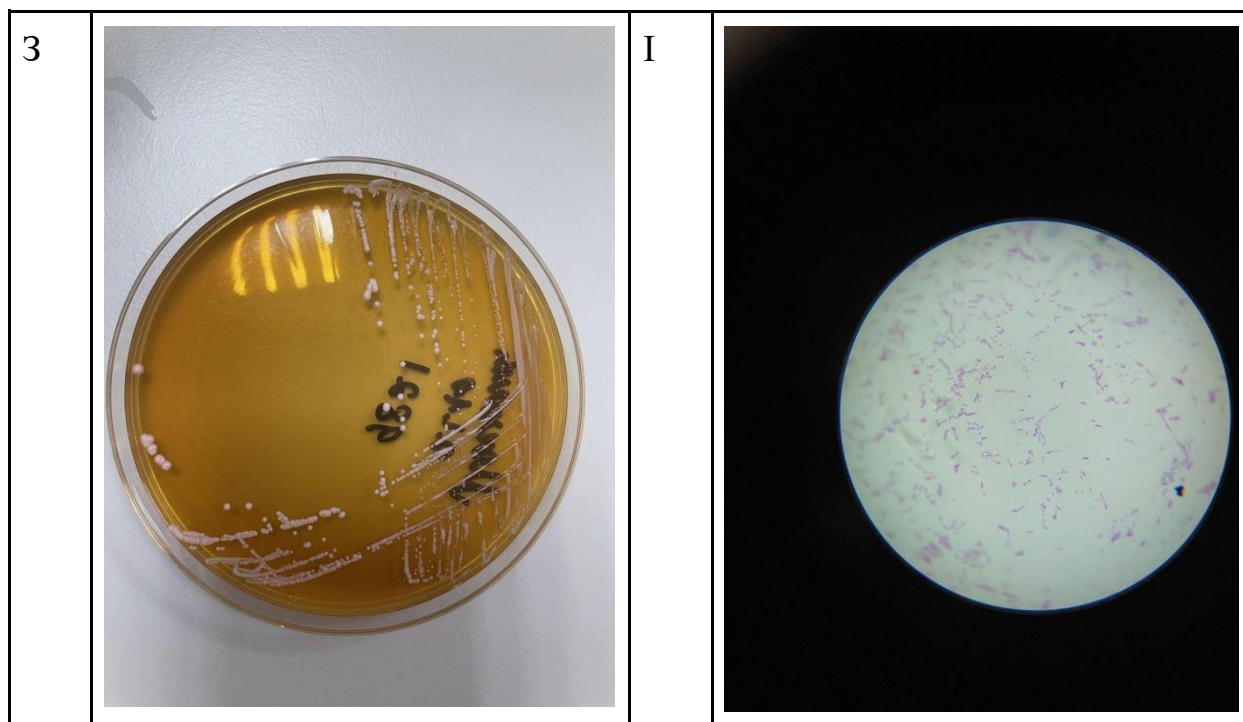


Рис. 4.5. Мікробіологічна діагностика зразків нативного перикарда ВРХ, фарбування за Грамом, світлова мікроскопія, $\cdot 200$: А – ріст мікроорганізмів на тіогліколевому бульйоні (дифузне помутніння); Б – ріст мікроорганізмів на рідкому середовищі Сабуро (дифузне помутніння); В – ріст мікроорганізмів на щільному середовищі Сабуро (колонії білого кольору); Г – псевдоіцелій грибів роду *Candida*; Д – ріст мікроорганізмів на кров'яному агарі (колонії білого кольору); Е – грам-позитивні *Aerococcus viridans*; Є – ріст мікроорганізмів на середовищі Макконкі (безбарвні колонії та колонії кольору поживного середовища); Ж – грам-негативні поодинокі палички *Klebsiella oxytoca*; З – ріст мікроорганізмів на середовищі Макконкі (колонії білого кольору); І – грам-негативні поодинокі палички *Ralstonia insidiosa*

При посіві зразків ТМБМ до проведення стерилізації через добу після інкубації також спостерігали ріст мікроорганізмів на тіогліколевому бульйоні у вигляді дифузного помутніння з утворенням незначного осаду. На рідкому середовищі Сабуро також фіксували ріст мікроорганізмів у вигляді дифузного помутніння. Подальша мікробіологічна діагностика ідентифікувала описані вище мікроорганізми як грам-позитивні коки бактерії виду *Aerococcus viridans* і псевдоміцелій дріжджеподібних грибів роду *Candida* відповідно.

Дослідження стерильності зразків ТМБМ, що піддавалися опроміненню в 5 кГр, показало на 3-4-ту добу інкубації наявність мікроорганізмів у вигляді дифузного помутніння на тіогліколевому рідкому живильному середовищі та колоній білого кольору на твердому середовищі, що були ідентифіковані як гриби роду *Candida*. Таким чином, доза опромінення в 5 кГр забезпечує припинення життєдіяльності бактеріальної мікрофлори, проте життєздатність грибової мікрофлори зберігається, що виключає застосування такої дози для забезпечення стерильності біоматеріалу. Для зразків ТМБМ, що піддавалися стерилізації опроміненням у дозах 10, 15, 20, 25, 30 кГр, не спостерігали будь-якого прояву росту мікроорганізмів у аеробних й анаеробних умовах на живильних середовищах ($p < 0,001$). Про це свідчить відсутність помутніння та росту колоній на живильних середовищах Сабуро та тіогліколевому бульйоні.

Таким чином, відсутність грам-негативної флори в зразках ТМБМ до етапу стерилізації, що наявна в нативному ксеноперикарді, свідчить про зниження мікробного навантаження в матриці за рахунок тканинноінженерного процесингу. З огляду на технологічний процес можна зробити припущення, що використання MES-буферу (етансульфонової кислоти) при етапі крос-лінкінгу, рН якого 5,6, призводить до зниження мікробного навантаження матеріалу. Слід зазначити, що доза опромінення в 5 кГр не є стерилізаційною дозою, а лише знижує мікробне навантаження: бактеріальна флора у зразках відсутня, проте дріжджеподібні гриби роду *Candida* не чутливі до такої дози опромінення.

Таким чином, значення частоти стерильності зразків із розрахованим вірогідним інтервалом (ВІ) 95 % показало відсутність стерильності зразків ТМБМ для груп нативного перикарда, ТМБМ до опромінення та зразків ТМБМ, опромінених дозою 5 кГр (95 % ВІ 0 % – 17 %). Починаючи ж із дози опромінення 10 кГр стерильність зростає ($p < 0,05$) до 100 % (95 % ВІ 83 % – 100 %) (рис. 4.6).

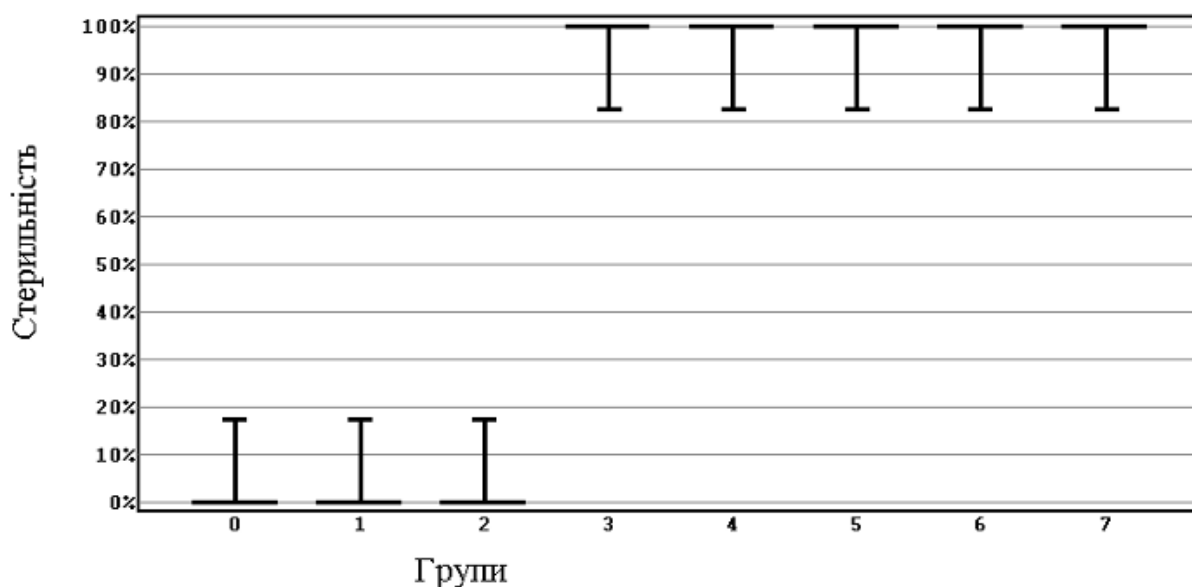


Рис. 4.6. Стерильність зразків (указаний 95 % ВІ) в різних групах: 0 – нативний перикард ВРХ, 1 – ТМБМ до опромінення, 2 – ДТМБМ, опромінений дозою 5 кГр, 3 – ТМБМ, опромінений дозою 10 кГр, 4 – ТМБМ, опромінений дозою 15 кГр, 5 – ТМБМ, опромінений дозою 20 кГр, 6 – ТМБМ опромінений дозою 25 кГр, 7 – ТМБМ, опромінений дозою 30 кГр

З урахуванням результатів проведених гістологічних, біомеханічних тестувань і контролю стерильності можна зробити висновок, що доза опромінення 10 кГр є оптимальною для проведення радіаційної стерилізації ТМБМ.

4.4 Дослідження впливу різних режимів ліофілізації на структуру колагенових волокон ТМБМ

Ліофілізація є перспективним технологічним прийомом для забезпечення стабільності біоімплантів, але в кожному конкретному випадку потребує науково-експериментального підходу. Актуальною є розробка науково-практичних підходів до виготовлення і впровадження у виробництво ліофілізованих біоімплантів, що також до певної міри вирішує проблеми транспортування і довготривалого зберігання готової продукції. Тому наступним етапом досліджень була розробка технології отримання ліофілізованого тканинномодифікованого біосумісного матриксу (ЛТМБМ).

Розробка технології ліофілізації виконувались на базі ТОВ “НПП “УКРОРГСИНТЕЗ” (м. Київ). Досліджували кілька режимів ліофілізації (Режими 1–3).

Режим 1. Ліофілізацію проводили в постійній ліофільній камері в установці Ліофілізатор СВЛ-60 за температури $+23\text{ }^{\circ}\text{C}$ за умов глибокого вакууму з тиском 0,09 мбар. Зразки витримували за вказаної температури впродовж усього процесу. Ліофілізація тривала 27 год.

Режим 2. Ліофілізацію проводили в постійній ліофільній камері в установці Ліофілізатор СВЛ-60 за температури $+2\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ за умов глибокого вакууму з тиском 0,09 мбар. Зразки витримували за вказаної температури впродовж усього процесу. Ліофілізація тривала 25 год.

Режим 3. Ліофілізацію проводили в постійній ліофільній камері в установці Ліофілізатор СВЛ-60 типу “пастка” за температури від $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ при поступовому збільшенні температури до $+23\text{ }^{\circ}\text{C}$ зі швидкістю $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 10 хв і за умов глибокого вакууму з тиском 0,09 мбар. Зразки витримували за вказаної температури впродовж усього процесу. Ліофілізація тривала 20 год.

Таким чином, мали на меті уникнути етапу заморожування тканини, першої стадії процесу ліофілізації, який із високою ймовірністю міг призвести до пошкодження колагену в досліджуваних зразках. Адже наприкінці стадії заморожування близько 70–90 % вихідної вологи перебуває в замороженому стані, а її кількість, що залишилася, перебуває в адсорбованому вигляді. Температура та швидкість заморожування і ступінь охолодження – важливі фактори, що впливають на загальний час сушіння та якість продукту. При заморожуванні біологічних матеріалів важливу роль відіграє швидкість охолодження, від якої залежить величина кристалів льоду. При швидкому заморожуванні утворюється дрібнокристалічна структура замороженої тканини, при повільному – крупнокристалічна. Кристали льоду, які утворюються при заморожуванні, та їх розмір здатні вплинути на структуру колагенових волокон, що може порушити цілісність і функціональність біоімпланта [67–69]. На підставі фізичних і хімічних властивостей продукту

можна оптимізувати алгоритм дій при заморожуванні з метою досягнення найбільш ефективних результатів ліофілізації, особливо таких, як висока якість препарату і тривалість сушки [134, 135].

Оцінку якості сублімаційної сушки за різними режимами проводили за гістологічним аналізом кількості, структури і цілісності колагенових волокон та біомеханічним тестуванням із визначенням пружно-міцнісних властивостей ЛТМБМ.

У результаті досліджень виявлено відмінність показника кількості колагенових волокон на тестовану/досліджувану площу між групами ($p < 0,001$ за критерієм Крускала–Уолліса) (табл. 4.6). При цьому вираженість показника для зразків групи “Ліофілізований ТМБМ, Режим 3” була вищою ($p < 0,05$), ніж для груп нативного перикарда ВРХ, ТМБМ та ліофілізованого ТМБМ, Режим 2. Ці дані вказують на те, що Режим 3 призводить до розшарування колагенових волокон, що порушує просторову організацію матриксу.

Таблиця 4.6

Кількість колагенових волокон на досліджувану площу зразків ліофілізованого ТМБМ

Дослідні групи	Середнє значення кількості колагенових волокон, % (M ± SD)	Рівень значимості відмінності <i>p</i>
Нативний перикард ВРХ ($n = 25$)	0,08 ± 0,28 ⁴	<0,001
ТМБМ до ліофілізації ($n = 25$)	0,12 ± 0,33 ⁴	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 1 ($n = 25$)	0,32 ± 0,48	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 2 ($n = 25$)	0,2 ± 0,41 ⁴	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 3 ($n = 25$)	0,68 ± 0,69 ^{0,1,3}	

Примітки: для порівняння між групами використано критерій Крускала–Уолліса, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Данна:

⁰ – відмінність від показника “Нативний перикард ВРХ” статистично значима, $p < 0,05$;

¹ – відмінність від показника “ТМБМ до ліофілізації” статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від показника для Режиму 1 статистично значима, $p < 0,05$;

³ – відмінність від показника для Режиму 2 статистично значима, $p < 0,05$;

⁴ – відмінність від показника для Режиму 3 статистично значима, $p < 0,05$.

Для зразків ліофілізованого матриксу відсоткова частка волокон із порушеною орієнтацією та структурою визначалась на 530 мкм товщини зразка в полі зору. В ході експерименту виявлено відмінність показника структури та орієнтації колагенових волокон між групами ($p = 0,003$ за критерієм Крускала–Уолліса, табл. 4.7). При цьому вираженість показника для зразків групи “Ліофілізований ТМБМ, Режим 3” була вищою ($p < 0,05$), ніж для груп нативного перикарда ВРХ, ТМБМ.

Таблиця 4.7

Структура й орієнтація колагенових волокон ТМБМ за різних режимів ліофілізації

Дослідні групи	Середнє значення порушення структури та орієнтації колагенових волокон, % (M ± SD)	Рівень значимості відмінності p
Нативний перикард ВРХ, ($n = 25$)	0,04 ± 0,2 ⁴	0,003
ТМБМ ($n = 25$)	0,08 ± 0,28 ⁴	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 1, ($n = 25$)	0,36 ± 0,64	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 2 ($n = 25$)	0,2 ± 0,41	
ТМБМ, Режим 3 ($n = 25$)	0,56 ± 0,71 ^{0,1}	

Примітки: для порівняння між групами використано критерій Крускала–Уолліса, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Данна:

⁰ – відмінність від показника “Нативний перикард ВРХ” статистично значима, $p < 0,05$;

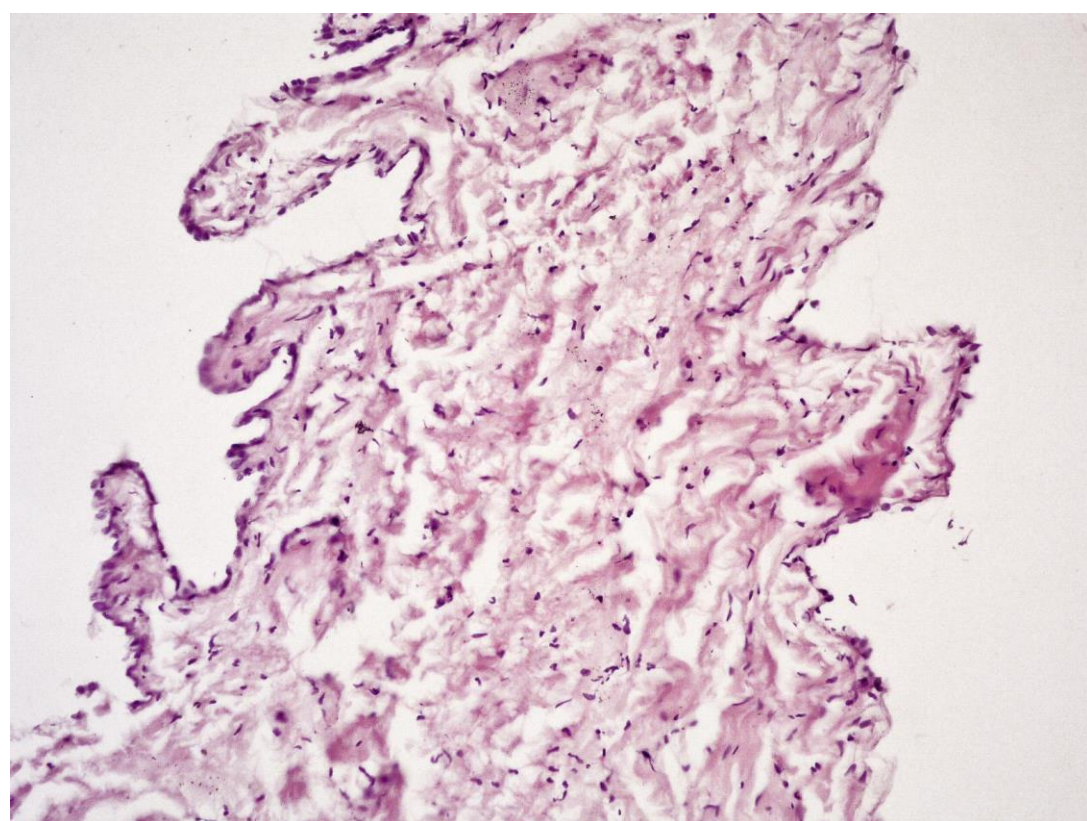
¹ – відмінність від показника “ТМБМ” статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від показника для Режиму 1 статистично значима, $p < 0,05$;

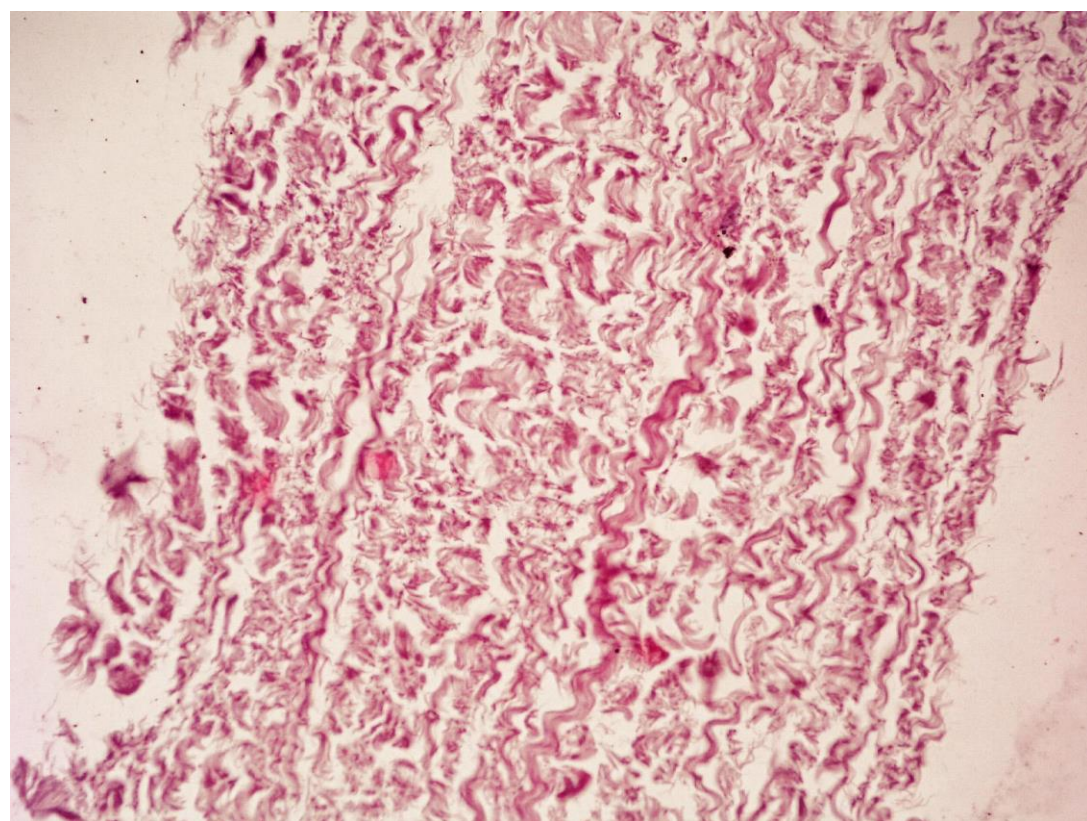
³ – відмінність від показника для Режиму 2 статистично значима, $p < 0,05$;

⁴ – відмінність від показника для Режиму 3 статистично значима, $p < 0,05$.

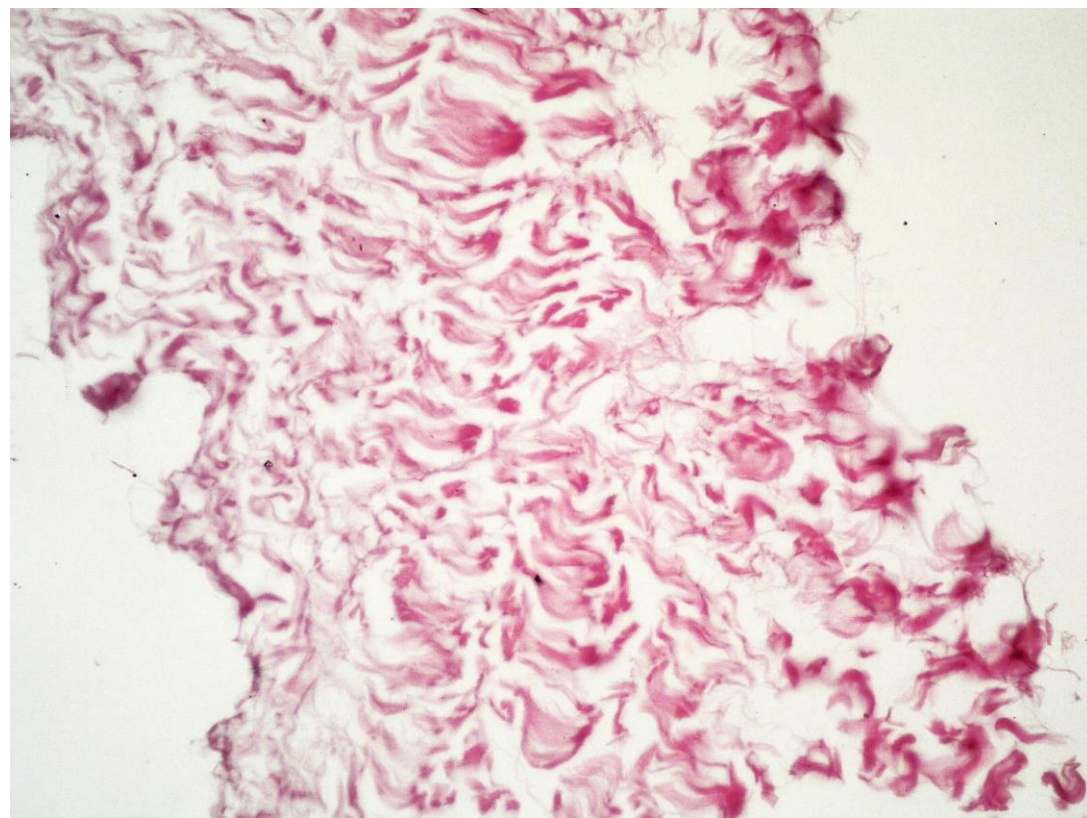
При гістологічному дослідженні зразків тканини, ліофілізованої у Режимах 1 і 2, спостерігали незначні зміни в структурі та орієнтації колагенових волокон, що не спричиняють структурних змін матриксу (рис. 4.7).



