

УДК 547.962.9:576.3-089.197.2:539.4

А.Г. Попандопуло¹, М.В. Савчук^{1*}, Д.Л. Юдицкий²

Изменение упругопрочностных показателей экстрацеллюлярного матрикса после децеллюлярной обработки

UDC 547.962.9:576.3-089.197.2:539.4

A.G. Popandopulo¹, M.V. Savchuk^{1*}, D.L. Yuditsky²

Change in Strain-Strength Indices of Extracellular Matrix After Its Decellularization

Реферат: Ткане-инженерные графты клапанов являются современным решением медицинской проблемы протезирования и способны стать полноценной заменой механическим клапанным протезам. Такие протезы основаны на использовании децеллюляризованного соединительнотканного матрикса. Целью данной работы было получение экстрацеллюлярного матрикса, близкого к нативному по морфологическим и физическим свойствам, после децеллюляризации для создания клапанно-сосудистого биологического графта. Физические и механические качества матрикса анализировали с помощью специального оборудования, способного имитировать кровяное давление в сосуде. Результаты исследований показали, что упругость и эластичность ткани сохранены и, следовательно, матрикс может быть использован в качестве каркаса для протеза.

Ключевые слова: тканевая инженерия, графт, децеллюляризация, экстрацеллюлярный матрикс, прочность.

Реферат: Тканинно-інженерні графти клапанів є сучасним рішенням медичної проблеми та здатні замінити механічні клапанні протези. Такі протези ґрунтуються на використанні децелюляризованого матриксу сполучної тканини. Метою даної роботи було отримання екстрацелюлярного матриксу, близького до нативного за морфологічними та фізичними якостями, для створення клапанно-судинного біологічного графту. Фізичні та механічні властивості аналізували за допомогою спеціального обладнання, яке здатне імітувати кров'яний тиск у судині. Результати дослідження показали, що пружність та еластичність тканини збережено й, таким чином, матрикс може бути використано у якості каркасу для протезу.

Ключові слова: тканинна інженерія, графт, децелюляризація, екстрацелюлярний матрикс, міцність.

Abstract: Tissue-engineered grafts of valves are current solution of prostheses medical problem and able of proper substituting the mechanical valvular prostheses. These prostheses are based on using decellularized connective tissue matrix. The research was aimed to design extracellular matrix close to native on morphological and physical properties after decellularization to create valvular-vascular biological graft. The research results demonstrated that the tissue strain and strength were preserved and therefore the matrix could be used as a scaffold for prostheses.

Key words: tissue engineering, graft, decellularization, extracellular matrix, strength.

Значительную часть заменителей сердечных клапанов, применяемых в настоящее время кардиохирургами, составляют ткане-инженерные протезы биологического происхождения (аортальный клапан свиньи, бычий перикард). Создание клапана с помощью тканевой инженерии сопряжено с изучением его структуры и функциональных особенностей. Клапан состоит из специализированных клеток и экстрацеллюлярного матрикса, образующего своеобразный каркас [11]. Для создания универсального клапанного заменителя аллогенного или ксеногенного происхождения используют лишенный живых клеток (децеллюлярный) соединительнотканый матрикс, который является трехмерной матрицей будущего протеза.

The most heart valves substitutes, currently applied in cardiac surgery are the tissue-engineered prostheses of biological origin (porcine aortic valve, bovine pericardium). Designing the tissue-engineered valve is associated to a profound study of its structure and functional peculiarities. The valve consists of specialized cells and extracellular matrix, forming a kind of scaffold [6]. To design a universal valve substitute of either allogeneic or xenogeneic origins one uses the connective tissue matrix, deprived of living cells (decellularized), representing 3D matrix of future prosthesis.

All the fibres and cells of connective tissue are enclosed into an amorphous component or basic substance: gel-like one, which is a metabolic integrative-buffered multicomponent medium, surrounding cellular

¹ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака», НАМН Украины, г. Донецк

²Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: пр-т Ленинский, 47, г. Донецк 83045
тел.: (+38 062) 385-76-87
электронная почта: pmv-07@yandex.ru

¹V.K. Gusak Institute of Urgent and Reconstructive Surgery of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Donetsk, Ukraine

²M. Gorky Donetsk National Medical University, Donetsk, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
47, Leninsky prospekt, Donetsk, Ukraine 83045
tel.: (+38 062) 385-76-87
e-mail: pmv-07@yandex.ru

Все волокна и клетки соединительной ткани заключены в аморфный компонент или основное вещество – гелеобразную субстанцию, представляющую собой метаболическую интегративно-буферную многокомпонентную среду, которая окружает клеточные и волокнистые структуры соединительной ткани, нервные и сосудистые элементы [15]. Основу межклеточного матрикса составляют белковые молекулы, в том числе относящиеся к разряду белков структурного типа, – коллаген и эластин [2].