А



Б



B



F

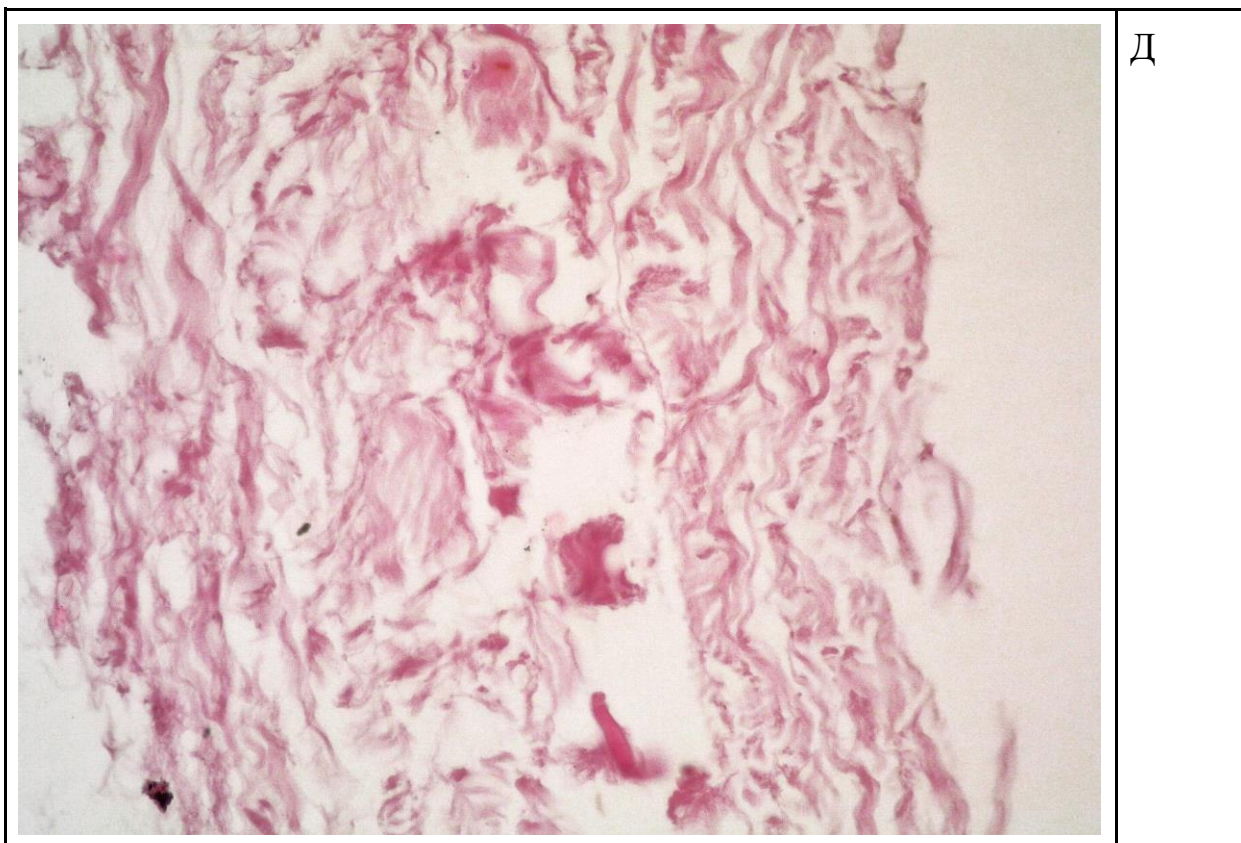


Рис. 4.7. Кількість, структура та орієнтація колагенових волокон децелюляризованого позаклітинного матриксу (0,1 % SDS і EDC/NHS крос-лінкінг), виготовленого на основі перикарда ВРХ після ліофілізації різними режимами. Світлова мікроскопія, фарбування гаматоксилін-еозином, $\cdot 200$. А – нативний перикард ВРХ; Б – ТМБМ до ліофілізації; В – регідратований ТМБМ після ліофілізації в Режимі 1; Г – регідратований ТМБМ після ліофілізації в Режимі 2; Д – регідратований ТМБМ після ліофілізації в Режимі 3

4.5 Дослідження впливу різних режимів ліофілізації на біомеханічні властивості ТМБМ

При визначенні пружно-міцнісних властивостей, а саме граничної міцності на розрив при поздовжній орієнтації, ліофілізованих за різних режимів зразків ТМБМ встановлено статистично значиму ($p < 0,001$ за ANOVA) різницю (табл. 4.8).

**Гранична міцність на розрив при поздовжній орієнтації волокон зразків
ТМБМ за різних режимів ліофілізації**

Дослідна група	Середнє значення граничної міцності на розрив, Н (М ± SD)	Рівень значимості відмінності <i>p</i>
Нативний перикард ВРХ, (<i>n</i> = 10)	167,5 ± 5,5 ^{1,2,4}	<0,001
ТМБМ (<i>n</i> = 10)	176,8 ± 7,1 ^{0,2,4}	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 1 (<i>n</i> = 10)	143,8 ± 5,4 ^{0,1,3,4}	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 2 (<i>n</i> = 10)	169,6 ± 5,6 ^{2,4}	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 3 (<i>n</i> = 10)	110,9 ± 6,6 ^{0,1,2,3}	

Примітки: для порівняння між групами використано дисперсійний аналіз, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Шеффе:

⁰ – відмінність від показника “Нативний перикард ВРХ” статистично значима, $p < 0,05$;

¹ – відмінність від показника “ТМБМ” статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від показника для Режиму 1 статистично значима, $p < 0,05$;

³ – відмінність від показника для Режиму 2 статистично значима, $p < 0,05$;

⁴ – відмінність від показника для Режиму 3 статистично значима, $p < 0,05$.

На рис. 4.8 представлено середні значення граничної міцності на розрив зразків перикарда ВРХ із поздовжньою орієнтацією волокон із розрахованим 95 % ВІ. Проведений аналіз свідчить про зниження граничної міцності на розрив зразків ($p < 0,05$) (табл. 4.8, рис. 4.8) для групи “Ліофілізований ТМБМ, Режим 1” і ще більшою мірою для Режиму 3 порівняно з іншими групами. Гранична міцність на розрив зразків для групи “Ліофілізований ТМБМ, Режим 2” не відрізняється від показника груп “Нативний перикард ВРХ” і “ТМБМ” ($p > 0,05$) (табл. 4.8, рис. 4.8).

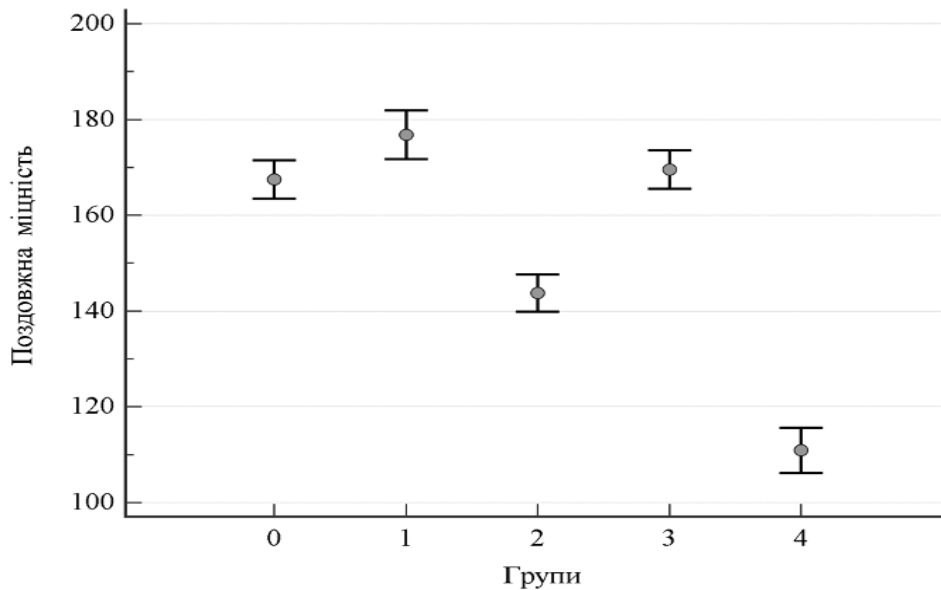


Рис. 4.8. Середнє значення показника граничної міцності на розрив зразків із поздовжньою орієнтацією волокон (указаний 95 % ВІ) в різних групах: 0 – нативний перикард ВРХ; 1 – ТМБМ; 2 – ліофілізований ТМБМ, Режим 1; 3 – ліофілізований ТМБМ, Режим 2; 4 – ліофілізований ТМБМ, Режим 3

Установлено, що гранична міцність на розрив при поперечній орієнтації волокон досліджуваних зразків статистично значимо ($p < 0,001$ за ANOVA) відрізняється. На рис. 4.9 представлено середні значення граничної міцності на розрив зразків ТМБМ, ліофілізованих за різними режимами, із поперечною орієнтацією волокон із розрахованим 95 % ВІ.

Таблиця 4.9

Аналіз показників граничної міцності на розрив при поперечній орієнтації волокон зразків ТМБМ за різних режимів ліофілізації

Дослідні групи	Середнє значення граничної міцності на розрив, Н ($M \pm SD$)	Рівень значимості відмінності p
Нативний перикард ВРХ ($n = 10$)	$65,7 \pm 4,4^{2,4}$	<0,001
ТМБМ ($n = 10$)	$69,4 \pm 2,8^{2,4}$	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 1 ($n = 10$)	$47 \pm 3^{0,1,3,4}$	

Ліофілізований ТМБМ, Режим 2 ($n = 10$)	$68,9 \pm 3,5^{2,4}$	
Ліофілізований ТМБМ, Режим 3 ($n = 10$)	$58,5 \pm 2,8^{0,1,2,3}$	

Примітки: для порівняння між групами використано дисперсійний аналіз, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Шеффе:

⁰ – відмінність від показника “нативний перикард ВРХ” статистично значима, $p < 0,05$;

¹ – відмінність від показника “ТМБМ” статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від показника для Режиму 1 статистично значима, $p < 0,05$;

³ – відмінність від показника для Режиму 2 статистично значима, $p < 0,05$;

⁴ – відмінність від показника для Режиму 3 статистично значима, $p < 0,05$.

Проведений аналіз свідчить про зниження граничної міцності на розрив ліофілізованих зразків ($p < 0,05$) (табл. 4.9, рис. 4.9) для Режиму 3 і ще більшою мірою для Режиму 1 порівняно з іншими групами. Гранична міцність на розрив ліофілізованих зразків із поперечною орієнтацією волокон для Режиму 2 не відрізняється від показника груп “Нативний перикард ВРХ” і “ТМБМ” ($p > 0,05$) (табл. 4.9, рис. 4.9).

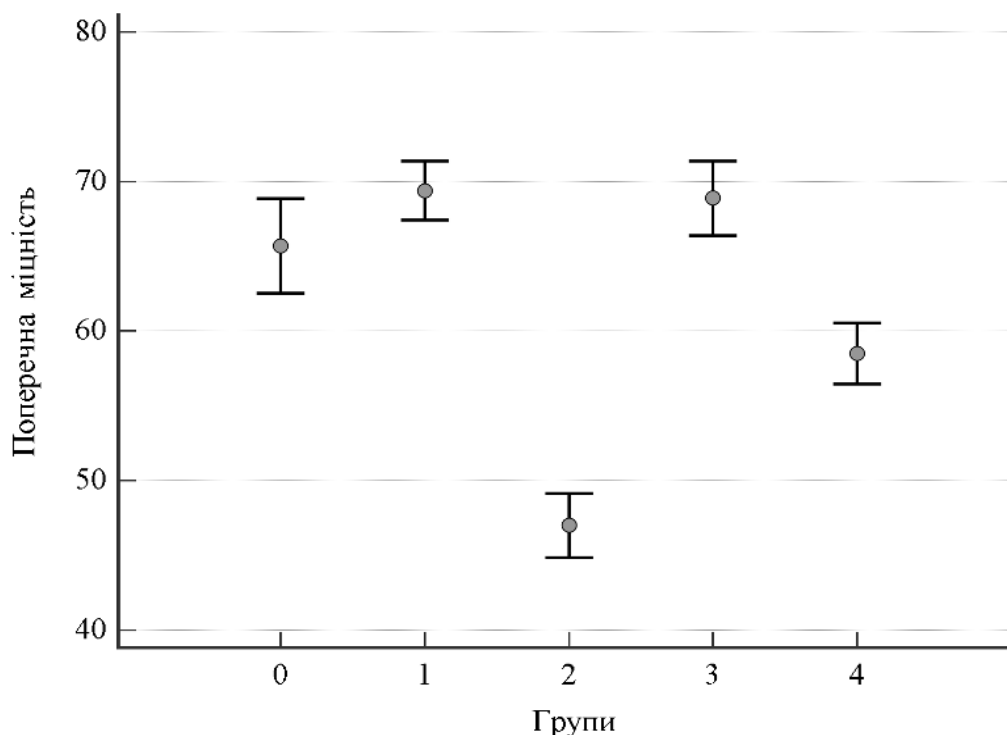


Рис. 4.9. Середнє значення показника граничної міцності на розрив зразків із поперечною орієнтацією волокон (указаний 95 % ВІ) в різних групах: 0 – нативний перикард ВРХ, 1 – ТМБМ; 2 – ліофілізований ТМБМ, Режим 1; 3 – ліофілізований ТМБМ, Режим 2; 4 – ліофілізований ТМБМ Режим 3

З огляду на проведенні гістологічні та біомеханічні тестування визначено, що Режим 2 сублімаційної сушки не призводить до структурних змін ТМБМ і може бути використаний для ліофілізації біоімпланта.

Висновки до розділу 4

Проведено тестування впливу різних доз радіаційного опромінення на ТМБМ. За даними гістологічного та біомеханічного тестування визначено, що дози опромінення 5 та 10 Кгр не спричиняють структурних змін колагенових волокон матриксу. Однак доза в 5 Кгр не забезпечує стерильності, про що свідчить ріст грибів *Candida* на живильному середовищі. Результати оцінки щільності, цілісності та направленості колагенових волокон й аналізу пружно-міцнісних характеристик матриксу дають змогу зробити висновок, що Режим 2 є найоптимальнішим для процесу ліофілізації ТМБМ.

РОЗДІЛ 5. РОЗРОБКА АПАРАТУРНОЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІОФІЛІЗОВАНОГО ТКАНИННОМОДІФІКОВАНОГО МАТРИКСУ НА ОСНОВІ ПЕРИКАРДА ВРХ І РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ЙОГО СТАНДАРТИЗАЦІЇ

5.1 Аналіз технологій виготовлення біоімплантів і шляхи модернізації процесу

Аналіз даних літератури щодо технології виготовлення біоімплантів на основі ксенотканини [3–10] дав можливість розробити загальну схему процесу. Незалежно від використовуваних методів основними етапами є:

- 1) забір матеріалу;
- 2) механічне очищення тканини та нарізання на латки заданого розміру;
- 3) децелюляризація (очищення тканини від клітин та їх компонентів);
- 4) стерилізація;
- 5) ліофілізація.

Якщо перші два етапи є подібними для більшості технологій, то решта процесів можуть суттєво різнитися і модернізуватися, що впливає на якість і швидкість виготовлення продукту. Для очищення ксенотканини від клітинних компонентів можуть використовуватися фізичні, ферментативні та хімічні методи [136].

Механічна децелюляризація включає в себе обробку тканини температурою і тиском, що призводить до знищення клітин за рахунок їх лізису та руйнування адгезивних білків клітинного матриксу. Так, під час процедури заморожування-відтаювання спочатку тканину лізують, а потім знищують клітини з утворенням децелюляризованого матриксу. Процес включає в себе чергування температури замерзання $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ і біологічної температури $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Конкретні протоколи можна змінити, збільшивши різницю температур або змінивши кількість робочих циклів заморожування-відтаювання. Так, для прикладу, проведено децелюляризацію клітинних шарів

фібробластів за допомогою трьох циклів [137] і поперекових сегментів хребта собак [138] за допомогою одного циклу. В обох випадках вміст колагену та глікозаміногліканів, а також механічна міцність були аналогічними, як і в нативних зразків. Однак шар клітин фібробластів містив до 88 % ДНК, що вказує на неповну очистку від генетичного матеріалу при застосуванні методу заморожування-відтаювання. Наявність ДНК у матеріалі може спровокувати імуногенну відповідь в умовах *in vitro*. Таким чином, хоча процедури заморожування-відтаювання сприятливі для збереження біохімічних компонентів і біомеханічних властивостей, вони потенційно можуть призвести до імуновідторгнення через недостатнє видалення генетичного матеріалу.

Для децелюляризації використовувалися кілька типів хімічних речовин, включаючи поверхнево-активні речовини, кислоти й основи. Поверхнево-активні речовини, найбільш поширені децелюляризуючі агенти, зазвичай діють шляхом лізису клітин через руйнування фосфоліпідної клітинної мембрани [139]. Ці агенти класифікуються на основі їхнього заряду, оскільки вони є іонними, неіонними або цвіттер-іонними. Кислоти, такі як надцтова кислота, та основи, такі як гідроксид натрію, солюбілізують клітинну мембрану і ядерний матеріал, використовуючи властивості їх внутрішнього заряду білків.

Більшість комерційних систем при виробництві тканинноидифікованих матриксів використовують глютаральдегід для очистки від клітин і зшивного агента колагенового матриксу [3–5, 8]. Глютаральдегід каталізує утворення додаткових амінних зв'язків між $-NH_2$ -групами лізину, гідроксилізину або N-кінця амінокислот у молекулі колагену. В результаті цього утворюються ковалентні зв'язки між сусідніми білками, що стабілізуються за фізіологічних температури та рН. Таке поперечне зшивання поліпептидних ланцюгів збільшує міцність тканини, інгібує біодеградацію, а також знижує антигенність тканини. Однак неповне усунення залишкового глютаральдегіду до імплантації пластиру може призвести до пізньої

кальцифікації пластиру *in vivo* та порушення його функціональності [140]. Матеріал, оброблений глютаральдегідом, менш еластичний. Хірурги відзначають довготривале загоєння швів.

Широко використовуваний іонний сурфактант (SDS) виявився успішним у низці застосувань при децелюляризації завдяки його здатності ефективно видаляти клітини та генетичний матеріал. Наприклад, він був основним агентом, що використовувався при перфузійній децелюляризації цілого серця щура [141]. Наукові дані підтверджують, що застосування SDS дає змогу видаляти не менше 90 % ДНК клітин господаря при децелюляризації міокарда свині [142], серцевих клапанів свині [143] та серця людини [144]. Однак використання цього детергенту має низку недоліків. Деякі автори вказують на зміни в ультраструктурі тканинномодифікованого матриксу [145] та прояв цитотоксичних властивостей при застосування SDS. Слід відзначити, що такі властивості спостерігаються за високих концентрацій SDS і недостатніх циклів відмивки.

Головним завданням були пошук і удосконалення методики децелюляризації з повною відмовою від цитотоксичного глютаральдегіду. В нашому дослідженні було запропоновано використання 2 типів децелюляризації: заморожування-відтаювання та хімічна з використанням іонного детергенту SDS у концентрації 0,1 %, що не чинила цитотоксичної дії на фібробласти людини. Процедура заморожування проводили за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 24 год, процес відтаювання тривав 10 год. Також здійснювалася додаткова фізична обробка ксенотканини дистильованою водою протягом 24 год за $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ у лабораторному шейкері за постійної швидкості 200 об/хв. Така процедура забезпечувала порушення цілісності клітинних мембран, що призводило до руйнування клітин. Таким чином, за рахунок фізичної обробки ксенотканини вдалося лізувати клітини господаря.

Хоча SDS здатен успішно видаляти небажані нативні компоненти тканини, він також може пошкоджувати структурні та сигнальні білки. Наприклад, колаген у серцевих клапанах, оброблених SDS, ущільнився [143],

а децелюляризований позаклітинний матрикс легень людини і свині виявився більш волокнистим, ніж структура гладкої нативної тканини [145]. Пошкодження структурних білків і компонентів може перешкоджати не тільки заселенню клітинами тканини, як і раніше, а й повному збереженню її біомеханічних властивостей. Після обробки 0,5 %-вим розчином SDS пласти фібробластів показали зниження модуля пружності на 80 % [146]. SDS також цитотоксичний, тому необхідно ретельно промивати тканину, щоб забезпечити життєздатність повторно засіяних клітин [145]. Якщо більшість тканин, оброблених сурфактантом, зазвичай необхідно промивати розчинами, такими як фосфатно-сольовий буфер, то SDS важче видалити через його іонну природу. Необхідний тривалий процес промивання після обробки є ще одним недоліком SDS як децелюляризуючого агента.

Нам вдалося скоротити час експозиції детергенту – і тим самим послабити його вплив на структуру білків матриксу – від 35 до 5-ти днів за рахунок проведення реакції за зниженої температури +4 °C і постійного перемішування в шейкері за швидкості 200 об/хв.

Для стабілізації отриманого колаген-еластинового матриксу після фізичної та хімічної обробки ТМБМ поміщали в розчин EDC/NHS-MES (10 мМ 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід гідрохлориду, 10 мМ N-гідроксисукциніміду та 0,05 М 2-морфоліноетансульфонової кислоти), рН 5,6, на 12 год за кімнатної температури при постійному перемішуванні в шейкері зі швидкістю 50 об/хв. Кислота, що застосовується у крос-лінкінгу, також приводить до знищення бактеріальної та грибової мікрофлори, що може міститися в нативному матеріалі. Таким чином, ми модернізували методику, забезпечивши збереження мікроархітекtonіки каркасу матриксу та проведення первинної хімічної стерилізації.

Стерилізація тканинних матеріалів для трансплантації є важливою проблемою, оскільки ці матеріали часто складаються з органічних природних або синтетичних полімерів, чутливих до високих температур. Оскільки джерелом сировини є перикардiальна тканина ВРХ, незважаючи на

дотримання асептичних умов забору матеріалу, слід враховувати ймовірність контамінації ксенотканини представниками нормальної мікрофлори тварин. Видовий склад рубцевих бактерій дорослих жуйних тварин постійний та істотно не змінюється залежно від годування, пори року і низки інших чинників. Найбільш важливими представниками у функціональному відношенні є такі види бактерій: *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. aibus*, *Cillobacterium cellulosolvens*, у тому числі споротвірні *Clostridium cellobioparus*, *Clostridium locheadi* тощо [147–149]. При виборі методу стерилізації необхідно враховувати наявність спорових форм мікроорганізмів і в той же час чутливість колагенових волокон до дії надвисоких температур і хімічних речовин [150].

Тому в більшості випадків використовують низькотемпературні методи стерилізації, такі як гамма-опромінення та електронно-променева обробка [151–153]. Застосування біологічної стерилізації антибіотиком не забезпечує повної стерильності, адже не впливає на спорові та резистентні форми бактерій [150, 154].

Таким чином, за результатами модернізації технологічного процесу було розроблено схему виробництва тканиномодифікованого біосумісного матриксу. Схема передбачає такі етапи.

1. Забір матеріалу на сертифікованій скотобійні – бичачого перикарда.
2. Транспортування тканин до препаратурської лабораторії в контейнерах за +4 °C – **2 год**.
3. Препарування та очищення тканин від жирової тканини. Відбір і сортування якісного матеріалу. Нарізка зразків.
4. Відмивання тканин від компонентів крові в дистильованій воді **3 год** зі зміною рідини кожні 15 хв.
5. Замороження зразків – 20 °C (**24 год**).
6. Відтаювання – за кімнатної температури > **10 год**.
7. Фізична та хімічна обробка ксенотканин:

- Осмотичний шок (вплив дистильованої води на клітини перикарда – проникнення в клітини та розрив мембранних компонентів) **24 год** зі зміною розчину кожні 12 год за 4 °С, у лабораторному шейкері за постійної швидкості 200 об/хв.

- Хімічна обробка у 0,1 % SDS **5 днів** (зі зміною розчину кожного дня) за 4 °С, 200 об/хв.

- Детоксикація (відмивка від цитотоксичного розчину SDS) дистильованою водою **7 днів**, зі зміною рідини 2 рази на день за 4 °С, 200 об/хв.

- Фіксація у 70 %-вому розчині етилового спирту **12 год** за 4 °С, 50 об/хв.

- Відмивання у фосфатному буфері рН 7,4 від розчину спирту **24 год** зі зміною рідини 3 рази за 4 °С, 200 об/хв.

- Стабілізація отриманого колагену – еластинового матриксу в розчині (EDC/NHS–MES буфер) 10 мМ 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмідю, 10 мМ N-гідроксисукцинімідю і 0,05 М 2-(N-морфоліно)етансульфонової кислоти (MES буферу), рН 5,6, **12 год**. Кімнатна температура, 50 об/хв.

- Відмивання у фосфатному буфері рН 7,4 від розчину спирту **3 год** зі зміною рідини 3 рази за 4 °С, 200 об/хв.

- Пакування із додаванням фосфатного буферу рН 7,4 у блистерні упаковки для подальшого процесу стерилізації.

- Ліофілізація.

Модернізація процесу дає змогу значно скоротити час на виробництво ЛТМБМ – із **48 до 16 діб**.

У результаті проведеної модернізації виробництва було отримано ЛТМБМ – перикардальну латку з бичачого перикарда, оброблену за технологією децелюляризації 0,1 % SDS із подальшим крос-лінкінгом з EDC/NHS-MES. ЛТМБМ – це пластини різного розміру, який може задаватися при виробництві залежно від потреби. Товщина латки варіює в межах від 0,2 до 0,4 мм. З біотканини повністю видаляються всі носії антигенності – клітинні елементи та глікозаміноглікани міжклітинного матриксу. Визначальною

особливістю ЛТМБМ є відсутність обробки глутаральдегідом, що може викликати цитотоксичний ефект і призводити до пізньої (після імплантації) кальцифікації матриксу [140]. Для забезпечення довготривалого зберігання тканинномодифікований матрикс піддається ліофілізації. ЛТМБМ стерилізується опроміненням електронами (β -випромінювання) дозою опромінення 20 кГр та є повністю біосумісним, не викликає токсикологічного, подразнювального впливу. Стерильний матрикс постачається в блістерній упаковці із захистом від відкриття, яка своєю чергою пакується в коробки з картону.

5.2 Розроблення технологічного процесу виготовлення біоімплантів

Розроблення технології виготовлення та ліофілізації тканинномодифікованих біосумісних матриксів передбачає вивчення технологічних параметрів і режимів обробки тканини перикарда ВРХ. Розроблена технологічна схема отримання ЛТМБМ являє собою латку з перикарда ВРХ (рис. 5.1). ЛТМБМ призначений для усунення дефектів у серцево-судинній хірургії через імплантацію в організм донора. Латку на основі ЛТМБМ використовують у відділеннях серцево-судинної хірургії медичних установ різного підпорядкування. Технологічні вимоги були розроблені на підставі чинної нормативно-правової документації України (Додаток 2).

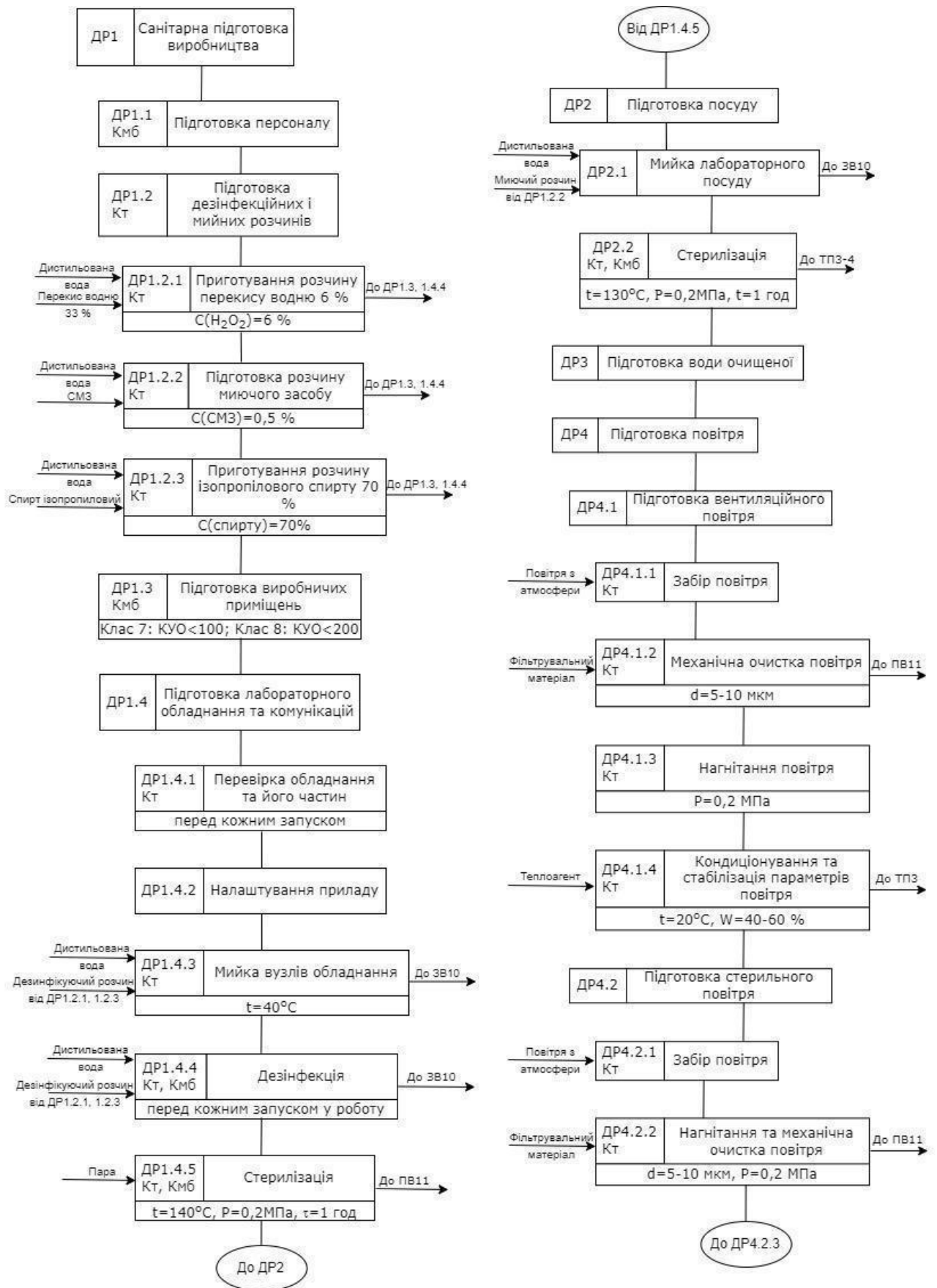


Рис. 5.1, аркуш 1 — Технологічна схема отримання ЛТМБМ на основі перикарда ВРХ

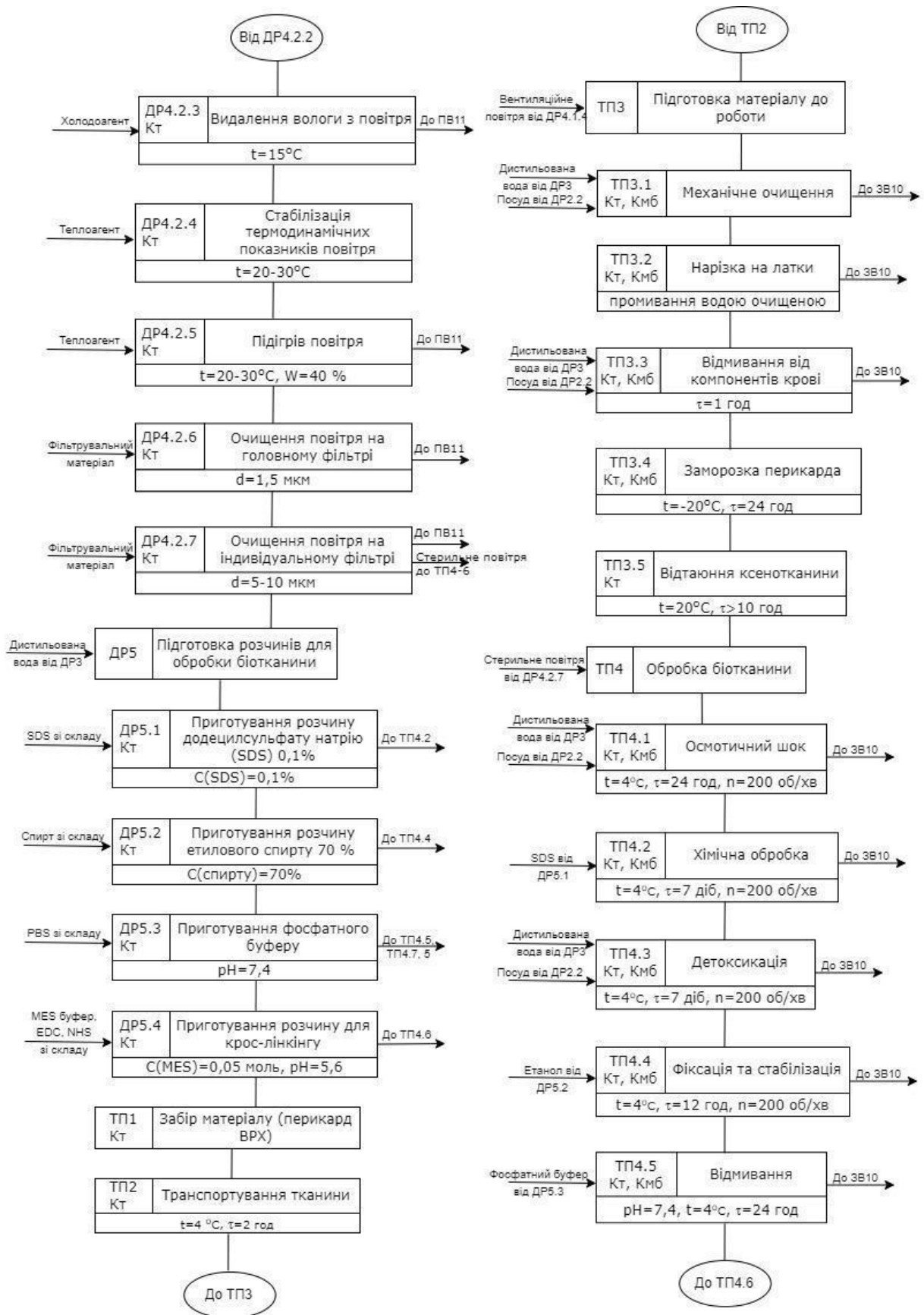


Рис. 5.1, аркуш 2 — Технологічна схема отримання ЛТМБМ на основі перикарда ВРХ

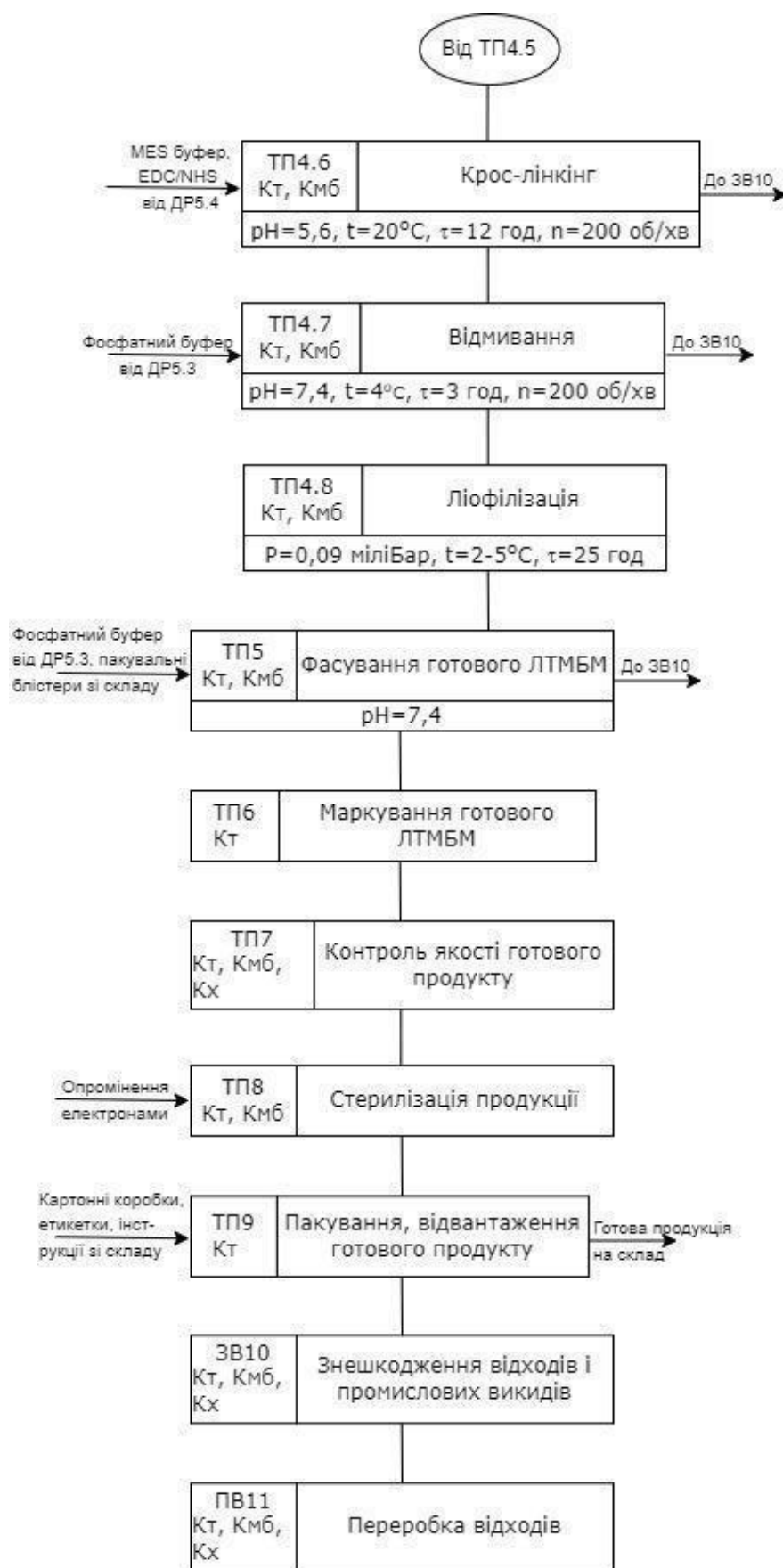


Рис. 5.1, аркуш 3 — Технологічна схема отримання ЛТМБМ на основі перикарда ВРХ

Технологічний процес виготовлення ЛТМБМ відноситься до біотехнологічного виробництва, в основу якого покладена стандартна схема проведення допоміжних процесів (підготовка обладнання, приміщень, персоналу, води, повітря тощо) й основних стадій виробництва. Технологія виробництва ЛТМБМ складається з таких стадій: забір матеріалу (перикардіальний мішок ВРХ), транспортування тканини, підготовка матеріалу до роботи й обробка біотканини.

ДР. 1 Санітарна підготовка виробництва

Ця стадія є головним етапом, що забезпечує якість біоімпланта на подальших стадіях виробництва. Цей етап передбачає санітарну підготовку приміщень (обробка виробничих поверхонь, апаратів і комунікацій дезінфекційними засобами, контроль відповідності приміщень класам чистоти); підготовку персоналу (медичні огляди та профілактичні заходи; інструктаж і перепідготовка; спецодяг); огляд, ремонт і підготовку обладнання (перевірка справності заземлення, герметичності апаратів тощо; відмивання, дезінфекція, стерилізація апаратів і трубопроводів). Санітарна підготовка виробництва і технологічний процес проводяться відповідно до вимог ДСанПіН і чинних нормативних актів у біотехнологічній промисловості.

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу включає в себе інструктаж із техніки безпеки, санітарну підготовку персоналу, ознайомлення з посадовими обов'язками та знайомство з основною технологією виробництва.

Персонал перевдягається в технологічний одяг і проводить санітарну обробку рук. Персонал, який проводить стерильні стадії технологічного процесу, повинен попередньо переодягнутися в комплект стерильного технологічного одягу і провести обробку рук дезінфекційним розчином. Такі комплекти одягу використовують тільки в чистих приміщеннях.

ДР 1.2. Підготовка дезінфекційних і мийних розчинів

Проводиться приготування 0,5 %-вого розчину миючого засобу та 6 %-вого розчину перекису водню, що використовуються на подальших етапах

підготовки виробництва, зокрема для підготовки обладнання, комунікацій і приміщень.

Приготування дезінфекційних розчинів (0,5 %-вий розчин миючого засобу та 6 %-вий розчин перекису водню), що призначені, зокрема, для обробки виробничих приміщень, обладнання та комунікацій. Приготування дезінфекційних розчинів здійснюють, дотримуючись засобів особистої безпеки: одягають гумові рукавички, захисні окуляри, медичну маску.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Щоденне прибирання проводиться перед початком роботи. Передбачено протирання робочих поверхонь та обладнання 70 %-вим розчином ізопропілового спирту. У кінці робочого тижня всі поверхні очищаються 0,5 %-вим розчином мийного засобу та проводиться дезінфекція 6 %-вим розчином перекису водню. Після цього виконується п'ятикратна відмивка обладнання водою від залишків мийних і дезінфекційних розчинів. Наступним етапом є проведення стерилізації в режимі: $t = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 0,2\text{ МПа}$ протягом 1 год. Також здійснюється обробка робочих поверхонь, стін і підлоги 0,5 %-вим розчином миючого засобу. Використані матеріали після проведення робіт із прибирання знезаражуються в 0,5 %-вому мийному розчині протягом 3 год.

ДР 1.4. Підготовка лабораторного обладнання та комунікацій

Підготовка лабораторного обладнання і комунікацій проводиться до та після технологічного процесу. Цей етап включає перевірку роботи обладнання та його частин, налаштування приладу, мийку, обробку дезінфекційними розчинами обладнання і комунікацій із подальшим ополіскуванням. Кожного разу при використанні певного лабораторного приладу чи пристрою необхідно перевіряти адекватність його роботи та складових частин. При забезпеченні правильної роботи необхідного приладу потрібно провести налаштування для конкретного етапу до початку роботи з ним. Налаштування обов'язково проводити для кожного процесу окремо.

Щоденну дезінфекцію обладнання проводять, обробляючи зовнішні поверхні обладнання та комунікацій дезінфекційним розчином перекису

водню та водою питною з візуальним контролем якості обробки; також у дозволених місцях застосовується 70 %-вий розчин ізопропілового спирту.

ДР 2. Підготовка посуду

Для подальших стадій обробки тканини використовуються по 2-3 скляні баночки з кришками на кожну партію. Також заміні підлягає лабораторний посуд: пластмасові ємності для зміни розчинів, мірні циліндри та бутлі різних об'ємів (від 500 до 50000 мл), пластмасові наважки та ложки для приготування реактивів. Посуд спочатку миється 0,5 %-вим розчином мийного засобу, після чого стерилізується за температури 140 °С і тиску 0,2 МПа протягом 1 год.

ДР 3. Підготовка води очищеної

Підготовку води очищеної проводять за допомогою системи виробництва, що має у своєму складі систему попередньої підготовки води та установку двоступеневого зворотного осмосу. Очищену воду використовують для проведення основних та допоміжних технологічних процесів.

ДР 4. Підготовка повітря

ДР 4.1. Підготовка вентиляційного повітря

Підготовка вентиляційного повітря для виробничих приміщень проводиться на припливній вентиляційній системі, що оснащено системою триступеневої очистки та кондиціонування повітря, що складається із системи фільтрів, центрального кондиціонера і витяжної системи. Витяжна система оснащена фільтрами й аспіраційним вентилятором із м'якою вставкою. Параметри повітря для виробничих приміщень: температура 21 ± 2 °С узимку і 23 ± 2 °С улітку; відносна вологість не більше 60 % з урахуванням технологічних вимог.

ДР 4.2. Підготовка стерильного повітря

Для отримання стерильного повітря, підготованого на попередній стадії, вентиляційне повітря проходить послідовну очистку на фільтрах тонкої очистки з діаметром пор 1,5 і 0,5 мкм. Підготоване повітря подається до відповідних технологічних етапів.

ДР 5. Підготовка розчинів для обробки біотканини

Кожна стадія обробки тканини має свою особливість і тривалість. Усі розчини готуються за спеціальними завчасно підготовленими і затвердженими інструкціями на виробництві.

ДР 5.1. Приготування розчину SDS 0,1 %

SDS 92,5–100,5 % – синтетична органічна сполука з формулою $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$. Для приготування 1000 мл 0,1 % SDS необхідно взяти зі складу реактив SDS, воду від ДР 3, наважки, пластмасову ложку, скляний бутель для змішування речовин та ваги для зважування реактиву.

У попередньо підготовлений скляний бутель налити приблизно 700–800 мл очищеної води. На аналітичних вагах зважити пластмасову ємність для SDS. Скинути ваги у положення “0”. За допомогою пластмасової ложки набрати необхідну кількість SDS – 1 г, намагаючись при цьому взагалі не дихати. Висипати зважений реактив у скляний бутель із водою, струшуючи розмішати. Долити необхідну кількість очищеної води у розчин – 200–300 мл, струшуючи розмішати до повного розчинення SDS, тобто до однорідного розчину з мильними бульбашками.