Коллаген – основной структурный фибриллярный белок межклеточного матрикса в организме человека, который составляет 25–33% от общего количества белка, т.е. порядка 6% массы тела. Коллаген синтезируется на рибосомах гранулярной эндоплазматической сети соединительнотканых и других типов клеток [13].

Коллагеновые волокна в рыхлой соединительной ткани, которая составляет основу межклеточного матрикса сосудистой стенки, расположены в разных направлениях в виде изогнутых, спиралевидных, округлых или уплощенных тяжей разной длины и толщины (1–3 мкм и более), внутренняя структура которых определяется коллагеном [4]. Одним из важных свойств коллагеновых волокон является механическая прочность [20]. Например, интерстиций миокарда состоит из сети коллагеновых волокон преимущественно I и II типов. Механическая прочность мышцы сердца определяется коллагеном I типа (80% от общего количества коллагена миокарда), а эластичность – коллагеном III типа (10%), коллаген II, IV–VI типов в норме представлен в незначительном количестве [19]. Способность же соединительнотканых структур восстанавливать форму после механического воздействия обеспечивается сетью эластических волокон, основу которых составляет белки семейства эластина [18].

Эластин – гидрофильный белок, который синтезируется фибробластами и гладкими мышечными клетками, содержит около 750 аминокислот. Для него характерно наличие двух производных аминокислот – десмозина и изодесмозина, участвующих в стабилизации его молекулярной структуры и обеспечивающих способность к растяжению и эластичности [4, 6, 10]. Эластические волокна по прочности уступают коллагеновым. В рыхлой волокнистой соединительной ткани они анастомозируют друг с другом. Толщина эластических волокон обычно меньше коллагеновых (до 1 мкм). В их составе различают микрофибриллярный и аморфный компоненты. Основу зрелых эластических волокон составляет аморфный компонент эластических белков, а их периферия представлена микрофибриллами. В отличие от коллагеновых эластические

and fibrous structures of connective tissue, nerve and vascular elements [12]. The basis of intercellular matrix is formed by protein molecules, including those referred to structural proteins: collagen and elastin [17].

Collagen is the main structural fibrillar protein of intercellular matrix in human body, making from 25 to 33% of total protein amount, *i.e.* about 6% of body weight. Collagen is synthesized in ribosomes of granular endoplasmic reticulum of connective tissue and other cell types [10].

Collagen fibres in a loose connective tissue, forming the basis of intercellular matrix of vascular wall, are located in different directions in the form of curved, spiral, round or flattened strands of various length and thickness (1–3 μm and more), an internal structure of which is collagen determined [8]. One of the important properties of collagen fibres is a mechanical strength [19]. For example, a myocardial interstitium consists of a network of collagen fibres mostly of types I and II. Mechanical strength of cardiac muscle is determined by collagen type I (80% of total amount of myocardial collagen) and the elasticity is done by collagen type III (10%), collagen types II, IV–VI is normally represented by a small amount [18]. The capability of connective tissue structures to recover the shape after mechanical impact is provided by elastic fibre network, which basis is formed by elastin family proteins [16].

Elastin is a hydrophilic protein, synthesized by fibroblasts and smooth muscle cells, and contains about 750 amino acids. It is characterized by the presence of two amino acid derivatives such as: desmosine and isodesmosine, involved in stabilizing its molecular structure, and providing the capability to strain and elasticity [5, 8, 14]. Elastic fibres are inferior in strength to collagen ones. In a loose fibrous connective tissue they anastomose broadly with each other. The thickness of elastic fibres is usually less than in collagen ones (up to 1 μm). In their composition one distinguishes microfibrillar and amorphous components. An amorphous component of elastic fibres forms the basis (90%) of mature elastic proteins, and their periphery is represented by microfibrilles. In contrast to collagen fibres the elastic ones contain no transversally striated structures [8].

An extracellular matrix is essential for development and maintenance of homeostasis. As a result of heart beats of about 40 million times per year its shape and size change, wherein the leaflets and maintaining valve structures are subjected to loading [4]. Thus, the tissue-engineered valve should be adapted to deformation and have an optimal flexibility and strength. For this purpose a necessary condition is to preserve a matrix structure by graft, as well as specific biochemical and physical-mechanical parameters, allowing to provide the similarity of its structure and function with natural valve or vessel [11, 23].



волокна не содержат структур с поперечной исчерченностью [4].

Экстрацеллюлярный матрикс необходим для развития и поддержания гомеостаза. В результате сокращения сердца (около 40 млн раз в год) изменяется его форма и размер, при этом нагрузку испытывают створки и поддерживающие клапан структуры [3]. Таким образом, ткане-инженерный клапан должен адаптироваться к деформации и обладать оптимальной гибкостью и прочностью. Необходимым условием этого является сохранение трансплантатом матричной структуры, а также специфических биохимических и физико-механических параметров, что позволит обеспечить сходство его структуры и функции с естественным клапаном или сосудом [14, 23].