ДР 5.2. Приготування розчину етилового спирту 70 %

Етанол 70 % – діюча речовина: етанол; не менше 69,3 % об/об і не більше 70,7 % об/об етанолу та води. Для приготування 1000 мл цього розчину необхідні вода, очищена від ДР 3, й етиловий спирт 100 % зі складу, а також посуд, у якому буде проходити змішування. У попередньо підготовлений скляний бутель налити 300 мл очищеної води. У скляний бутель із водою долити 700 мл 100 %-вого етилового спирту і розмішати. Отримано 70 %-вий етанол.

ДР 5.3. Приготування фосфатного буферу

Для приготування 500 мл фосфатного буферу необхідні очищена вода і 1 таблетка TBS, яка має у своєму складі всі необхідні компоненти.

ДР 5.4. Приготування розчину для крос-лінкінгу

Розчин крос-лінкінгу складається з двох частин: приготування 0,05 М 2-морфоліноетансульфонової кислоти (MES) при рН 5,6 та додавання двох

реагентів – 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід гідрохлориду (EDC) і N-гідроксисукциніміду (NHS).

Для приготування 500 мл MES-буферу 0,05 М застосовується вода очищена, у яку додається реагент MES hydrate масою 4,9 г. Наступний крок полягає у вимірюванні та доведенні рівня рН до 5,6. Лише після отримання цього такого рН у розчин буферу додаються наступних два компоненти. Для 20 мл MES-буферу використовується 23,01 мг NHS та 38,16 мг EDC. Розчин обов'язково перемішується при постійному струшуванні.

ТП 1. Забір матеріалу (перикард ВРХ)

Перикард ВРХ – перикард має відбиратися від тварин віком 12–18 місяців. Місцем народження тварини, країною проживання протягом життя, забій тварин проводиться на території України, яка є безпечною з точки зору поширення хвороби губчастої енцефалопатії великої рогатої худоби, що є небезпечною для людини. Такий статус Україні присвоєно відповідно до Кодексу здоров'я наземних тварин BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) [146].

Обов'язковою умовою позитивного результату, тобто дозволу на забір біотканини, є те, що місце забору (скотобійня) повинно мати відповідний сертифікат якості, – сертифікована скотобійня. При заборі перикарда його намагаються максимально очистити від залишків жирової тканини.

ТП 2. Транспортування тканини

Передача біоматеріалу з місця забору до місця виробництва відбувається у термобоксах за температури 4 °С протягом 2 год. Для можливості відстеження і присвоєння номеру партії та готовій продукції скотобійня повинна надати супровідні документи: сертифікат, ветеринарне свідоцтво та перелік тварин, які надходять відповідною партією.

ТП 3. Підготовка матеріалу до роботи

Перед тим як почати основну обробку перикарда, необхідно якомога ретельніше відчистити тканину від непотрібних частин, що не були вилучені на місці забору.

ТП 3.1. Механічне очищення

Механічне очищення проводиться за допомогою води очищеної. Тканину занурюють у ємності для ополіскування, при цьому виконують кругові рухи рукою.

ТП 3.2. Нарізка на латки

З перикарда необхідно вибрати максимально рівномірну і без пошкоджень частину, яку можна нарізати на латки. При нарізуванні зразків використовуються силіконова дощечка, скальпель (змінюється після кожного перикарда) та лінійка, після чого латка поміщається у ємність з очищеною водою для подальшого промивання.

ТП 3.3. Відмивання від компонентів крові

Нарізані зразки відмиваються від компонентів крові у воді, очищеній протягом 1 год.

ТП 3.4. Заморозка перикарда

Заморожування тканини відбувається у морозильній камері за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 24 год.

ТП 3.5. Відтаювання ксенотканини

Процес відтаювання біотканини проводиться за кімнатної температури ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) протягом більш ніж 10 год.

ТП 4. Обробка біотканини

Важливою частиною обробки ксенотканини є перевірка зразків на відповідність контрольним критеріям, що проводиться під час проходження кожної стадії обробки. У випадку невідповідності зразок вибраковується з процесу обробки й утилізується належним чином. Для цього процесу в кожному етапі застосовуються очищена вода, а також обов'язково стерильне повітря.

ТП 4.1. Осмотичний шок

Біоматеріал повинен пройти етап осмотичного шоку – впливу очищеної води на клітини перикарда, тобто проникнення в клітини та розрив мембранних компонентів, протягом 24 год за температури $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ТП 4.2. Хімічна обробка

Хімічна обробка відбувається із застосуванням аніонного детергенту протягом 7-ми діб за температури 4 °С. Зазвичай під час цього етапу відбувається відбір зразків для досліджень.

ТП 4.3. Детоксикація

Реагенти, що застосовуються в попередній обробці, є досить цитотоксичними і потребують додаткового етапу відмивки. Детоксикація виконується протягом 7-ми діб із використанням очищеної води за температури 4 °С.

ТП 4.4. Фіксація та стабілізація

Фіксація та стабілізація матриксу проводяться із застосуванням етилового спирту протягом 12 год за температури 4 °С.

ТП 4.5. Відмивання

Для вилучення залишків спирту із матриксу необхідно провести етап відмивання. Для цього використовується фосфатний буфер рН 7,4 протягом 24 год за температури 4 °С.

ТП 4.6. Крос-лінкінг

Крос-лінкінг проходить протягом 12 год за кімнатної температури зі сталим значенням рН 5,6.

ТП 4.7. Відмивання

Відмивання проводиться у фосфатному буфері рН 7,4 протягом 3 год за температури 4 °С.

ТП 4.8. Ліофілізація

Ліофілізацію проводять у постійній ліофільній камері в режимі глибокого вакууму $P = 0,09$ мБар за температури +2–5 °С протягом 25 год.

ТП 5. Фасування готового ЛТМБМ

Стадія фасування проходить у класі чистоти 7. Фасування ЛТМБМ відбувається за допомогою лінійки, скальпеля (змінюється після кожного зразка) та силіконової дощечки. Зразок вирівнюється і нарізається до

необхідного розміру, після чого фасується у два пакувальних блістери: внутрішній із додаванням фосфатного буферу рН 7,4 та зовнішній.

ТП 6. Маркування готового ЛТМБМ

Для подальшого пакування і відвантаження та можливості прослідкувати готову продукцію фасовані зразки маркують.

Маркування споживчої тари (коробки) має виконуватись друкованим способом на ярлику, який наклеюється на коробку і повинен містити у доступній для сприйняття споживачем формі таку інформацію:

1. Назва виробу.

2. Позначки згідно з ДСТУ ISO 15223-1:2015:

“Виробник” із зазначенням назви підприємства-виробника, адреси, номерів телефонів, електронної адреси;

“Дата виготовлення”;

“Використати до”;

“Код партії”;

“Стерилізовано опроміненням”;

“Повторно не стерилізувати”;

“Не використовувати в разі пошкодження пакування”;

“Повторно не використовувати”;

“Користуйтеся інструкцією щодо використання”;

“Засторога! Ознайомитися із супровідними документами”.

ТП 7. Контроль якості готового продукту

Із кожної отриманої партії відбираються зразки латок та перевіряється якість готового ЛТМБМ відповідно до вимог системи оцінки якості ДСТУ ISO 13485:2018 “Вироби медичні. Системи управління якістю. Вимоги щодо регулювання”.

ТП 8. Стерилізація продукції

Стерилізація здійснюється електронним випромінювання (β-випромінювання) дозою опромінення 20 кГр. Електронно-променеве випромінювання не передбачає глибинного проникнення в товщу продукту.

Дія електронного випромінювання обмежується 8 хв. Короткочасність впливу прискорених електронів знижує можливі ефекти окиснення, зводячи до мінімуму порушення в структурі як продукту, так і пакувального матеріалу.

ТП 9. Пакування, відвантаження готового продукту

ЛТМБМ постачається у стерильному вигляді в блістерній упаковці з захистом від відкриття, яка упакована в коробку з картону. До комплекту поставки входить:

- ЛТМБМ ;
- інструкція із застосування;
- імплантаційний лист.

Коробки закривають та відправляють на склад для подальшого зберігання або реалізації. Упаковка повинна забезпечувати захист від впливу механічних і кліматичних факторів під час транспортування і зберігання, а також найбільш повне використання вантажопідйомності (місткості) транспортних засобів і зручність виконання вантажно-розвантажувальних робіт.

Транспортування повинно здійснюватися поштовими пересилками за правилами, прийнятими для поштових перевезень.

Зберігання ЛТМБМ повинно бути у споживчій тарі (картонній коробці), що знаходяться на стелажах складу. Зберігати вироби без споживчої тари (коробки) не дозволяється.

Середній строк служби виробів – 5 років із моменту введення в експлуатацію (імплантації). Гарантійний строк зберігання ЛТМБМ повинен бути не менше 1 року з моменту стерилізації.

ЗВ 10. Знешкодження відходів і промислових викидів

На цій стадії відбувається знешкодження та знезараження всіх відходів виробництва та допоміжних робочих розчинів перед утилізацією.

Охорона навколишнього середовища від забруднень, контроль за станом довкілля, який включає очищення стічних вод, здійснюється відповідно до

ДСТУ ISO 14001:2015 «Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосування».

Контроль за гранично допустимими концентраціями шкідливих речовин здійснюється відповідно до вимог Державних санітарних норм та правил утримання територій населених місць, затверджених наказом МОЗ України № 145 від 17.03.2011 р., розпорядження КМУ «Про схвалення Національної стратегії управління відходами в Україні до 2030 року» № 820-р від 8 листопада 2017 р., ДСТУ 4462.3.01, ДСТУ 4462.3.02.

Утилізація неякісної продукції проводиться згідно з законами України «Про відходи» № 187/98-ВР від 05.03.98 р., «Про вилучення з обігу, переробку, утилізацію, знищення або подальше використання неякісної та небезпечної продукції» № 1393-XIV від 11.06.2003 р., Постановою КМУ «Загальні вимоги до здійснення переробки, утилізації, знищення або подальшого використання вилученої з обігу неякісної та небезпечної продукції» № 50 від 24.01.2001 р.

ПВ 11. Переробка відходів

5.3 Організація робіт і виробництва: проєктування, будівництво, введення в експлуатацію

Основні засади для забезпечення якості стерильних медичних виробів виявляються в ході виробничого процесу і полягають у мінімізації можливостей контамінації біоімплантів небезпечними речовинами (рис. 5.2).

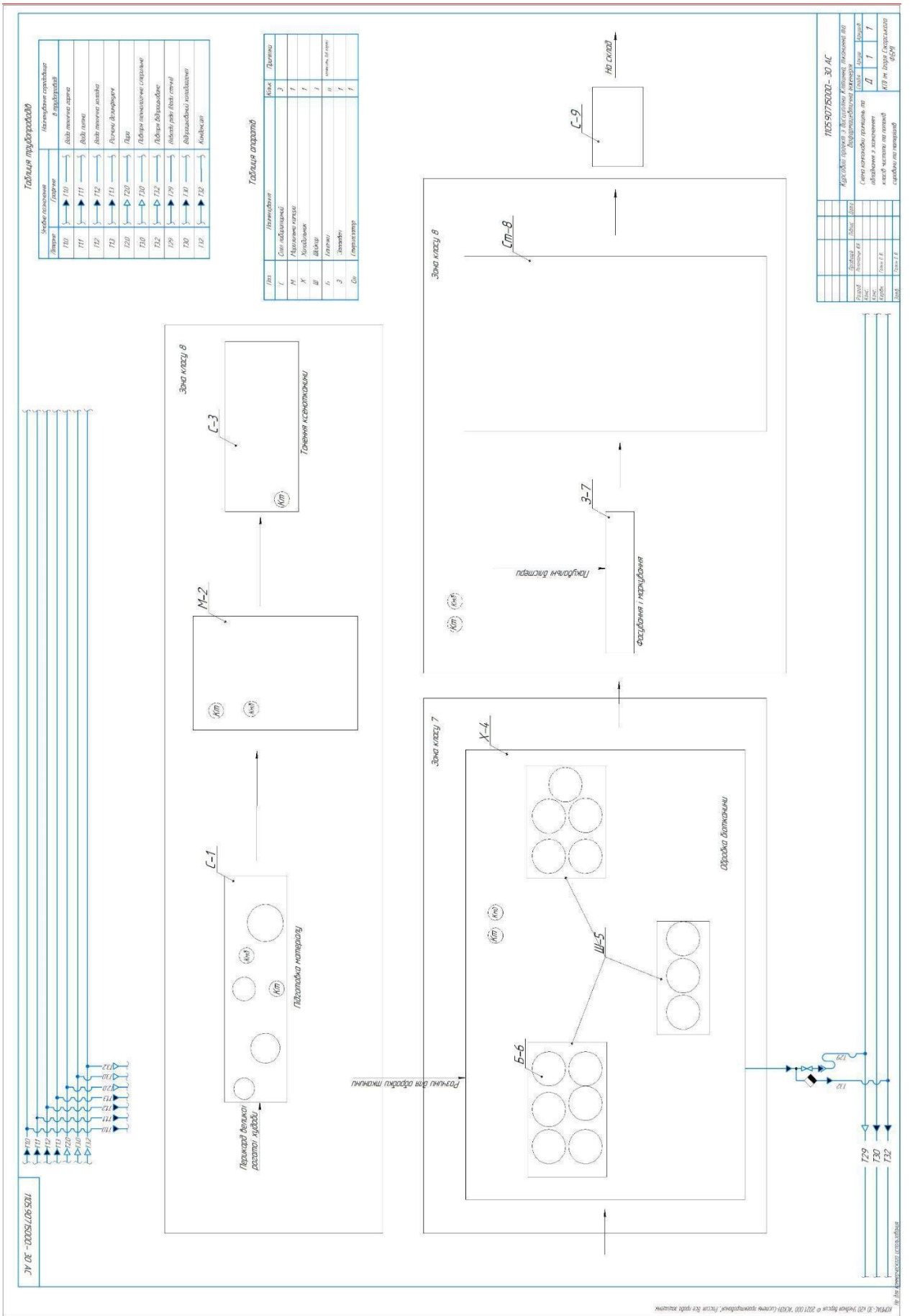


Рис. 5.2. Апаратна схема отримання ЛТМБМ на основі перикарда ВРХ

Обґрунтування компоновки приміщень та обладнання з розподілом за класами чистоти. Виробництво біоімплантів складається з декількох основних технологічних дільниць, таких як: дільниця для підготовки матеріалу до роботи, обробки біотканини, фасування, маркування й стерилізації, а також цех пакування готового виробу. Щоб отримати біоімплант належної якості з відповідними характеристиками, виробництво повинно мати розподіл за класами чистоти. Виконання допоміжних робіт можна виконувати не в чистих приміщеннях, тобто наявність класу чистоти не є обов'язковою умовою.

Для отримання біоімплантів достатньо наявності класу чистоти 7 чи 8. Відповідно до технологічного процесу підготовка біоматеріалу до роботи, фасування, маркування й стерилізації може відбуватись у приміщенні класу 8. Клас 7 необхідний на етапі обробки ксенотканини. Тому доцільно розглянути кожен дільницю під час виробництва біоімплантів.

Стадія ТП 3. Підготовка матеріалу до роботи здійснюється в чистому приміщенні класу 8. Для роботи на цій стадії необхідно мати лабораторні столи С-1 і С-3 для механічного очищення та нарізки зразків, а також для відтанення перикарда ВРХ, і морозильну камеру М-2 для заморожки біотканини (рис. 5.2).

Етап ТП 4. Обробка біотканини проводиться в класі чистоти 7. Для забезпечення перебігу цієї стадії обов'язково треба мати холодильник Х-4, шейкери Ш-5 і скляні баночки Б-6 із кришками для можливості проведення всіх етапів оброблення біотканини – від осмотичного шоку до відмивання у фосфатному буфері. Всі розчини, необхідні для обробки ксенотканини, готуються на стадії ДР 5. Приготування розчинів для обробки біотканини.

Під час фасування, маркування і стерилізації достатньо класу чистоти 8. При цьому використовуються пакувальні блістери, що заповнюються фосфатним буфером з ДР 5.3 і закриваються за допомогою запаювача З-7. Позначення розфасованих біоімплантів здійснюється маркером. Після цього

оброблена ксенотканина передається на етап стерилізації СТ-8 електронним опроміненням 20 кГр.

Остаточне пакування готової продукції в картонні коробки з етикетками та інструкціями здійснюється не в чистих зонах за допомогою лабораторного стола С-9. Після цього готові біоімпланти передаються на склад для зберігання або подальшого відвантаження до споживача.

Обов'язково здійснюється технологічний і мікробіологічний контроль на кожному етапі виробництва, щоб запобігти перехресній контамінації та перевірити відповідність якості продукту та наявність мікроорганізмів у чистому приміщенні.

Крім головних приміщень виробництва, існують також загальні. Наприклад, кімната для переодягання, офіс, склад для непродовольчих товарів і холодильник.

Кімната для переодягання розташовується одразу при вході в лабораторію й чисті виробничі приміщення та використовується для переодягання у/від спецодягу. Кімната також призначена для одягання чистого технологічного одягу персоналом. Має незначний запас упакованого чистого технологічного одягу, за чим слідкує та поповнює зі складу обраний відповідальний.

Склад непродовольчих товарів слугує для збереження мийних і дезінфекційних засобів, інших необхідних хімічних речовин, антисептиків, туалетного паперу, чистого технологічного одягу тощо. Температура підтримується на рівні 18–22 °С, вологість – 40–60 %.

Холодильник необхідний для збереження біоматеріалу для роботи. Підтримується постійна температура на рівні 4 °С.

Офіс розташований майже на виході з будівлі, оснащений письмовими столами, шафами для зберігання документації.

При обґрунтуванні компоновки обладнання, розподілу за класами чистоти та матеріальних потоків використано вимоги Настанови СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020.

Обґрунтування потоків сировини. Виробничий процес починається з підготовки біологічного матеріалу до процесу головної обробки різними розчинами. Вода очищена подається місцевим трубопроводом до дільниці підготовки біоматеріалу до роботи. Кожен цех виробництва має свій трубопровід.

Після підготовки ксенотканина передається через віконний шлюз до стадії обробки у більш високий клас чистого виробництва. Звідти, пройшовши всі кроки обробки біотканини, готовий продукт надходить до наступної кімнати класу 8, де розташовується запаювач 3-7 для фасування та маркування і стерилізатор Ст-8. Стерилізовані зразки біоімплантів поступають до лабораторного стола С-9 для подальшого пакування в коробки, які потім переносять на склад готової продукції.

Обґрунтування потоків персоналу. Персонал приходить у дільницю підготовки біоматеріалу до обробки й фасування, маркування та стерилізації орієнтовно з інших допоміжних цехів. У спеціально відведеному місці, що знаходиться біля чистих приміщень, персонал повинен переодягнутися у відповідний спецодяг, що відповідає класу 8. У технологічному одязі: хірургічний халат на зав'язках, бахіли, маска, неприпудрені нітрилові рукавички, шапочки для волосся або бороди, персонал може пересуватися до інших необхідних дільниць виробництва, але обов'язково перед кожною кімнатою обробляти руки дезінфекційними засобами.

До дільниці обробки біотканини персонал може потрапити так само, як і у випадку підготовки біоматеріалу до роботи, – рухається по виробничих приміщеннях класу С відповідно до виробничих потреб.

5.4 Оцінка ризиків виробничого процесу отримання біоімплантів

Планування виготовлення продукції та розробки технологічного процесу передбачає проведення аналізу й оцінки ризиків, що можуть виникати на виробництві. Відповідно до Технічного регламенту щодо медичних виробів, затвердженого Постановою КМУ № 753 від 02.10.2013 р., імпланти

відносяться до категорії виробів медичних. Тому для управління ризиками для забезпечення належної якості продукту під час виробничого процесу необхідно спиратися на нормативний документ ДСТУ ISO 14971:2015 “Вироби медичні. Настанови щодо управління ризиком”.

Оцінювання ризиків дає можливість виявити критичні точки виробництва і складається з двох основних компонент: ймовірність завдання шкоди і наслідки завданої шкоди, а саме ступінь їх тяжкості. При визначенні будь-якого ризику для загальної оцінки ризику варто ставити такі основні запитання: які дії можуть бути неправильними? яка ймовірність неправильних дій? який ступінь тяжкості неправильних дій?

У більшості випадків одним з інструментів контролю ризиків є використання методу системи аналізування ризиків і критичних контрольних точок (Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP). Метод передбачає структурований підхід до ідентифікації, оцінювання та контролювання наслідків небезпек із застосуванням технічних і наукових концепцій, де результатом є планування, розробка, виробництво та застосування імплантів. Основними етапами HACCP є аналіз небезпек, визначення критичних контрольних точок та їх моніторинг, визначення коригувальних дій. Після його застосування формується інформація про управління ризиками, що забезпечує моніторинг усіх стадій технологічного процесу виробництва.

Отже, основна точка для оцінки ризиків – це технологічний процес виробництва біоімплантів (ЛІТМБМ). Таким чином, після проведеного аналізу технологічної схеми визначено такі контрольні точки та очікувані ризики, що їм відповідають:

– підготовка виробництва: підготовка персоналу, дезінфекційних і мийних розчинів, лабораторного обладнання, посуду, виробничих приміщень, води та повітря відносяться до основних допоміжних стадій виробництва, тому неякісна початкова підготовка, тобто недотримання правил підготовки, може призвести до мікробної та/або хімічної контамінації (ризик R_1);

– підготовка розчинів для обробки біотканини: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з неправильним дозуванням необхідних речовин, недотриманням інструкції з приготування певного розчину, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію (ризик R₂);

– забір матеріалу та його транспортування: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з неправильним забором матеріалу та недотриманням умов перевезення матеріалу, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію, а також недоцільність застосування матеріалу в подальшій роботі (ризик R₃);

– підготовка матеріалу до роботи: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з недотриманням правил технології при підготовці матеріалу та появою мікробної та/або хімічної контамінації (ризик R₄);

– обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені неправильним приготуванням розчинів обробки тканини на стадії допоміжної роботи, недотриманням заданих умов проведення обробки та появою мікробної та/або хімічної контамінації (ризик R₅);

– обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені недотриманням режиму ліофілізації (ризик R₆);

– фасування та маркування готового біоімпланта: на цьому етапі ризики можуть стосуватися невідповідності маркування або переплутування зразків у блістерах (ризик R₇);

– стерилізація: ризик може бути зумовлений подачею підвищеної дози опромінення, яка не прописана в інструкції (ризик R₈);

– пакування, відвантаження готової продукції: ризики на цьому етапі пов'язані з недокомплектуванням готового виробу та переплутуванням етикетки (ризик R₉).

У свою чергу слід зазначити, що аналіз співвідношення ризик/користь зазвичай є однією з важливих складових управління ризиками саме в медичній галузі. При цьому, якщо користь від застосування медичного виробу перевищує ризики, то можна вважати, що застосування такого виробу є

безпечним і ефективним у медичній практиці. Однак, слід мати на увазі, що врахування ризиків повинно бути постійним процесом, особливо коли з'являються нові дані щодо безпеки та ефективності медичних виробів.

Таким чином, вірогідність настання небезпечної події і наслідки для кожної небезпеки застосування (шкоди для пацієнта) кінцевого продукту виробництва (медичного виробу) визначається методом експертної оцінки по 4-х бальній шкалі (табл. 5.1, табл. 5.2).

Таблиця 5.1

Вірогідність настання небезпечної події (P)

Бали	Ступінь	Діапазони вірогідності
1	мінімальна	Менше ніж 0,00001
2	низька	В межах 0,0001 до 0,00001
3	помірна	В межах від 0,01 до 0,0001
4	висока	Більш ніж 0,01

Таблиця 5.2

Серйозність наслідків події (S)

Бали	Ступінь	Наслідки для здоров'я людини
1	мінімальна	Дискомфорт користувача, пацієнта
2	низька	Несуттєві проблеми зі здоров'ям (тільки незначний вплив)
3	помірна	Тимчасове погіршення стану користувача, пацієнта
4	висока	Стійке погіршення стану або ураження, що загрожують життю. Необхідність медичного втручання

Оцінювання ризиків розраховували за формулою:

$$R = P \cdot S,$$

де R – ризик, в балах;

P – вірогідність виникнення небезпеки, в балах;

S – серйозність наслідків дії небезпеки, в балах.

Виходячи із значень Р і S, робоча група визначала категорію ризику по матриці класифікації ризиків в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Класифікація ризиків виробничого процесу отримання біоімплантів

Вірогідність / Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Отже, для управління ризиками на підставі отриманих оцінок ризиків було визначено заходи та дії стосовно тих ризиків, які мають неприйнятний рівень (критичний ризик). Такий підхід до управління ризиками дозволяє концентруватися на найбільш важливих проблемах та ризиках, які можуть негативно вплинути на діяльність підприємства. Визначення заходів та дій по управлінню критичними ризиками дозволяє підприємству зосередити свої зусилля на пріоритетних напрямках та забезпечити належну якість та безпеку продукції. Крім того, визначення термінів виконання заходів та дій допомагає забезпечити вчасну реалізацію запланованих дій та зниження ризиків до прийнятних рівнів.

Тип заходів по управлінню і терміни їх виконання вибиралися за критеріями, вказаними в табл. 5.4.

Критерії проведення заходів та дій управління ризиками

Рівень ризику	Необхідні заходи
Незначний ризик (1-4)	Заходи не потрібні. Періодичний моніторинг рівня ризику.
Значний ризик (6-8)	Значний ризик. Заходи мають бути вжиті протягом 3 місяців. Постійний моніторинг.
Критичний ризик (9-16)	Негайні дії, які необхідні для зниження ризику шляхом розробки заходів щодо мінімізації ризиків.

У даній таблиці представлено керівництво щодо типу заходів, які повинні бути вжиті в залежності від рівня ризику, що визначається в процесі аналізу ризиків. Якщо ризик є незначним (1-4), заходи не потрібні, але рекомендується періодичний моніторинг рівня ризику. Якщо ризик є значним (6-8), заходи мають бути вжиті протягом 3 місяців, а також потрібно проводити постійний моніторинг. Якщо ризик є критичним (9-16), необхідні негайні дії для зниження ризику шляхом розробки заходів щодо мінімізації ризиків.

Відповідно до рекомендацій та особливостей виробленого продукту, доцільно застосовувати якісний підхід до аналізування ризиків.

Оцінювання вірогідності та тяжкості ризиків розраховували за формулою:

$$R = T / N,$$

де T — це сума вірогідності/серйозності наслідків;

N — це кількість експертних висновків.

Таким чином, вибрано підхід із використанням N-M-матриці для опису вірогідності та тяжкості ризику в кожній контрольній точці, що вказана вище. Всі рівні тяжкості розділено на три типи: критичний (зворотна значна шкода),

значний (зворотна незначна шкода) та незначний (не призводить до шкоди). Ймовірність виникнення тої чи іншої шкоди також розділено на три категорії: критична (можлива, трапляється неодноразово), значна (можлива, але трапляється час від часу), незначна (малоймовірна, трапляється рідко) (табл. 5.5) (Додаток 3-7).

Таблиця 5.5

Матриця ризиків виробничого процесу отримання біоімплантів

		Якісні рівні тяжкості		
		Незначний	Значний	Критичний
Якісні рівні вірогідності	Критичний		R ₂	R ₄ , R ₅ , R ₆ , R ₈
	Значний		R ₃	
	Незначний		R ₁ , R ₇ , R ₉	

Проаналізувавши матрицю ризиків (табл. 5.5), ми визначили, що найбільш критичними контрольними точками є підготовка матеріалу до роботи, обробка тканини та стерилізація готової продукції. Також до критичних стадій виробництва можна віднести підготовку розчинів для обробки біотканини.

Щоб зменшити вірогідність появи ризику, потрібно вжити запобіжні заходи, а саме: вияв і контроль таких параметрів технологічного процесу, які призводять до виробничого ризику. Перелік контрольних точок для найбільш критичних стадій наведено в табл. 5.6.

Таблиця 5.6

Перелік контрольних точок виробництва біоімплантів

Стадія та підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметра	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
ДР 5 Підготовка розчинів для	Кт 5.1.1	Маса речовини SDS	1–1,5 г	Ваги	Кожного разу

обробки біотканини ДР 5.1 Приготування розчину 0,1 % SDS	Кт 5.1.2	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ДР 5 Підготовка розчинів для обробки біотканини ДР 5.2 Приготування розчину етилового спирту 70 %	Кт 5.2.1	Об'єм води очищеної	300 мл	Мірний циліндр	Кожного разу
	Кт 5.2.2	Об'єм етилового спирту 100 %	700 мл		Кожного разу
	Кт 5.2.3	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ДР 5 Підготовка розчинів для обробки біотканини ДР 5.3 Приготування фосфатного буферу	Кт 5.3.1	Кислотність	pH 7,4 ± 0,1	pH-метр	Кожного разу
	Кт 5.3.2	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ДР 5 Підготовка розчинів для обробки біотканини ДР 5.4 Приготування розчину для крос-лінкінгу	Кт 5.4.1	Кислотність	pH 5,6 ± 0,1	pH-метр	Кожного разу
	Кт 5.4.2	Концентрація MES	0,05 М	Маса речовини, ваги	Кожного разу
	Кт 5.4.3	Концентрація EDC	10 мМ		Кожного разу
	Кт 5.4.4	Концентрація NHS	10 мМ		Кожного разу
	Кт 5.4.5	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ТП 3 Підготовка матеріалу до роботи ТП 3.3 Відмивання від компонентів крові	Кт 3.3.1	Час	1–1,5 год	Годинник	Кожного разу
ТП 3 Підготовка матеріалу до роботи	Кт 3.4.1	Температура	-20 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 3.4.2	Час	24 год	Годинник	Кожного разу

ТП 3.4 Заморозка перикарда					
ТП 3 Підготовка матеріалу до роботи ТП 3.5 Відтаювання ксенотканини	Кт 3.5.1	Температура	20–24 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 3.5.2	Час	Не менше 10 год	Годинник	Кожного разу
ТП 4 Обробка тканини ТП 4.1 Осмоличний шок	Кт 4.1.1	Температура	2–5 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 4.1.2	Час	24 год	Годинник	Кожного разу
	Кт 4.1.3	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ТП 4 Обробка тканини ТП 4.2 Хімічна обробка	Кт 4.2.1	Температура	2–5 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 4.2.2	Час	7 діб	Годинник	Кожного разу
	Кт 4.2.3	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ТП 4 Обробка тканини ТП 4.3 Детоксикація	Кт 4.3.1	Температура	2–5 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 4.3.2	Час	7 діб	Годинник	Кожного разу
	Кт 4.3.3	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ТП 4 Обробка тканини ТП 4.4 Фіксація та стабілізація	Кт 4.4.1	Температура	2–5 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 4.4.2	Час	12 год	Годинник	Кожного разу
	Кт 4.4.3	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ТП 4 Обробка тканини ТП 4.5 Відмивання	Кт 4.5.1	Температура	2–5 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 4.5.2	Час	24 год	Годинник	Кожного разу
	Кт 4.5.3	Кислотність	pH 7,4 ± 0,1	pH-метр	Кожного разу
	Кт 4.5.4	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ТП 4 Обробка тканини	Кт 4.6.1	Температура	2–5 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 4.6.2	Час	12 год	Годинник	Кожного разу

ТП 4.6 Крос-лінкінг	Кт 4.6.3	Кислотність	pH 5,6 ± 0,1	pH-метр	Кожного разу
	Кт 4.6.4	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ТП 4 Обробка тканини ТП 4.7 Відмивання	Кт 4.7.1	Температура	2–5 °С	Термометр	Кожного разу
	Кт 4.7.2	Час	3 год	Годинник	Кожного разу
	Кт 4.7.3	Кислотність	pH 7,4 ± 0,1	pH-метр	Кожного разу
	Кт 4.7.4	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
ТП 7 Стерилізація	Кт 7.1	Доза опромінення	20 кГр	Дозиметр	Кожного разу
	Кт 7.2	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично

5.5 Система оцінки якості виробництва біоімпланта

Згідно з ДСТУ ISO 13485:2016 “Медичні вироби. Система управління якістю. Вимоги до регулювання” та ДСТУ ISO 9001:2015 (ISO 90001:2015, IDT) “Системи управління якістю. Вимоги” обов’язковим є проведення перевірки контролю якості готового продукту під час процесу його виготовлення, особливо в найкритичніших точках виробництва. Метою і основною ціллю є те, що імплант повинен відповідати встановленим правилам нормативної документації, що стосуються медичних виробів.

Складові елементи всіх стадій технологічного процесу повинні забезпечувати якість продукції, а також мати сталі характеристики. Для забезпечення цього потрібно проводити валідацію, тобто експериментально підтверджувати належну якість виготовленої продукції.

Під час етапів технологічної схеми виробництва виготовлення біоімпланта контролюється специфічними методами. У кожній партії здійснюється простежуваність за такими обов’язковими частинами:

- наявність і кількість нуклеїнових кислот;
- визначення стерильності виробу;

- випробування на бактеріальні ендотоксини – призначене для виявлення або ж кількісного визначення ендотоксинів, джерелом яких слугують грам-негативні бактерії;
- перевірка пружно-міцнісних властивостей і сили розриву – показує, чи витримує виготовлений імплант напруження і тиск рідини, що діє на нього з боку організму людини;
- ступінь очистки біоімпланта від клітин та їх компонентів – підтвердження якісного очищення та відсутності домішок, які могли б мати небезпечний характер у подальшому застосуванні.

Кожна перевірка здійснюється в кінці всієї обробки біотканини. Відбирається не більше 5 % зразків від кількості всіх виготовлених біоімплантів.

У процесі виробництва використовувані матеріали та сировина є тими чинниками, що найсуттєвіше впливають на якість готової продукції. Особливе значення варто приділити сировині, яка має загальні характеристики та, відповідно, легку простежуваність контролю за нормативними документами. У будь-якому випадку, всі стадії технологічного процесу повинні контролюватися, включаючи перевірку якості вхідних матеріалів, роботу персоналу та правильність виконання кожного етапу відповідно до інструкції робочого процесу (табл. 5.7). Інакше, якщо цього не робити, результатом може стати непомітний брак складової готового продукту, що понесе за собою значні економічні й репутаційні втрати, а також ставить під питання безпеку при використанні готової продукції для людини.

Характеристика сировини та матеріалів

Найменування	Нормативно-технічна документація, що регламентує показник якості	Показники, що обов'язкові для перевірки, та їх нормативні значення	Примітки
Перикард ВРХ	Кодекс здоров'я наземних тварин (BSE – Bovine Spongiform Encephalopathy)	Наявність енцефалопатії; безпечність для людини; вік тварини – 12–18 місяців	Основна сировина
Вода очищена	Державна фармакопея України 2.0, 2016, Т. 2, с. 129	Кількість сухого залишку, нітратів, алюмінію, важких металів, бактеріальних ендотоксинів, хлоридів, сульфатів, амонію солі; забарвлення кальцію і магнію; мікробіологічна чистота – не більше 10^2 в 1 мл	Компонент ТС
Вода питна	ДСТУ 7525:2014 “Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості”	Мікробіологічні, вірусологічні, паразитологічні, мікологічні, органолептичні, хімічні та токсикологічні показники; рівень токсичності; радіаційна безпека згідно з ДСТУ та нормами ДСанПіН 2.2.4-171	Компонент ТС
Водню перекис	ДСТУ 7356:2013 “Молоко. Метод визначення пероксиду водню”	Опис, кількісне визначення, пакування, маркування, термін придатності, паспорт постачальника; кількість хлоридів, важких металів, органічних стабілізаторів, арсенію, міді, цинку	Приготування дезінфекційних розчинів

Засіб мийний синтетичний	ДСТУ 2207.1-93 “Засоби миючі синтетичні і речовини поверхнево активні. Методи визначення концентрації водневих іонів”	Ті, що прописані в ДСТУ	Приготування мийних розчинів
Розчин спиртовий 70 % (ізопропіловий)	ДСТУ 7457:2013 “Розчини водно-спиртові. Методи визначання вмісту етилового спирту”	Об’ємна частка спирту – 70 %	Приготування дезінфекційних розчинів
SDS 92,5–100,5 %	Sodium dodecyl sulfate (SDS) 92,5–100,5 %, Sigma-Aldrich	Чистота – 200 відповідно до ISO 9001; кількість хлору, фосфату, важких металів	Приготування розчинів для обробки біотканини
Етанол 96 %	Державна фармакопея України 1.1, 2004, с. 339	Чистота: прозорість, кольоровість, кислотність або лужність, відносна й оптична густини, леткі домішки	Приготування розчинів для обробки біотканини
Phosphate-Buffered Saline	PBS Tablets, Gibco	Наявність кальцію та магнію; відповідність необхідному значенню рН – 7,4	Приготування розчинів для обробки біотканини
2-(N-морфоліно)-етансульфонова кислота	MES hydrate, Sigma-Aldrich	Чистота – 400 відповідно до ISO 9001; ендотоксичні, мікробіологічні показники; наявність металів	Приготування розчинів для обробки біотканини
1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)-карбодіімід гідрохлорид	EDC 98 %, Sigma-Aldrich	Відповідно до складу і вимог виробника	Приготування розчинів для обробки біотканини
N-гідроксисукцинімід	NHS, Thermo Scientific	Відповідно до складу і вимог виробника	Приготування розчинів для обробки біотканини
Пакувальні блістери, етикетки на продукт	ДСТУ ISO 780-2001 “Пакування. Графічне маркування щодо поводження з товарами”	Вигляд; наявність повного, правильного та розбірливого друку	Фасування та пакування готового продукту

Коробки з гофрованого картону	ДСТУ ГОСТ 9142:2019 “Ящики з гофрованого картону. Загальні технічні умови”	Вигляд ззовні, цілісність, маркування	Пакування готового виробу
Фільтри повітряні	ДСТУ 3493-96 “Системи вентиляційні. Фільтри повітряні. Типи і основні параметри”	Пропускна здатність фільтра; швидкість проходження повітря	Підготовка повітря
Рукавички гумові технічні, тип А чи В	ДСТУ EN 420:2017 “Рукавички захисні. Загальні вимоги та методи випробування”	Зовнішній вигляд, цілісність	Захист під час ТП і при санітарній обробці
Технологічний одяг	ДСТУ EN 14605:2017 “Одяг захисний. Захист від рідких хімічних речовин. Вимоги до експлуатаційних характеристик одягу з непроникними до рідини (тип 3) або непроникними до спрею (тип 4) з'єднаннями та до предметів одягу для захисту частин тіла (типи PB [3] та PB [4])”	Чистота, стерильність, захист відповідно до ДСТУ	Захист під час ТП для персоналу та забезпечення якості продукту

Відповідно до ДСТУ ISO 9001:2015 “Системи управління якістю. Вимоги” персонал є однією з основних ланок процесу виробництва. Тому для забезпечення чистоти та безпечного користування готовим біоімплантом, а також захисту під час робочого процесу в обов'язковому порядку необхідно дотримуватися певних правил і вимог щодо працівників. Наприклад, кваліфікація та практичний досвід у роботі (стаж), виконання правил санітарної підготовки, особливо гігієнічної, а також персонального захисту (спецодяг). Учасники виробництва можуть бути джерелами контамінації. Задля уникнення зайвих рухів персонал зобов'язаний ознайомитися з правилами техніки безпеки та особливостями виробничого процесу. Головним завданням є навчання працівників щодо забезпечення необхідної безпеки при роботі: обробка і дезінфекція рук, обов'язкове вдягання спецодягу (рукавичок, шапочки, маски) та використання мийних і дезінфекційних засобів, правильне

користування лабораторним обладнанням згідно з документацією виробництва.

Контроль персоналу, повітря приміщень та обладнання є головним для забезпеченням якості готового імпланта й отримання стерильної продукції.

Періодично має відбуватися забір проб у виробничих приміщеннях для контролю мікробіологічних показників повітря, що подається до робочої зони. Це відбувається при застосуванні монодисперсного аерозолу (тест-культури мікроорганізмів спор *B. subtilis*).

У зоні класу 7 здійснюються основні процедури, що потребують чистоти, наприклад обробка різними розчинами біотканини. Тому необхідно час від часу проводити моніторинг концентрації частинок і мікроорганізмів у повітрі. Це буде забезпечувати оптимальне проходження процесів, зниження рівня загального забруднення та мікробної контамінації, а також зменшить ризик отримати продукцію, що не відповідає вимогам.

Лабораторне обладнання та посуд мають безпосередній контакт із продуктами виробництва і повинні постійно митися та дезінфікуватися, щоб уникнути небажаної контамінації або перенесення матеріалу, що може негативно вплинути на якість проміжного продукту. З огляду на те що деяке обладнання може бути чутливим до певних хімічних речовин чи високих температур, необхідно мати графіки і процедури (опис матеріалів і методів, розведення мийних засобів, інструкції з приготування) для обслуговування обладнання.

Важливими факторами є контроль обладнання щодо чистоти та калібрування відповідно до норм і стандартів для забезпечення відповідності контрольної якості на будь-якому етапі виробництва біоімпланта.

5.6 Методи контролю якості виробництва біоімпланта

Випробування, якщо в їх описі немає особливих вказівок, повинні проводитися в нормальних кліматичних умовах випробувань. Перелік засобів

вимірювальної техніки, матеріалів, обладнання, необхідних для контролю, наведено в табл. 5.8.

Таблиця 5.8

**Перелік обладнання, засобів вимірювальної техніки, матеріалів,
необхідних для контролю виробів**

Обладнання	Позначення нормативного документа
Лабораторні ваги електронні “Техноваги” з вбудованим акумулятором ТВЕ-1-0,01-а	ISO 80000-1:2022 “Quantities and units — Part 1: General” ISO 10012:2003 “Measurement management systems — Requirements for measurement processes and measuring equipment”
Шейкер орбітальний UOSlab SH-10	ДСТУ CISPR 11:2017 “Електромагнітна сумісність. Обладнання промислове, наукове та медичне радіочастотне. Характеристики електромагнітних завад. Норми та методи вимірювання (CISPR 11:2016 [IDT])”; IEC 61010-1:2019 “Safety requirements for electrical equipment for measurement, control, and laboratory use - Part 1: General requirements”
Медичний холодильник ШХФ-0,5 ДС Polair (лабораторний)	ДСТУ EN 732:2006 “Прилади, що працюють на скрапленому газі. Холодильники абсорбційні. Технічні умови” (EN 732:1998 [IDT]) EN 732:2006 “Specifications for dedicated liquefied petroleum gas appliances—Absorption refrigerators”
Ламінарний бокс біологічної безпеки ESCO	ДСТУ ISO 14644-1:2021 “Чисті приміщення та пов’язані з ними контрольовані середовища. Частина 1. Класифікація чистоти повітря” ISO 14644-1:2021 “Cleanrooms and associated controlled environments — Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration”
Дозатори автоматичні змінного об’єму: - піпет-дозатор 0,5–10 мкл; - піпет-дозатор 5–50 мкл; - піпет-дозатор 20–200 мкл; - піпет-дозатор 100–1000 мкл	17.020 “Metrology and measurement in general Including measuring instruments in general, preferred numbers, standard measures, general aspects of reference materials, etc.”
Лабораторний посуд: - циліндри мірні 100 мл, 500 мл, 1000 мл; - колби мірні з кришкою 500 мл, 5000 мл; - стакани хімічні мірні 800 мл;	ДСТУ ISO 4787:2021 “Посуд лабораторний скляний. Посуд мірний. Методи використання та перевіряння місткості” (ISO 4787:1984 [IDT]) ISO 4787:2021 “Laboratory glassware — Volumetric instruments — Methods for testing of capacity and for use”

- пластикові баночки з кришкою 200 мл	
Термостат ТС 20	ДСТУ CISPR 11:2007 “Електромагнітна сумісність. Обладнання промислове, наукове та медичне радіочастотне. Характеристики електромагнітних завод. Норми та методи вимірювання (CISPR 11:2004 [IDT]”; IEC 61010-1:2019 “Safety requirements for electrical equipment for measurement, control, and laboratory use - Part 1: General requirements”
Спектрофлуориметр DeNovix DS-11	ISO/IEC 19794-14:2022 “Information technology — Biometric data interchange formats — Part 14: DNA data” ISO/IEC 17025:2017 “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”
Центрифуга лабораторна Eppendorf 5418	IEC 61010-2-020:2017 [IDT] “Вимоги щодо безпечності контрольно-вимірювального та лабораторного електричного устаткування. Частина 2-020. Додаткові вимоги до лабораторних центрифуг” IEC 61010-2-020:2017 “Safety requirements for electrical equipment for measurement, control, and laboratory use - Part 2-020: Particular requirements for laboratory centrifuges”
Термошейкер Eppendorf Thermomixer compact	IEC 61010-1:2019 “Safety requirements for electrical equipment for measurement, control, and laboratory use - Part 1: General requirements”
Установка для лазерної нарізки Epilog Zing Laser	ISO 11252:2018 “Lasers and laser-related equipment — Laser device — Minimum requirements for documentation”
Ліофілізатор СВЛ-60	ISO 13408-3:2006 “Aseptic processing of health care products. Part 3. Lyophilization”
Настільний запаювач PFS-300-C	ISO/IEC Guide 41:2018 “Packaging — Recommendations for addressing consumer needs”
Розривна машина IMADA MX2 – 110	ISO 5628:2019 “Paper and board — Determination of bending stiffness — General principles for two-point, three-point and four-point methods”
Товщиномір ТН-10	ISO 534:2011 “Paper and board — Determination of thickness, density and specific volume”
Термометр	ДСТУ ISO 1771:2006 “Термометри загальної призначеності з вкладеною шкалою” (ISO 1771:1981 [IDT]) ISO 1771:2006 “Enclosed-scale general purpose thermometers”
Ножиці хірургічні	ISO 7741:1986:2022 “Instruments for surgery — Scissors and shears — General requirements and test methods”

Скальпель	ISO 7740:1985:2021 “Instruments for surgery — Scalpels with detachable blades — Fitting dimensions”
Пінцет	ISO 7151:1988:2015 “Surgical instruments — Non-cutting, articulated instruments — General requirements and test methods”
Примітка: дозволяється застосовувати інші засоби вимірювань, обладнання з метрологічними характеристиками не нижче вказаних; засоби вимірювальної техніки повинні мати чинні клейма, які свідчать про їх калібрування (повірку), або свідоцтво про калібрування (повірку).	

Перевірку відповідності комплекту технічної документації проводять зовнішнім оглядом і звіркою з документацією. Перевірку розмірів виробів проводять вимірюваннями товщиноміром ТН-10 згідно з вимогами ISO 534:2011. Перевірку зовнішнього вигляду виробів проводять візуальним контролем. Перевірку маркування, пакування і комплектності проводять зовнішнім оглядом. Перевірку герметичності упаковки (пакета) проводять, повністю занурюючи пакет у воду і злегка здавлюючи його долонями. Упаковка (пакет) вважається герметичною, якщо відсутнє виділення бульбашок повітря. Перевірку застосовуваних матеріалів проводять при входному контролі за паспортами та сертифікатами на матеріали. Перевірку на генотоксичність, канцерогенність і репродуктивну токсичність здійснюють згідно з вимогами ДСТУ EN ISO 10993-3:2018. Перевірку на системну токсичність здійснюють згідно з вимогами ДСТУ EN ISO 10993-11:2015. Токсикокінетичні дослідження продуктів деградації та вилуговування, якісний і кількісний аналіз потенційних продуктів деградації здійснюють згідно з вимогами ДСТУ EN ISO 10993-16:2017, ДСТУ EN ISO 10993-9:2015. Випробування на локальні ефекти після імплантації здійснюють згідно з вимогами ДСТУ EN ISO 10993-6:2016. Перевірку на стерильність здійснюють згідно з вимогами ДСТУ EN ISO 11137-1:2018. Випробування виробів на стерильність, пірогенність і токсичність здійснюють фахівці, які мають спеціальну підготовку і досвід в галузі санітарно-хімічного, токсикологічного та біологічного оцінювання медичних виробів.

У разі зміни матеріалів при виробництві ЛТМБМ, технології виготовлення, методів стерилізації, упаковки необхідне проведення повторних випробувань.

Для проведення випробувань медичних виробів мають бути представлені:

- супровідний лист з інформацією про виріб;
- документація;
- зразки виробу.

На підставі проведених випробувань та експертизи документації оформлюють висновок про токсикологічні випробування, випробування на пірогенність, стерильність або протокол випробувань медичних виробів (матеріалів), що встановлюють їх хімічну та біологічну безпеку.

У висновку вказують результати проведених досліджень, відзначають наявність або відсутність токсичних властивостей, стерильності, пірогенності тощо. Враховуючи результати випробувань, видають рекомендацію про можливість застосування ЛТМБМ.

Випробування на призначений строк зберігання проводять закладкою виробів (шість зразків) на дослідне зберігання протягом 1-го року в нормальних умовах зберігання за кімнатної температури.

Результати випробувань вважаються позитивними, якщо при зберіганні протягом 1-го року жоден зі зразків не досяг граничного стану.

Висновки до розділу 5

Розроблено технології виготовлення, стерилізації та ліофілізації тканинномодифікованого матриксу на основі перикарда ВРХ зі створенням апаратно-технологічної схеми виробництва. На основі національних і міжнародних стандартів розроблено технічні вимоги до розробленого медичного виробу, зокрема інструкцію щодо проведення контрольних досліджень якості децелюляризації, ліофілізації та стерилізації.

РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ПАРАМЕТРІВ СТАНДАРТИЗАЦІЇ БІОІМПЛАНТАТА НА ОСНОВІ ПЕРИКАРДА ВРХ І МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЙОГО ЯКОСТІ

На сьогодні в Україні при створенні нового медичного продукту виробник повинен дотримуватися норм законодавчої бази, а саме ДСТУ EN ISO 10993-5:2015 “Біологічне оцінювання медичних виробів”. Відповідно до цього документа визначено процедуру дослідження медпрепарату.

Пункт 5.2.9 встановлює основні положення щодо імплантації виробу (тканинномодифікованого матриксу). Цими дослідженнями визначають місцеву патогенну дію на живу тканину (на макро- і мікроскопічному рівнях) при вивченні зразка матеріалу або кінцевого продукту, що імплантований (ISO 10993-1-2011) хірургічним шляхом чи поміщається в певну тканину відповідно до передбачуваного застосування. Вибрані методи досліджень зазвичай відповідають виду і тривалості контакту. Методи дослідження місцевої дії після імплантації вибирають відповідно до ISO 10993-6.

Також при роботі з ксенотканинами необхідно керуватися стандартом ISO 22442-1-201, що поширюється на медичні вироби, за винятком діагностичних медичних виробів *in vitro*, виготовлених з використанням матеріалів тваринного походження, що є нежиттєздатними або приведеними в нежиттєздатний стан. Призначенням цього стандарту є надання вимог і рекомендацій з контролю ризику, пов'язаного з небезпеками, характерними для медичних виробів, що виготовлені з використанням тваринних тканин або їх похідних, такими як:

- а) контамінація бактеріями, пліснявими або дріжджовими грибами;
- б) контамінація вірусами;
- в) контамінація агентами, що викликають інфекційні губчасті енцефалопатії;
- г) матеріал, що викликає небажані пірогенні, імунологічні або токсикологічні реакції.

Оцінка фізико-механічних характеристик вихідного матеріалу необхідна для отримання більш повної інформації про структуру й властивості ксенотканини та формування подальших рекомендацій щодо використання при оперативних втручаннях. Абсолютні показники пружно-міцнісних властивостей ксеноперикардальної тканини можуть різнитися залежно від джерела отримання. Це пов'язано як із конкретним видом і режимом обробки тканини, так і з видом тварини, з якої вилучається тканина (свині, коні, бики). При дослідженні фізико-механічних властивостей ксеноперикарда визначають граничну міцність тканини на розрив для поздовжньої та поперечної деформації при одноосьовому й однорідному розтягуванні зразків у головних напрямках анізотропії механічних властивостей.

Крім контролю біомеханічних властивостей ксеноперикарда, для оцінки якості обробки біотканини використовують гістологічні та гістохімічні методи досліджень і контроль структур сполучних тканин. Для оцінки наявності клітин у тканинномодифікованому матриксі використовують метод фарбування гематоксилін-еозином, при якому ядра зафарбовуються в синьо-фіолетовий колір, а цитоплазма – в жовтувато-рожевий.

Таблиця 6.1

Специфікація якості на ЛТМБМ на основі перикарда ВРХ

Показники контролю*	Встановлені значення	Методи контролю
Органолептичні показники	Плаский шматочок рівномірного білого кольору без механічних деформацій (зморшок). Запах повинен відповідати запаху використаної сировини	Візуально, органолептично
Ступінь децелюляризації	Відсутність клітин і клітинних компонентів	Власна методика
Ступінь очистки від залишків нуклеїнових кислот	Концентрація не більше 50 нг/мг	Власна методика

Структура та орієнтація колагенових волокон	Частка волокон з орієнтацією і структурою, що повторюють непошкоджений нативний перикард ВРХ, не менше 90 % на товщину зрізу розміром 530 мкм	Власна методика
Кількості колагенових волокон на досліджувану площу зразка	Кількість колагенових волокон на досліджувану площу поля зору мікроскопа, що відповідає нативному перикарду ВРХ, не менше 90 % на товщину зрізу розміром 530 мкм	Власна методика
Гранична міцність на розрив при поперечній орієнтації волокон зразків	Відповідає нативному перикарду ВРХ, не менше $65,7 \pm 4,4$ Н	Власна методика
Гранична міцність на розрив при поздовжній орієнтації волокон зразків	Відповідає нативному перикарду ВРХ, не менше $167,5 \pm 5,5$ Н	Власна методика
Цитотоксичність із використанням клітинних культур для визначення їх лізису	Кількість життєздатних клітин не менше 90 %	ISO 10993-5, 5.2.2
Мікробіологічна чистота	Має бути стерильним	ДСТУ ГОСТ 31214:2014, ДСТУ ISO 2859
Строк придатності	3 місяці за температури від 2 до 8 °С	–

*Показники якості для рутинного контролю.

Одним із основних критеріїв оцінки ефективного перебігу процесу фізичної та хімічної децелюляризації є повне видалення клітин та їх компонентів, а також відсутність структурних змін у колагенових волокнах матриксу. Оцінку процесу проводять мікроскопічно із застосуванням різних методик фарбування гістологічного препарату. До таких методик відносять фарбування гематоксилін-еозином, орсеїном, фарбування за Ван Гізоном, імпрегнацію сріблом, триколон за Масоном, DAPI [155–157]. Фарбування гематоксилін-еозином дає змогу виявити клітини й оцінити структуру та направленість колагену. При цьому ядра зафарбовуються в синьо-фіолетовий

колір, цитоплазма – в жовтувато-рожевий, а волокна – в червоний. Фарбування за методом Ван Гізона дає змогу оцінити структуру колагенових волокон, що набувають яскраво-червоного кольору, але не дає можливості виявити клітинні структури. Барвник орсеїн дає змогу оцінити структуру еластинових волокон сполучної тканини матриксу, що зафарбовуються в темно-червоний колір, тоді як решта структур – у світло-рожевий. Імпрегнація сріблом дає можливість виявити ядра клітин світло-коричневого кольору та колагенові волокна коричневого. Для контролю якості децелюляризації ТМБМ було вибрано фарбування гематоксилін-еозином як універсальний, маловитратний і менш трудомісткий метод. Світлова мікроскопія гістологічних препаратів, зафарбованих за цією методикою, дає змогу визначати кількість і відсоткову частку колагенових волокон з орієнтацією та структурою, що повторюють непошкоджений нативний перикард ВРХ, і ступінь очищення тканини від клітинних компонентів. Метод DAPI, імунофлюоресцентна детекція ДНК, може бути застосований як додатковий контроль для якісної детекції нуклеїнових кислот.

Для кількісного визначення концентрації нуклеїнових кислот розробили методику виділення ДНК із тканини та визначення її концентрації спектрофотометрично. На основі проведених раніше результатів досліджень, у яких вивчалися розвиток ремоделюючого ефекту та виникнення побічної реакції на клітинному й організмовому рівнях, була визначена допустима безпечна доза на рівні <math><50</math> нг дволанцюгової ДНК у 1 мг сухої ваги позаклітинного матриксу [158–160]. Кількісне визначення проводили за допомогою доступних комерційних систем, таких як Easy Blood and Tissue (Qiagen, Німеччина).

ВИСНОВКИ

У дисертації теоретично узагальнено й наведено нові шляхи розв'язання науково-технічної проблеми, що стосується схеми виготовлення тканинномодифікованого продукту на основі ксеноперикарда для застосування в кардіохірургії. Результати досліджень дають змогу зробити такі висновки.

1. У результаті експериментальних досліджень розроблено удосконалену біоінженерну схему отримання тканинномодифікованого матриксу з перикарда ВРХ. Інтенсифікація гідродинамічних умов (200 об/хв) осмотичного лізису клітин і використання низькотемпературного режиму децелюляризації (4 °С) дали змогу скоротити тривалість біотрансформації тканини перикарда ВРХ до 16 діб порівняно із 48 добами для базової схеми. Висока ефективність удосконаленої схеми доведена з використанням гістологічних (відсутність клітин), мікроскопічних (відсутність змін у мікроархітектоніці колагенових волокон), молекулярно-генетичних (нуклеїнові кислоти ≤ 5 нг/мг) та фізико-механічних методів контролю якості виробу (F_{\max} , гранична міцність на розрив, у поздовжньому напрямку волокон – $9,54 \pm 0,65$ кгс, у поперечному напрямку волокон – $4,56 \pm 0,37$ кгс, $p < 0,05$, що перевищує показники контролю).

2. За результатами гістологічного аналізу доведено тенденцію до зменшення кількості колагенових волокон ($p = 0,014$ за критерієм Джохнієра–Терпста) та до зростання вираженості порушення структури й орієнтації колагенових волокон ТМБМ ($p = 0,018$ за критерієм Джохнієра–Терпста) при зростанні дози опромінення 20–30 кГр.

3. Доведено, що дози радіаційного опромінення в 20, 25 і 30 кГр порушують поздовжню ($p < 0,05$) та поперечну ($p < 0,05$) структуру й орієнтацію колагенових волокон відносно нативного перикарда ВРХ. Показано, що збереження пружно-міцнісних властивостей волокон матриксу спостерігається при дозі опромінення 5, 10 та 15 кГр ($p < 0,05$).

4. Доведено, що вплив радіаційного опромінення протягом 8 хв дозами 10, 15, 20, 25, 30 кГр забезпечує стерильність ТМБМ ($p < 0,05$; 95 % ВІ 83% – 100%). Показано, що доза опромінення 5 кГр забезпечує зниження бактеріального навантаження на матрикс, але не пригнічує ріст грибової флори ($p < 0,05$; 95 % ВІ 0 % – 17 %).

5. Гістологічний аналіз кількості, структури та орієнтації колагенових волокон при дії різних режимів ліофілізації показав значну вираженість порушень при дії Режиму 3 за типом “пастка” ($p < 0,05$), що передбачає збільшення температури від від 0 до +23 °С зі швидкістю 1 °С за 10 хв протягом 20 год.

6. Встановлено, що пружно-міцнісні властивості ТМБМ ($F_{\max} = 68,9 \pm 3,5$ Н), ліофілізованого за температури +2–5 °С за умови глибокого вакууму з тиском 0,09 мБар протягом 25 год (Режим 2), статистично не відрізняються від показників нативного перикарда ВРХ ($F_{\max} = 65,7 \pm 4,4$ Н) та ТМБМ ($F_{\max} = 69,4 \pm 2,8$ Н) до сублімаційної сушки ($p > 0,05$). Показано зниження граничної міцності на розрив ліофілізованих зразків у Режимі 1 (+23 °С, 27 год) та Режимі 3 порівняно з іншими групами ($p > 0,05$).

7. Розроблено апаратурно-технологічну схему отримання ліофілізованого тканинномодифікованого матриксу на основі перикарда ВРХ. На основі національних і міжнародних стандартів розроблено технічні вимоги до розробленого медичного виробу, зокрема інструкцію щодо проведення контрольних досліджень якості децелюляризації, ліофілізації та стерилізації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Babenko SI, Muratov RM, Sorcomov MN. Current trends in the creation of cell-free allo- and xenotissues for reconstruction of heart structures. *Russ J Transplantol Artific Organs*. 2021;23:1. DOI: 10.15825/1995-1191-2021-1-150-156
2. Ayala P, Dai E, Hawes M, Liu L, Chaudhuri O, Haller CA. Evaluation of a bioengineered construct for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Aug;106(6):2345-54. DOI: 10.1002/jbm.b.34042
3. Obermiller JF, Hodde JP, McAlexander CS, Kokini K, Badylak SF. A comparison of suture retention strengths of three biomaterials. *Med Sci Monit*. 2004 Jan;10(1):PI1-5.
4. Kim GE, Kwon TW, Cho YP, Kim DK, Kim HS. Carotid endarterectomy with bovine patch angioplasty: a preliminary report. *Cardiovasc Surg*. 2001 Oct;9(5):458-62. DOI: 10.1016/s0967-2109(01)00042-4
5. Us MH, Sungun M, Sanioglu S, Pocan S, Cebeci BS, Ogun T, et al. A retrospective comparison of bovine pericardium and polytetrafluoroethylene patch for closure of ventricular septal defects. *J Int Med Res*. 2004 Mar-Apr;32(2):218-21. DOI: 10.1177/147323000403200216
6. Gomes WJ, Leal JC, Jatene FB, Hossne NA Jr, Gabaldi R, Frazzato GB. Experimental study and early clinical application of a sutureless aortic bioprosthesis. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2015 Sep-Oct;30(5):515-9. DOI: 10.5935/1678-9741.20150072.
7. Salameh A, Greimann W, Vondryš D, Kostelka M. Calcification or not. This is the question. A 1-year study of bovine pericardial vascular patches (CardioCel) in minipigs. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2018 Spring;30(1):54-9. DOI: 10.1053/j.semtcvs.2017.09.013
8. Lam NT, Lam H, Sturdivant NM, Balachandran K. Fabrication of a matrigel–collagen semi-interpenetrating scaffold for use in dynamic valve interstitial cell culture. *Biomed Mater*. 2017 Jul 24;12(4):045013. DOI: 10.1088/1748-605X/aa71be

9. Post-market, Prospective Evaluation of PHOTO-oxidized Bovine Pericardium in Vascular Surgery - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. Clinicaltrials.gov. 2022 [cited 2022 June 9]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03669042>

10. Iop L, Palmosi T, Dal Sasso E, Gerosa G. Bioengineered tissue solutions for repair, correction and reconstruction in cardiovascular surgery. *J Thorac Dis.* 2018 Jul;10(Suppl 20):S2390-411. DOI: 10.21037/jtd.2018.04.27

11. Sokol AA, Grekov DA, Yemets GI, Galkin OYu, Shchotkina NV. Biocompatibility analysis of the decellularized bovine pericardium. *Cell Organ Transplantol.* 2020;8(2):112-6. DOI: 10.22494/cot.v8i2.110

12. Hasanain F, Guenther K, Mullett WM, Craven E. Gamma sterilization of pharmaceuticals--a review of the irradiation of excipients, active pharmaceutical ingredients, and final drug product formulations. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2014 Mar-Apr;68(2):113-37. DOI: 10.5731/pdajpst.2014.00955

13. Dearth CL, Keane TJ, Carruthers CA, Reing JE, Huleihel L, Ranallo CA, et al. The effect of terminal sterilization on the material properties and in vivo remodeling of a porcine dermal biologic scaffold. *Acta Biomater.* 2016 Mar;33:78-87. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.01.038

14. Zuki AB, Hafeez YM, Loqman MY, Noordin MM, Norimah Y. Effect of preservation methods on the performance of bovine pericardium graft in a rat model. *Anat Histol Embryol.* 2007 Oct;36(5):349-56. DOI: 10.1111/j.1439-0264.2007.00772.x

15. Шангина ОР, Хасанов РА, Булгакова ЛА. Закономерности изменений структуры лиофилизированных соединительнотканых аллотрансплантатов. *Вестник Оренбургского государственного университета.* 2013;4:299-302.

16. Савельев ВИ, Корнилов НВ. Актуальные проблемы трансплантации тканей. СПб.: МОРСАРАВ; 2001. 152 с.

17. Hacker MC, Krieghoff J, Mikos AG. Synthetic polymers. In: Atala A, editor. Principles of regenerative medicine. 3rd edition. Academic Press; 2018. p. 1428.
18. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1014-7. DOI: 10.1126/science.1067404
19. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(19):3675-83. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014
20. Taylor PM, Cass AEG, Yacoub MH. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering heart valves. *Prog Paediatr Cardiol*. 2006;21(2):219-25. DOI: 10.1016/j.ppedcard.2005.11.010
21. Chlupac J, Filova E, Havlikova J, Matejka R, Riedel T, Houska M, et al. The gene expression of human endothelial cells is modulated by subendothelial extracellular matrix proteins: short-term response to laminar shear stress. *Tissue Eng Part A*. 2014 Aug;20(15-16):2253-64. DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0153
22. d'Ayala GG, Malinconico M, Laurienzo P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules*. 2008 Sep 3;13(9):2069-106. DOI: 10.3390/molecules13092069
23. Chevallay B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput*. 2000 Mar;38(2):211-8. DOI: 10.1007/BF02344779
24. Chung-Welch N, Patton WF, Yen-Patton GP, Hechtman HB, Shepro D. Phenotypic comparison between mesothelial and microvascular endothelial cell lineages using conventional endothelial cell markers, cytoskeletal protein markers and in vitro assays of angiogenic potential. *Differentiation*. 1989 Oct;42(1):44-53. DOI: 10.1111/j.1432-0436.1989.tb00606.x
25. Fan T, Ma X, Zhao J, Wen Q, Hu X, Yu H, et al. Transplantation of tissue-engineered human corneal endothelium in cat models. *Mol Vis*. 2013;19:400-7.

26. Kc P, Hong Y, Zhang G. Cardiac tissue-derived extracellular matrix scaffolds for myocardial repair: advantages and challenges. *Regen Biomater*. 2019; 6(4):185-99. DOI: 10.1093/rb/rbz017

27. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006 Aug;12(8):2117-29. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2117

28. Quintessenza JA, Jacobs JP, Chai PJ, Morell VO, Lindberg H. Polytetrafluoroethylene bicuspid pulmonary valve implantation: experience with 126 patients. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*. 2010 Apr;1(1):20-7. DOI: 10.1177/2150135110361509

29. Quintessenza JA, Jacobs JP, Morell VO, Giroud JM, Boucek RJ. Initial experience with a bicuspid polytetrafluoroethylene pulmonary valve in 41 children and adults: a new option for right ventricular outflow tract reconstruction. *Ann Thorac Surg*. 2005 Mar;79(3):924-31. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2004.05.045

30. Choi KH, Sung SC, Kim H, Lee HD, Kim G, Ko H. Late results of right ventricular outflow tract reconstruction with a bicuspid expanded polytetrafluoroethylene valved conduit. *J Card Surg*. 2018 Jan;33(1):36-40. DOI: 10.1111/jocs.13507

31. Perkasem K, Rothwell PM. Patches of different types for carotid patch angioplasty. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Mar 17;2010(3):CD000071. DOI: 10.1002/14651858.CD000071.

32. Klopsch C, Steinhoff G. Tissue-engineered devices in cardiovascular surgery. *Eur Surg Res*. 2012;49(1):44-52. DOI: 10.1159/000339606

33. Mishra PK, Ashoub A, Salhiyyah K. Role of topical application of gentamicin containing collagen implants in cardiac surgery. *J Cardiothorac Surg*. 2014 Jul 8;9:122. DOI: 10.1186/1749-8090-9-122

34. Weber M, Heta E, Moreira R, Gesche VN, Schermer T, Frese J, et al. Tissue-engineered fibrin-based heart valve with a tubular leaflet design. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Apr;20(4):265-75. DOI: 10.1089/ten.TEC.2013.0258

35. Miriam W, Israel GdT, Ricardo M, et. al. Multiple-step injection molding for fibrin-based tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng. Part C*. 2015;21:832–840.
36. Naficy S, Brown HR, Razal JM, Spinks GM, Whitten PG. Progress toward robust polymer hydrogels. *Aust J Chem*. 2011 Aug;64(8):1007-25. DOI: 10.1071/CH11156
37. Taylor PM. Biological matrices and bionanotechnology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362(1484):1313-20. DOI: 10.1098/rstb.2007.2117
38. Tsai SH, Liu YW, Tang WC, Zhou ZW, Hwang CY, Hwang GY, et al. Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun 15;357(4):984-90. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.04.047
39. Vesely I, Ramamurthi A. Evaluation of the matrix-synthesis potential of crosslinked hyaluronan gels for tissue engineering of aortic heart valves. *Biomaterials*. 2005 Mar;26(9):999-1010. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.016
40. Rhee S, Puetzer JL, Mason BN, Reinhart-King CA, Bonassar LJ. 3D bioprinting of spatially heterogeneous collagen constructs for cartilage tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016 Oct 10;2(10):1800-5. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00288
41. Lim LS, Poh RW, Riau AK, Beuerman RW, Tan D, Mehta JS. Biological and ultrastructural properties of acelagraft, a freeze-dried γ -irradiated human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol*. 2010 Oct;128(10):1303-10. DOI: 10.1001/archophthalmol.2010.222
42. Chen L, Zhu Y, Li Y, Liu Y, Yu J. Progress and prospect of electrospun silk fibroin in construction of tissue-engineering scaffold. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2011;27(6):831-7.
43. Yetkin G, Uludag M, Citgez B, Karakoc S, Polat N, Kabukcuoglu F. Prevention of peritoneal adhesions by intraperitoneal administration of vitamin E

and human amniotic membrane. *Int J Surg.* 2009 Dec;7(6):561-5. DOI: 10.1016/j.ijssu.2009.09.007

44. Jaganathan SK, Supriyanto E, Murugesan S, Balaji A, Asokan MK. Biomaterials in cardiovascular research: applications and clinical implications. *Biomed Res Int.* 2014;2014:459465. DOI: 10.1155/2014/459465

45. Lima Ed, Ferrasi AC, Kaasi A. Decellularization of human pericardium with potential application in regenerative medicine. *Arq Bras Cardiol.* 2019 Jul; 113(1):18-9. DOI: 10.5935/abc.20190130

46. Ma B, Wang X, Wu C, Chang J. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regen Biomater.* 2014 Nov;1(1):81-9. DOI: 10.1093/rb/rbu009

47. Gratzner PF, Harrison RD, Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. *Tissue Eng.* 2006 Oct;12(10):2975-83. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2975

48. De Martino A, Milano AD, Bortolotti U. Use of pericardium for cardiac reconstruction procedures in acquired heart diseases—A comprehensive review. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2021 Jan;69(1):83-91. DOI: 10.1055/s-0039-1697918

49. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Colvin MM, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the Management of Heart Failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation.* 2017;136(6):e137-61. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000509

50. Wilhelm MJ. Long-term outcome following heart transplantation: current perspective. *J Thorac Dis.* 2015;7(3):549-51. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.46

51. Longnus SL, Mathys V, Dornbierer M, Dick F, Carrel TP, Tevæearai HT. Heart transplantation with donation after circulatory determination of death. *Nat Rev Cardiol.* 2014 Jun;11(6):354-63. DOI: 10.1038/nrcardio.2014.45

52. Wang B, Patnaik SS, Brazile B, Butler JR, Claude A, Zhang G, et al. Establishing early functional perfusion and structure in tissue engineered cardiac constructs. *Crit Rev Biomed Eng.* 2015;43(5-6):455-71. DOI: 10.1615/CritRevBiomedEng.2016016066

53. Kaiser NJ, Coulombe KKK. Physiologically inspired cardiac scaffolds for tailored in vivo function and heart regeneration. 2015 May 13;10(3):034003. DOI: 10.1088/1748-6041/10/3/034003

54. Klen R. Harvesting and preserving tissues. Praha: State Publishing House of Medical Literature; 1962. 316 p.

55. Flosdorf EW. Freeze-drying: drying by sublimation. New York: Reinhold Publishing Corporation; 1949. 280 p.

56. Leal BBJ, Wakabayashi N, Oyama K, Kamiya H, Braghirolli DI, Pranke P. Vascular tissue engineering: polymers and methodologies for small caliber vascular grafts. *Front Cardiovasc Med.* 2021 Jan 11;7:592361. DOI: 10.3389/fcvm.2020.592361

57. Olmos-Zúñiga JR, Jasso-Victoria R, Díaz-Martínez NE, Gaxiola-Gaxiola MO, Sotres-Vega A, Heras-Romero Y, et al. Lyophilized allografts without pre-treatment with glutaraldehyde are more suitable than cryopreserved allografts for pulmonary artery reconstruction. *Braz J Med Biol Res.* 2016 Feb;49(2):e5001. DOI: 10.1590/1414-431X20155001

58. Offeddu GS, Ashworth JC, Cameron RE, Oyen ML. Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for tissue engineering applications. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015 Feb;42:19-25. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2014.10.015

59. Aimoli CG, Nogueira GM, Nascimento LS, Baceti A, Leirner AA, Maizato MJ, et al. Lyophilized bovine pericardium treated with a phenethylamine-diepoxyde as an alternative to preventing calcification of cardiovascular bioprosthesis: preliminary calcification results. *Artif Organs.* 2007 Apr;31(4):278-83. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2007.00376.x

60. Nail SL, Jiang S, Chongprasert S, Knopp SA. Fundamentals of freeze-drying. *Pharm Biotechnol* 2002;14:281-360. DOI: 10.1007/978-1-4615-0549-5_6
61. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25(6):1077-86. DOI: 10.1016/s0142-9612(03)00630-6
62. Pikal MJ, Shah S. The collapse temperature in freeze drying: dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase. *Int J Pharm* 1990;62(2-3):165-86. DOI: 10.1016/0378-5173(90)90231-R
63. Renou JP, Bonnet M, Bielicki G, Rochdi A, Gatellier P. NMR study of collagen-water interactions. *Biopolymers*. 1994 Dec;34(12):1615-26. DOI: 10.1002/bip.360341206
64. Buttafoco L, Kolkman NG, Engbers-Buijtenhuijs P, Poot AA, Dijkstra PJ, Vermes I, et al. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2006 Feb;27(5):724-34. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.024
65. Faraj KA, van Kuppevelt TH, Daamen WF. Construction of collagen scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues. *Tissue Eng*. 2007 Oct;13(10):2387-94. DOI: 10.1089/ten.2006.0320
66. Butreddy A, Dudhipala N, Janga KY, Gaddam RP. Lyophilization of small molecule injectables: an industry perspective on formulation development, process optimization, scale-up challenges, and drug product quality attributes. *AAPS PharmSciTech*. 2020 Sep 3;21(7):252. DOI: 10.1208/s12249-020-01787-w
67. Heller MC, Carpenter JF, Randolph TW. Protein formulation and lyophilization cycle design: prevention of damage due to freeze-concentration induced phase separation. *Biotechnol Bioeng*. 1999 Apr 20;63(2):166-74. DOI: 10.1002/(sici)1097-0290(19990420)63:2<166::aid-bit5>3.0.co;2-h
68. Hottot A, Vessot S, Andrieu J. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. *Chem Eng Process Process Intensif*. 2007;46(7):666-74. DOI: 10.1016/j.cep.2006.09.003

69. Singh SN, Kumar S, Bondar V, Wang N, Forcino R, Colandene J, et al. Unexplored benefits of controlled ice nucleation: lyophilization of a highly concentrated monoclonal antibody solution. *Int J Pharm*. 2018 Dec 1;552(1-2):171-9. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.057
70. Petzold G, Aguilera JM. Ice morphology: fundamentals and technological applications in foods. *Food Biophys*. 2009;4:378-96. DOI: 10.1007/s11483-009-9136-5
71. Jastrzebska M, Wrzalik R, Kocot A, Zalewska-Rejdak J, Cwalina BJ. Hydration of glutaraldehyde-fixed pericardium tissue. *J Raman Spectrosc*. 2003;34(6):424-31. DOI: 10.1002/jrs.1016
72. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res*. 2004 Feb;21(2):191-200. DOI: 10.1023/b:pham.0000016234.73023.75
73. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine $T(g)'$ in pharmaceutical lyophilization. *J Pharm Sci*. 2001 Jul;90(7):872-87. DOI: 10.1002/jps.1040
74. Schwegman JJ, Hardwick LM, Akers MJ. Practical formulation and process development of freeze-dried products. *Pharm Dev Technol*. 2005;10(2):151-73. DOI: 10.1081/pdt-56308
75. Kawasaki H, Shimanouchi T, Kimura Y. Recent development of optimization of lyophilization process. *J Chem*. 2019;2019:9502856. DOI: 10.1155/2019/9502856
76. Schneid SC, Gieseler H, Kessler WJ, Luthra SA, Pikal MJ. Optimization of the secondary drying step in freeze drying using TDLAS technology. *AAPS PharmSciTech*. 2011 Mar;12(1):379-87. DOI: 10.1208/s12249-011-9600-7
77. Lim J, Kim NA, Lim DG, Kim KH, Choi D, Jeong S. Process cycle development of freeze drying for therapeutic proteins with stability evaluation. *J Pharm Investig*. 2016;46:519-36. DOI: 10.1007/s40005-016-0275-7

78. Fissore D, Pisano R, Barresi AA. Monitoring of the secondary drying in freeze-drying of pharmaceuticals. *J Pharm Sci*. 2011 Feb;100(2):732-42. DOI: 10.1002/jps.22311

79. Bella J, Eaton M, Brodsky B, Berman HM. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):75-81. DOI: 10.1126/science.7695699

80. Wolkers WF, Oldenhof H. Principles underlying cryopreservation and freeze-drying of cells and tissues. *Methods Mol Biol*. 2021;2180:3-25. DOI: 10.1007/978-1-0716-0783-1_1

81. Polak R, Pitombo RNM. Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: a comparative study. *Cryobiology*. 2011 Oct;63(2):61-6. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.05.001

82. Neuenschwander S, Hoerstrup SP. Heart valve tissue engineering. *Transpl Immunol*. 2004 Apr;12(3-4):359-65. DOI: 10.1016/j.trim.2003.12.010

83. Lopez-Moya M, Melgar-Lesmes P, Kolandaivelu K, de la Torre Hernández JM, Edelman ER, Balcells M. Optimizing glutaraldehyde-fixed tissue heart valves with chondroitin sulfate hydrogel for endothelialization and shielding against deterioration. *Biomacromolecules*. 2018 Apr 9;19(4):1234-44. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00077

84. Moore MA, Bohachevsky IK, Cheung DT, Boyan BD, Chen WM, Bickers RR, et al. Stabilization of pericardial tissue by dye-mediated photooxidation. *J Biomed Mater Res*. 1994 May;28(5):611-8. DOI: 10.1002/jbm.820280511

85. Sokol AA. Biomechanical properties of scaffolds for cardiac repair and regeneration. In: *Proceedings of IX International Conference Medical Physics Current State Issue Development Directions New Technologies*; 2020 Sep 23-25; Kyiv. p. 14852.

86. Maïga A, Vera L, Marchetti C, Lorphelin A, Bellanger L, Mourier G, et al. Crystallization of recombinant green mamba c-Da1a toxin during a lyophilization procedure and its structure determination. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2013 Jun;69(Pt 6):704-9. DOI: 10.1107/S1744309113011470

87. Horn J, Friess W. Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein, and mannitol formulations by optical fibers in lyophilization. *Front Chem.* 2018 Jan 26;6:4. DOI: 10.3389/fchem.2018.00004

88. Cao W, Xie Y, Krishnan S, Lin H, Ricci M. Influence of process conditions on the crystallization and transition of metastable mannitol forms in protein formulations during lyophilization. *Pharm Res.* 2013 Jan;30(1):131-9. DOI: 10.1007/s11095-012-0855-9

89. Connolly BD, Le L, Patapoff TW, Cromwell MEM, Moore JMR, Lam P. Protein aggregation in frozen trehalose formulations: effects of composition, cooling rate, and storage temperature. *J Pharm Sci.* 2015 Dec;104(12):4170-84. DOI: 10.1002/jps.24646

90. Singh SK, Kolhe P, Mehta AP, Chico SC, Lary AL, Huang M. Frozen state storage instability of a monoclonal antibody: aggregation as a consequence of trehalose crystallization and protein unfolding. *Pharm Res.* 2011 Apr;28(4):873-85. DOI: 10.1007/s11095-010-0343-z

91. Pikal-Cleland KA, Rodríguez-Hornedo N, Amidon GL, Carpenter JF. Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric beta-galactosidase. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Dec 15;384(2):398-406. DOI: 10.1006/abbi.2000.2088

92. Van Den Berg L, Rose D. Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions; the reciprocal system $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{-HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$. *Arch Biochem Biophys.* 1959 Apr;81(2):319-29. DOI: 10.1016/0003-9861(59)90209-7

93. Ugwu SO, Apte SP. The effect of buffers on protein conformational stability. *Pharmaceut Technol.* 2004;28:86-108.

94. Galea G. The organization of tissue banking in Scotland. *Scott Med J.* 2012 Nov;57(4):225-31. DOI: 10.1258/smj.2012.012124

95. van Kats JP, van Tricht C, van Dijk A, van der Schans M, van den Bogaerdt A, Petit PL. Microbiological examination of donated human cardiac tissue

in heart valve banking. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 Jan;37(1):163-9. DOI: 10.1016/j.ejcts.2009.07.011

96. Uriarte JJ, Nonaka PN, Campillo N, Palma RK, Melo E, de Oliveira LVF. Mechanical properties of acellular mouse lungs after sterilization by gamma irradiation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014 Dec;40:168-77. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2014.08.017

97. Rosario DJ, Reilly GC, Ali Salah E, Glover M, Bullock AJ, Macneil S. Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract. *Regen Med.* 2008 Mar;3(2):145-56. doi: 10.2217/17460751.3.2.145

98. Akkus O, Rimnac CM. Fracture resistance of gamma radiation sterilized cortical bone allografts. *J Orthop Res.* 2001 Sep;19(5):927-34. DOI: 10.1016/S0736-0266(01)00004-3

99. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials.* 1996 Jan;17(2):93-102. DOI: 10.1016/0142-9612(96)85754-1

100. Fideler BM, Vangsness CT Jr, Lu B, Orlando C, Moore T. Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts. *Am J Sports Med.* 1995 Sep-Oct;23(5):643-6. DOI: 10.1177/036354659502300521

101. Holy CE, Cheng C, Davies JE, Shoichet MS. Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. *Biomaterials.* 2001 Jan;22(1):25-31. DOI: 10.1016/s0142-9612(00)00136-8

102. Munting E, Wilmarth JF, Wijne A, Hennebert P, Delloye C. Effect of sterilization on osteoinduction: comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand.* 1988 Feb;59(1):34-8. DOI: 10.3109/17453678809149340

103. Noah EM, Chen J, Jiao X, Heschel I, Pallua N. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue

engineering. *Biomaterials*. 2002 Jul;23(14):2855-61. DOI: 10.1016/s0142-9612(01)00412-4

104. Somers P, Cuvelier CA, Somer FD, Cornelissen M, Cox E, Verloo M, et al. Gamma radiation alters the ultrastructure in tissue-engineered heart valve scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009 Nov;15(11):3597-604. DOI: 10.1089/ten.TEA.2008.0690

105. Gouk SS, Lim TM, Teoh SH, Sun WQ. Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Jan;84(1):205-17. DOI: 10.1002/jbm.b.30862

106. Matuska AM, McFetridge PS. The effect of terminal sterilization on structural and biophysical properties of a decellularized collagen-based scaffold: implications for stem cell adhesion. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015 Feb;103(2):397-406. DOI: 10.1002/jbm.b.33213

107. Helder M., Hennessy R., Spoon D. Low-dose gamma irradiation of decellularized heart valves results in tissue injury in vitro and in vivo. *Ann Thorac Surg*. 2016;101:667–674.

108. Hussein KH, Park KM, Teotia PK, Hong SH, Yang SR, Park SM, et al. Sterilization using electrolyzed water highly retains the biological properties in tissue-engineered porcine liver scaffold. *Int J Artif Organs*. 2013 Nov;36(11):781-92. DOI: 10.5301/ijao.5000246

109. Stewart M, Bogusz A, Hunter J, Devanny I, Yip B, Reid D, et al. Evaluating use of neutral electrolyzed water for cleaning near-patient surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Dec;35(12):1505-10. DOI: 10.1086/678595

110. Setlow B, Korza G, Blatt KM, Fey JP, Setlow P. Mechanism of *Bacillus subtilis* spore inactivation by and resistance to supercritical CO plus peracetic acid. *J Appl Microbiol*. 2016 Jan;120(1):57-69. DOI: 10.1111/jam.12995

111. Qiu QQ, Leamy P, Brittingham J, Pomerleau J, Kabaria N, Connor J. Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical

carbon dioxide with sterilant. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Nov;91(2):572-8. DOI: 10.1002/jbm.b.31431

112. White A, Burns D, Christensen TW. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *J Biotechnol.* 2006 Jun 10;123(4):504-15. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.033

113. Nichols A, Burns DC, Christopher R. Studies on the sterilization of human bone and tendon musculoskeletal allograft tissue using supercritical carbon dioxide. *J Orthop.* 2009;6(2):e9.

114. Wehmeyer JL, Natesan S, Christy RJ. Development of a sterile amniotic membrane tissue graft using supercritical carbon dioxide. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015 Jul;21(7):649-59. DOI: 10.1089/ten.TEC.2014.0304

115. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. DOI: 10.17226/12910

116. Sokol A. Biotechnological bases of bioimplant production for cardiac surgery [PhD dissertation]. Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute; 2021.

117. Cardiovascular implants: Cardiac valve prostheses. ANSI/AAMI/ISO 5840. Arlington: AAMI; 2005.

118. Hoskins P.R. Introduction to cardiovascular biomechanics. In: Hoskins P, Lawford P, Doyle B, editors. *Cardiovascular biomechanics.* Cham: Springer; 2017. pp. 25-35. DOI: 10.1007/978-3-319-46407-7_2

119. Kodigepalli KM, Thatcher K, West T, Howsmon DP, Schoen FJ, Sacks MS, et al. Biology and biomechanics of the heart valve extracellular matrix. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2020 Dec 16;7(4):57. DOI: 10.3390/jcdd7040057

120. Martin C, Sun W. Biomechanical characterization of aortic valve tissue in humans and common animal models. *J Biomed Mater Res A.* 2012 Jun;100(6):1591-9. DOI: 10.1002/jbm.a.34099

121. Лебедь ИГ, Руденко НН, Бабляк АД, Романюк АН, Емец ИН. Анализ оказания хирургической помощи взрослым с врожденными пороками сердца. *Крымский терапевтический журнал.* 2014;2:112-7.

122. Лебідь ІГ, Разінкіна АО, Сидоренко АЮ, Климишин ЮІ, Романюк ОМ, Лебедь ЄІ, та ін. Комплексне оцінювання якості життя та адаптації до фізичного навантаження у дорослих пацієнтів після операції легеневого аутографта. Вісник серцево-судинної хірургії. 2017;2:56-62.

123. Гур'янов ВГ, Лях ЮЄ, Парій ВД, Короткий ОВ, Чалий ОВ, Чалий КО, та ін. Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R-statistics). Київ: Вістка; 2018. 208 с.

124. Петри А, Сэбин К. Наглядная статистика в медицине. Москва: ГЭОТАР-МЕД; 2003. 144 с.

125. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 2013 Mar;48(3):452-8. DOI: 10.1038/bmt.2012.244

126. Sokol AA, Grekov DA, Yemets GI, Galkin AYU, Shchotkina NV, Dovghaliuk AA, et al. Comparison of bovine pericardium decellularization protocols for production of biomaterial for cardiac surgery. Biopolym Cell. 2020;36(5):392-403. DOI: 10.7124/bc.000A3C

127. Oswal D, Korossis S, Mirsadraee S, Wilcox H, Watterson K, Fisher J, et al. Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. J Heart Valve Dis. 2007 Mar;16(2):165-74.

128. Andrée B, Bela K, Horvath T, Lux M, Ramm R, Venturini L, et al. Successful re-endothelialization of a perfusable biological vascularized matrix (BioVaM) for the generation of 3D artificial cardiac tissue. Basic Res Cardiol. 2014;109(6):441. DOI: 10.1007/s00395-014-0441-x

129. Li N, Li Y, Gong D, Xia C, Liu X, Xu Z. Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2018 May 1;26(5):768-76. DOI: 10.1093/icvts/ivx416

130. Tran HLB, Dihn TH, Nguyen TN, To QM, Pham ATT. Preparation and characterization of acellular porcine pericardium for cardiovascular surgery. Turk J Biol. 2016;40(6):1243-50. DOI: 10.3906/biy-1510-44

131. Nong LM, Zhou D, Zheng D, Jiang YQ, Xu NW, Zhao GY, et al. The effect of different cross-linking conditions of EDC/NHS on type II collagen scaffolds: an in vitro evaluation. *Cell Tissue Bank*. 2019 Dec;20(4):557-568. DOI: 10.1007/s10561-019-09790-7
132. Holzapfel GA, Ogden RW, editors. *Biomechanics of soft tissue in cardiovascular systems*. Vienna: Springer; 2004. 342 p. DOI: 10.1007/978-3-7091-2736-0
133. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater*. 2009 Jan;8(1):15-23. DOI: 10.1038/nmat2344
134. Nazo F. Basics of freeze-drying. In: *Proceedings of International Conference BOC Edwards Pharmaceutical Systems; 2005; Moscow*. p. 2-47.
135. Hottot A, Andrieu J, Vessot S. Sublimation kinetics during freeze-drying of pharmaceutical protein formulation. *Dry Technol*. 2007 Jun;25(5):753-8. DOI: 10.1080/07373930701370126
136. Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9831534. DOI: 10.1155/2017/9831534
137. Xing Q, Yates K, Tahtinen M, Shearier E, Qian Z, Zhao F. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Jan;21(1):77-87. DOI: 10.1089/ten.tec.2013.0666
138. Elder BD, Kim DH, Athanasiou KA. Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement. *Neurosurgery*. 2010 Apr;66(4):722-7. DOI: 10.1227/01.NEU.0000367616.49291.9F.
139. Nazari M, Kurdi M, Heerklotz H. Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order. *Biophys J*. 2012 Feb 8;102(3):498-506. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.029
140. Liu J, Li B, Jing H, Qin Y, Wu Y, Kong D, Leng X, Wang Z. Curcumin-crosslinked acellular bovine pericardium for the application of calcification

inhibition heart valves. *Biomed Mater.* 2020 May 5;15(4):045002. DOI: 10.1088/1748-605X/ab6f46

141. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):213-21. DOI: 10.1038/nm1684

142. Wang B, Borazjani A, Tahai M, Curry AL, Simionescu DT, Guan J, et al. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Sep 15;94(4):1100-10. DOI: 10.1002/jbm.a.32781

143. Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Harasztosi C, et al. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials.* 2010 Mar;31(9):2549-54. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.088

144. Guyette JP, Charest JM, Mills RW, Jank BJ, Moser PT, Gilpin SE, et al. Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix. *Circ Res.* 2016 Jan 8;118(1):56-72. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306874

145. O'Neill JD, Anfang R, Anandappa A, Costa J, Javidfar J, Wobma HM, et al. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann Thorac Surg.* 2013 Sep;96(3):1046-55. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2013.04.022

146. Annual incidence rate: OIE - World Organisation for Animal Health [Internet]. *Web.archive.org.* 2022 [cited 2022 June 9]. Available from: <https://web.archive.org/web/20160325024602/http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/annual-incidence-rate/>

147. Мікрофлора організму тварини [Internet]. *Моя освіта.* 2022 [cited 2022 June 9]. Available from: <https://moyaosvita.com.ua/biologija/mikroflora-organizmu-tvarini/>

148. Amat S, Holman DB, Schmidt K, McCarthy KL, Dorsam ST, Ward AK, et al. Characterization of the microbiota associated with 12-week-old bovine fetuses

- exposed to divergent in utero nutrition. *Front Microbiol.* 2022 Jan 20;12:771832. DOI: 10.3389/fmicb.2021.771832
149. Gadzevych DV, Dunayev YuK, Gorbenko AV, Gadzevych OV, Vovk SI. The species composition of microflora of the gastrointestinal tract of cattle, diseased with enteritis. *Vet Med.* 2012;96:99-102.
150. Tao M, Ao T, Mao X, Yan X, Javed R, Hou W, et al. Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. *Bioact Mater.* 2021 Feb 27;6(9):2927-45. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.02.010
151. Bernhardt A, Wehrl M, Paul B, Hochmuth T, Schumacher M, Schütz K, et al. Improved sterilization of sensitive biomaterials with supercritical carbon dioxide at low temperature. *PLoS One.* 2015 Jun 12;10(6):e0129205. DOI: 10.1371/journal.pone.0129205
152. Nataraj C, Ritter G, Dumas S, Helfer FD, Brunelle J, Sander TW. Extracellular wound matrices: novel stabilization and sterilization method for collagen-based biologic wound dressings. *Wounds.* 2007 Jun;19(6):148-56.
153. Holman DB, Gzyl KE. A meta-analysis of the bovine gastrointestinal tract microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 2019 Jun 1;95(6):fiz072. DOI: 10.1093/femsec/fiz072
154. Zheng Dai, Jennifer Ronholm, Yiping Tian, Benu Sethi, Xudong Cao. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering.* 2016. Volume 7: 1–13. DOI: 10.1177/2041731416648810
155. Duisit J, Maistriaux L, Taddeo A, Orlando G, Joris V, Coche E, et al. Bioengineering a human face graft: the matrix of identity. *Ann Surg.* 2017 Nov;266(5):754-64. DOI: 10.1097/SLA.0000000000002396
156. Nokhbatolfoghahaei H, Paknejad Z, Bohlouli M, Rezai Rad M, Aminishakib P, Derakhshan S, et al. Fabrication of decellularized engineered extracellular matrix through bioreactor-based environment for bone tissue

engineering. ACS Omega. 2020 Dec 2;5(49):31943-56. DOI: 10.1021/acsomega.0c04861

157. Bae JY, Park SY, Shin YH, Choi SW, Kim JK. Preparation of human decellularized peripheral nerve allograft using amphoteric detergent and nuclease. *Neural Regen Res.* 2021 Sep;16(9):1890-96. DOI: 10.4103/1673-5374.306091

158. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011 Apr;32(12):3233-43. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057

159. Garreta E, Oria R, Tarantino C, Pla-Roca M, Prado P, Fernández-Avilés F, et al. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. *Mater Today.* 2017;20(4):166-78. DOI: 10.1016/j.mattod.2016.12.005

160. Padma AM, Alsheikh AB, Song MJ, Akouri R, Akyürek LM, Oltean M, et al. Immune response after allogeneic transplantation of decellularized uterine scaffolds in the rat. *Biomed Mater.* 2021 May 19;16(4). DOI: 10.1088/1748-605X/abfdfe.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА
СТАТТІ У ФАХОВИХ І МІЖНАРОДНИХ ВИДАННЯХ

1. **Shchotkina NV**. Aspects of lyophilization of cardiac bioimplant. Innov Biosyst Bioeng. 2021;5(4):200-6. DOI: 10.20535/ibb.2021.5.4.239725. (входить до міжнародних наукометричних баз даних: DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, аналіз літературних даних, формування висновків і підготовка до друку.*
2. Пономаренко ДІ, Луценко ТМ, Пашук ВВ, **Щоткіна НВ**. Особливості формування технічної документації на медичні вироби, що імплантують. Біомедична інженерія і технологія. 2021;6. DOI: <https://doi.org/10.20535/2617-8974.2021.6.244561> (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, Dimensions, OpenAIRE). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків.*
3. A.A. Sokol, D.A. Grekov G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, **N.V. Shchotkina**, A. A. Dovghaliuk, N.M. Rudenko, I.M. Yemets. The efficiency of decellularization of bovine pericardium of different concentration of sodium dodecyl sulfate. Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2020. – Vol. 4, № 4. – P. 189–198. (Входить до міжнародних баз даних: DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*
4. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Galkin OYu, Yemets GI, Dolinchuk LV, Rudenko NM, Yemets IM. Optimized method of bovine pericardium decellularization for tissue engineering. Wiadomości Lekarskie. 2021 Apr;74(4):815-20. DOI: 10.36740/WLek202104101 (Республіка Польща) (входить до міжнародних наукометричних баз даних: PubMed/Medline, EBSCO, Scopus, Index Copernicus, Polish Medical Library (GBL), Polish Ministry of Science and Higher Education.). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

5. **Shchotkina N**, Sokol A, Dolinchuk L, Skorohod I, Filipov R, Shepeleva O, Rudenko N, Yemets I. Different type of matrix for cardiac implants: biomedical and bioengineering aspects (Review). Cell Organ Transplantol. 2021;9(1):54-58. DOI: 10.22494/cot.v9i1.122 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Scopus, Google scholar, Crossref). *Здобувачем проведени огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*

6. Sokol AA, Grekov DA, Yemets GI, Galkin AYU, **Shchotkina NV**, Dovghaliuk AA, Telehuzova OV, Yemets IM. Comparison of bovine pericardium decellularization protocols for production of biomaterial for cardiac surgery. Biopolymers Cell. 2020;36(5):392-403 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Scopus, SJR, BIOSIS Previews, DOAJ, EBSCO, Medical Journal Links тощо). *Здобувачем проведени огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*

7. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Dolinchuk LV, Galkin OYu, Yemets GI, Grekov DA, Dovghaliuk AA, Skorokhod IM, Shepeleva OV, Rudenko NM, Yemets IM. The Effect of sterilization on the bovine pericardium scaffold decellularized by the glutaraldehyde-free technology. J Biomed Eng Biosci. 2021;8:28-35. DOI: 10.11159/jbeb.2021.004 (входить до міжнародних наукометричних баз даних: Google Scholar, Portico, Crossref, Committee on Publication Ethics (COPE)). *Здобувачем проведени огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ

8. **Shchotkina NV**, Sokol AA, Yemets GI, Galkin OYu, Dolinchuk LV, Dovghaliuk AA, Skorokhod IM, Shepeleva OV, Rudenko NM, Yemets IM. Microarchitectonic of Decellularized Bovine Pericardium Matrix. In: Proceedings of the 7th World Congress on New Technologies (NewTech'21); 2021 Aug; Prague. Paper No. ICBB 167. DOI: 10.11159/icbb21.167. *Здобувачем проведени огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

9. Palamarchuk Y, **Shchotkina N.** Modern tissue engineering of bovine pericardium scaffold for using in cardiac surgery. In: Proceedings of XXII International R&D online conference for students and emerging researchers “Science and Technology of the XXI Century”; 2021 Nov 10; Kyiv. p. 22-3.

Здобувачем проведені огляд літератури, підготовка до друку.

10. **Щоткіна НВ,** Сокол АА, Долінчук ЛВ, Скороход ІМ, Галкін ОЮ. Оптимальні умови стерилізації тканинно модифікованого імпланту на основі перикарду великої рогатої худоби. В: Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених з міжнародною участю “Актуальні питання клінічної медицини”; 2021 лист; Запоріжжя. с. 341-2. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

11. Sokol AA, Grekov DA, Galkin OYu, Yemets GI, **Shchotkina NV,** Yemets IM. Features of manufacture of decellularized scaffolds for use in cardiac surgery. In: Proceedings of V International Scientific Conference on Actual Problem of Biochemistry, Cell Biology and Physiology; 2020 Oct 15-16; Dnipro. p. 121-3.

Здобувачем проведені огляд літератури, підготовка до друку.

Нормативні документи, що були застосовані при формуванні технічних умов виробництва ЛТМБМ

Позначення нормативного документа	Назва нормативного документа
ДСТУ EN ISO 22442-1:2015	Вироби медичні, виготовлені із застосуванням тканин тваринного походження та їх похідних. Частина 1. Управління ризиками.
ДСТУ EN ISO 22442-2:2015	Вироби медичні, виготовлені із застосуванням тканин тваринного походження та їх похідних. Частина 2. Контроль отримання, збирання і обігу.
ДСТУ ISO 15223-1:2015	Засоби медичної техніки, маркування й обов'язкові відомості. Частина 1. Загальні вимоги
ДСТУ ISO 14644-1:2009	Чисті приміщення та пов'язані з ними контрольовані середовища. Частина 1. Класифікація чистоти повітря
ДСТУ ISO 14644-2:2009	Чисті приміщення та пов'язані з ними контрольовані середовища. Частина 2. Вимоги до контролювання й моніторингу для підтвердження відповідності
ДСТУ ISO 14644-4:2022	Чисті приміщення і пов'язані з ними контрольовані середовища. Частина 4. Проектування, будівництво та введення в експлуатацію
ДСТУ EN ISO 11137-1:2018	Стерилізація виробів медичної призначеності. Радіаційна стерилізація. Частина 1. Вимоги до розроблення, валідації та поточного контролю процесу стерилізації медичних виробів
ДСТУ EN ISO 11607-1:2020	Вироби медичні простерилізовані. Пакування. Частина 1. Основні вимоги до матеріалів, стерильних бар'єрних і пакувальних систем
ДСТУ EN ISO 11607-2:2019	Вироби медичні простерилізовані. Пакування. Частина 2. Валідаційні вимоги
ДСТУ EN ISO 10993-3:2018	Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 3. Випробування на генотоксичність, канцерогенність і репродуктивну токсичність

ДСТУ EN ISO 10993-5:2015	Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 5. Випробування на цитотоксичність in vitro.
ДСТУ EN ISO 10993-6:2016	Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 6. Випробування на локальні ефекти після імплантації.
ДСТУ EN ISO 10993-9:2019	Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 9. Основні принципи якісного та кількісного аналізу потенційних продуктів деградації
ДСТУ EN ISO 10993-11:2017	Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 11. Випробування на системну токсичність.
ДСТУ EN ISO 10993-16:2018	Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 16. Побудова токсикокінетичних досліджень продуктів деградації та вилугування.
ДСТУ ISO 14001:2015	Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосування
ДСТУ 4462.3.01:2006	Охорона природи. Поводження з відходами. Порядок здійснення операцій
ДСТУ 4462.3.02:2006	Охорона природи. Поводження з відходами. Пакування, маркування і захоронення відходів. Правила перевезення відходів. Загальні технічні та організаційні вимоги
ДСТУ 7237:2011	Система стандартів безпеки праці. Електробезпека. Загальні вимоги та номенклатура видів захисту
ДСТУ ГОСТ 12.2.061:2009	Система стандартів безпеки праці. Устаткування виробниче. Загальні вимоги безпеки до робочих місць
ДСТУ 7238:2011	Система стандартів безпеки праці. Засоби колективного захисту працюючих. Загальні вимоги та класифікація
ДСТУ 7239:2011	Система стандартів безпеки праці. Засоби індивідуального захисту. Загальні вимоги та класифікація
ISO 534:2011	ISO 534:2011 "Paper and board — Determination of thickness, density and specific volume"

ISO 15394:2017	Packaging — Bar code and two-dimensional symbols for shipping, transport and receiving labels
ISO 22742:2005	Packaging — Linear bar code and two-dimensional symbols for product packaging
ДСТУ 2867-94	Шум. Методи оцінювання виробничого шумового навантаження. Загальні вимоги
Закон України №2736-VI від 02.12.2010 р.	Про загальну безпечність нехарчової продукції
Закон України №1023-XII від 12.05.1991 р.	Про захист прав споживачів
Закон України №187/98-ВР від 05.03.98 р.	Про відходи
Закон України №1393-XIV від 11.06.2003 р.	Про вилучення з обігу, переробку, утилізацію, знищення або подальше використання неякісної та небезпечної продукції
НПАОП 0.00-7.11-12	Загальні вимоги стосовно забезпечення роботодавцями охорони праці працівників
ДБН В.2.2-28:2010	Будинки адміністративного та побутового призначення
НАПБ А.01.001-2014	Правила пожежної безпеки в Україні
ДСН 3.3.6.042-99	Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень
ДБН В.2.5-67:2013	Опалення, вентиляція та кондиціонування
ДСН 3.3.6.037-99	Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку
ДСН 3.3.6.039-99	Державні санітарні норми виробничої загальної та локальної вібрації
ДБН В.2.5-28:2018	Природне і штучне освітлення
СНиП 2.09.02-85	Виробничі будівлі
ДБН В.2.2-28:2010	Будинки адміністративного та побутового призначення
ДБН В.2.5-64:2012	Внутрішній водопровід та каналізація

Розпорядження КМУ №820-р від 8 листопада 2017 р.	Про схвалення Національної стратегії управління відходами в Україні до 2030 року
ДСанПіН 2.2.4-171-10	Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною
Наказ МОЗ України №246 від 21.05.2007 р.	Про затвердження Порядку проведення медичних оглядів працівників певних категорій
Наказ МОЗ України №145 від 17.03.2011 р.	Про затвердження Державних санітарних норм та правил утримання територій населених місць
Постанова КМУ №50 від 24.01. 2001 р.	Загальні вимоги до здійснення переробки, утилізації, знищення або подальшого використання вилученої з обігу неякісної та небезпечної продукції

ДОДАТОК 3

Результати експертної оцінки робочої групи щодо визначення категорії ризику виробничого процесу отримання біоімплантів відповідно до розробленої матриці класифікації

Ризик R1. Підготовка виробництва: підготовка персоналу, дезінфекційних і мийних розчинів, лабораторного обладнання, посуду, виробничих приміщень, води та повітря відносяться до основних допоміжних стадій виробництва, тому неякісна початкова підготовка, тобто недотримання правил підготовки, може призвести до мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R2. Підготовка розчинів для обробки біотканини: на цьому етапі ризику можуть бути пов'язані з неправильним дозуванням необхідних речовин, недотриманням інструкції з приготування певного розчину, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R3. Забір матеріалу та його транспортування: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з неправильним забором матеріалу та недотриманням умов перевезення матеріалу, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію, а також недоцільність застосування матеріалу в подальшій роботі.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R4. Підготовка матеріалу до роботи: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з недотриманням правил технології при підготовці матеріалу та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R5. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені неправильним приготуванням розчинів обробки тканини на стадії допоміжної роботи, недотриманням заданих умов проведення обробки та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R6. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені недотриманням режиму ліофілізації.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R7. Фасування та маркування готового біоімпланта: на цьому етапі ризики можуть стосуватися невідповідності маркування або переплутування зразків у блістерах.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R8. Стерилізація: ризик може бути зумовлений подачею підвищеної дози опромінення, яка не прописана в інструкції.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R9. Пакування, відвантаження готової продукції: ризики на цьому етапі пов'язані з недокомплектуванням готового виробу та переплутуванням етикетки.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Експерт:

Начальник медичного відділу



Геннадій Сметюхов

ДОДАТОК 4

Результати експертної оцінки робочої групи щодо визначення категорії ризику виробничого процесу отримання біоімплантів відповідно до розробленої матриці класифікації

Ризик R1. Підготовка виробництва: підготовка персоналу, дезінфекційних і мийних розчинів, лабораторного обладнання, посуду, виробничих приміщень, води та повітря відносяться до основних допоміжних стадій виробництва, тому неякісна початкова підготовка, тобто недотримання правил підготовки, може призвести до мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R2. Підготовка розчинів для обробки біотканини: на цьому етапі ризику можуть бути пов'язані з неправильним дозуванням необхідних речовин, недотриманням інструкції з приготування певного розчину, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R3. Забір матеріалу та його транспортування: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з неправильним забором матеріалу та недотриманням умов перевезення матеріалу, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію, а також недоцільність застосування матеріалу в подальшій роботі.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R4. Підготовка матеріалу до роботи: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з недотриманням правил технології при підготовці матеріалу та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R5. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені неправильним приготуванням розчинів обробки тканини на стадії допоміжної роботи, недотриманням заданих умов проведення обробки та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R6. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені недотриманням режиму ліофілізації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R7. Фасування та маркування готового біоімпланта: на цьому етапі ризики можуть стосуватися невідповідності маркування або переплутування зразків у блистерах.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R8. Стерилізація: ризик може бути зумовлений подачею підвищеної дози опромінення, яка не прописана в інструкції.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R9. Пакування, відвантаження готової продукції: ризики на цьому етапі пов'язані з недокомплектуванням готового виробу та переплутуванням етикетки.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Експерт:

Інженер медичного відділу



Валентин Дембицький

ДОДАТОК 5

Результати експертної оцінки робочої групи щодо визначення категорії ризику виробничого процесу отримання біоімплантів відповідно до розробленої матриці класифікації

Ризик R1. Підготовка виробництва: підготовка персоналу, дезінфекційних і мийних розчинів, лабораторного обладнання, посуду, виробничих приміщень, води та повітря відносяться до основних допоміжних стадій виробництва, тому неякісна початкова підготовка, тобто недотримання правил підготовки, може призвести до мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність / Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R2. Підготовка розчинів для обробки біотканини: на цьому етапі ризику можуть бути пов'язані з неправильним дозуванням необхідних речовин, недотриманням інструкції з приготування певного розчину, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію.

Вірогідність / Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R3. Забір матеріалу та його транспортування: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з неправильним забором матеріалу та недотриманням умов перевезення матеріалу, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію, а також нецільність застосування матеріалу в подальшій роботі.

Вірогідність / Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R4. Підготовка матеріалу до роботи: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з недотриманням правил технології при підготовці матеріалу та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність / Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R5. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені неправильним приготуванням розчинів обробки тканини на стадії допоміжної роботи, недотриманням заданих умов проведення обробки та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R6. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені недотриманням режиму ліофілізації.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R7. Фасування та маркування готового біоімпланта: на цьому етапі ризики можуть стосуватися невідповідності маркування або переплутування зразків у блистерах.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R8. Стерилізація: ризик може бути зумовлений подачею підвищеної дози опромінення, яка не прописана в інструкції.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R9. Пакування, відвантаження готової продукції: ризики на цьому етапі пов'язані з недокомплектуванням готового виробу та переплутуванням етикетки.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Експерт:

В.о. заст. директора з якості



Юлія Паламарчук

ДОДАТОК 6

Результати експертної оцінки робочої групи щодо визначення категорії ризику виробничого процесу отримання біоімплантів відповідно до розробленої матриці класифікації

Ризик R1. Підготовка виробництва: підготовка персоналу, дезінфекційних і мийних розчинів, лабораторного обладнання, посуду, виробничих приміщень, води та повітря відносяться до основних допоміжних стадій виробництва, тому неякісна початкова підготовка, тобто недотримання правил підготовки, може призвести до мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність / Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R2. Підготовка розчинів для обробки біотканини: на цьому етапі ризику можуть бути пов'язані з неправильним дозуванням необхідних речовин, недотриманням інструкції з приготування певного розчину, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію.

Вірогідність / Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R3. Забір матеріалу та його транспортування: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з неправильним забором матеріалу та недотриманням умов перевезення матеріалу, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію, а також недоцільність застосування матеріалу в подальшій роботі.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R4. Підготовка матеріалу до роботи: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з недотриманням правил технології при підготовці матеріалу та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R5. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені неправильним приготуванням розчинів обробки тканини на стадії допоміжної роботи, недотриманням заданих умов проведення обробки та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R6. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені недотриманням режиму ліофілізації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R7. Фасування та маркування готового біоімпланта: на цьому етапі ризики можуть стосуватися невідповідності маркування або переплутування зразків у блистерах.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R8. Стерилізація: ризик може бути зумовлений подачею підвищеної дози опромінення, яка не прописана в інструкції.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R9. Пакування, відвантаження готової продукції: ризики на цьому етапі пов'язані з недокомплектуванням готового виробу та переплутуванням етикетки.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Експерт:

Технік – технолог

Наталія Безверха

**Результати експертної оцінки робочої групи щодо визначення категорії
ризиків виробничого процесу отримання біоімплантів відповідно до
розробленої матриці класифікації**

Ризик R1. Підготовка виробництва: підготовка персоналу, дезінфекційних і мийних розчинів, лабораторного обладнання, посуду, виробничих приміщень, води та повітря відносяться до основних допоміжних стадій виробництва, тому неякісна початкова підготовка, тобто недотримання правил підготовки, може призвести до мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R2. Підготовка розчинів для обробки біотканини: на цьому етапі ризику можуть бути пов'язані з неправильним дозуванням необхідних речовин, недотриманням інструкції з приготування певного розчину, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R3. Забір матеріалу та його транспортування: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з неправильним забором матеріалу та недотриманням умов перевезення матеріалу, що може спричинити мікробну та/або хімічну контамінацію, а також недоцільність застосування матеріалу в подальшій роботі.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R4. Підготовка матеріалу до роботи: на цьому етапі ризики можуть бути пов'язані з недотриманням правил технології при підготовці матеріалу та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R5. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені неправильним приготуванням розчинів обробки тканини на стадії допоміжної роботи, недотриманням заданих умов проведення обробки та появою мікробної та/або хімічної контамінації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R6. Обробка біотканини: ризики цього етапу можуть бути зумовлені недотриманням режиму ліофілізації.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R7. Фасування та маркування готового біоімпланта: на цьому етапі ризики можуть стосуватися невідповідності маркування або переплутування зразків у блістерах.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R8. Стерилізація: ризик може бути зумовлений подачею підвищеної дози опромінення, яка не прописана в інструкції.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Ризик R9. Пакування, відвантаження готової продукції: ризики на цьому етапі пов'язані з недокомплектуванням готового виробу та переплутуванням етикетки.

Вірогідність \ Серйозність наслідків	Мінімальна 1	Низька 2	Помірна 3	Висока 4
Мінімальна 1	1	2	3	4
Низька 2	2	4	6	8
Помірна 3	3	6	9	12
Висока 4	4	8	12	16

Експерт:

Технік – технолог, лікар – хірург



Богдан Серденко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. першого проректора
Національного технічного університету
України «Київський політехнічний
Інститут імені Ігоря Сікорського»



Олексій ЖУЧЕНКО
2022 р.

ДОВІДКА ПРО ВИКОРИСТАННЯ

результатів дисертаційної роботи Щоткіної Наталії Володимирівни
«Біоінженерні основи отримання ліофілізованого тканиномодифікованого
біосумісного матриксу для використання у кардіохірургії»
у навчальному процесі кафедри трансляційної медичної біоінженерії
Національного технічного університету України
«Київський політехнічний Інститут імені Ігоря Сікорського»

Ми, що нижче підписалися, комісія у складі: завідувач кафедри трансляційної медичної біоінженерії, д.б.н., проф. Галкін О.Ю., доцент кафедри трансляційної медичної біоінженерії, к.б.н., с.н.с. Беспалова О.Я., доцент кафедри трансляційної медичної біоінженерії, к.т.н. Бесараб О.Б., склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Щоткіної Наталії Володимирівни «Біоінженерні основи отримання ліофілізованого тканиномодифікованого біосумісного матриксу для використання у кардіохірургії» у навчальному процесі кафедри трансляційної медичної біоінженерії, а саме: результати роботи враховано при розробленні навчальних програм (силабусів) та впроваджено з 2021/22 н.р. у викладання дисциплін «Біоматеріали і біотехнології» та «Клітинна, тканинна та біофармацевтична інженерія» для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності 163 Біомедична інженерія.

Зав. каф. ТМБ, д.б.н., проф.

Олександр ГАЛКІН

Доц. каф. ТМБ, к.б.н., с.н.с.

Олена БЕСПАЛОВА

Доц. каф. ТМБ, к.т.н.

Олександр БЕСАРАБ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

Товариство з обмеженою
відповідальністю «ІКСПАНД», к.б.н.Ірина СКОРОХОД
2023 р.**ДОВІДКА ПРО ВИКОРИСТАННЯ**

результатів дисертаційної роботи Щоткіної Наталії Володимирівни «Біоінженерні основи отримання ліофілізованого тканиномодифікованого біосумісного матриксу для використання у кардіохірургії» у виробничому процесі товариства з обмеженою відповідальністю «ІКСПАНД»

Ми, ті що нижче підписалися, комісія у складі: директора ТОВ «ІКСПАНД», к.б.н., Скороход І.М., заступника директора з якості Дубініної О.О. склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Щоткіної Наталії Володимирівни «Біоінженерні основи отримання ліофілізованого тканиномодифікованого біосумісного матриксу для використання у кардіохірургії» у виробничому процесі Товариства з обмеженою відповідальністю «ІКСПАНД». Було розроблено та впроваджено нову оптимізовану біоінженерну схему виробництва ліофілізованого тканиномодифікованого біосумісного матриксу для використання у кардіохірургії. Результати дисертаційної роботи використано для проведення доклінічних досліджень та буде частково використано для розробки технічного файлу на медичний виріб для представлення органам сертифікації.

Дир. ТОВ «ІКСПАНД», к.б.н.

Заст. дир. з якості



Ірина СКОРОХОД

Ольга ДУБІНІНА