Трансплантат необходим для поддержания структуры и трехмерной формы определенного органа, при этом он является динамическим соединением с резидентной клеточной популяцией [12, 17, 22], что определяет тип формируемой на его основе ткани, активность в ней клеточной пролиферации и т. д. Таким образом, децеллюлярный матричный скаффолд (точная трехмерная модель замещаемого органа) способен к поддержанию и стимуляции соответствующего клеточного фенотипа в процессе репопуляции через презентацию лигандов и биологически активных молекул, необходимых резидентным и мигрирующим клеткам для самоорганизации в функциональные группы, а также для формирования нормальной структуры и работы данного органа [7, 8, 16, 21].

При разработке биологических кардиоваскулярных графтов следует учитывать возможности их последующего долгосрочного хранения. Общеизвестным и наиболее оптимальным условием является хранение биопротезов в специализированных низкотемпературных банках. Успешное решение проблемы децеллюляризации на доклиническом этапе позволит перейти к созданию низкотемпературного банка децеллюлярных биологических протезов, готовых к клиническому применению [5].

Цель настоящей работы – изучить возможность применения экстрацеллюлярного каркаса после децеллюляризации в условиях *in vivo*.

Материалы и методы

Физико-механические свойства матрикса исследовали на специально сконструированной установке для измерения прочности и эластичности сосудистой стенки внутренним давлением (рис. 1.) [1].

Испытываемый клапан (графт) крепили на ниппеле диаметром, соответствующим диаметру имплантата, при этом края сосуда плотно фиксировали нитью (рис. 2). Воздух с малой скоростью

The graft is needed to maintain the structure and 3D shape of a certain organ, herewith it is a dynamic compound with a resident cell population [7, 15, 22], determining the type of tissue, formed on its basis, the activity of cell proliferation in it, *etc.* Thus, a decellularized matrix scaffold (exact 3D model of substituted organ) is capable to maintain and stimulate the corresponding cell phenotype during repopulation through the presentation of ligands and biologically active molecules needed for resident and migrating cells to self-organization into functional groups, as well as to form a normal structure and function of this organ [21, 2, 13, 20].

When designing biological cardiovascular grafts one should consider the possibilities of their subsequent long-term storage. The establishment of specialized low temperature banks is the recognized and the most optimal method for long-term storage of bioprotheses. A successful solution of decellularization task at a preclinical stage will advance the establishment of low-temperature bank for decellularized biological prostheses, ready for clinical application [14].

The research aim was to study the possible application of extracellular carcass after *in vivo* decellularization.

Materials and methods

Physico-mechanical properties of the matrix was tested with a specially designed device for measuring the strain and strength of the vascular wall by means of internal pressure (Fig. 1) [1].

The tested valve (graft) was fixed on the nipple with a diameter corresponding to the one of implant, herewith the vessel edges were firmly fixed with a thread (Fig. 2). Air was at a low speed injected into the vessel lumen with a gradual increase of pressure

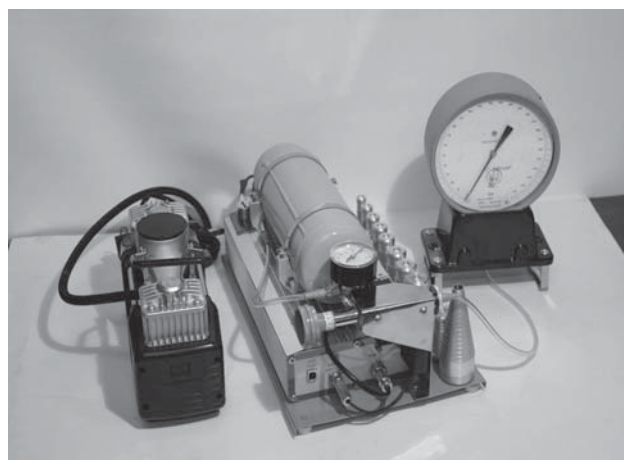


Рис. 1. Установка для измерения прочности и эластичности сосудистой стенки внутренним давлением.

Fig. 1. Device for measuring strain and strength of vascular wall by internal pressure.



нагнетали в просвет сосуда с постепенным повышением давления до момента разрыва сосудистой стенки. В соответствии со значением давления, которое регистрировали с помощью блока аналого-цифрового преобразователя, на экране персонального компьютера строили диаграмму, отображающую процесс разрыва сосуда в координатах «давление/время». Результаты испытаний позволяют установить степень сохранности внеклеточного матрикса графтов, прошедших децеллюлярную обработку, и их упругопрочностные свойства для безопасного применения в условиях *in vivo*.

Объектом данного исследования были сердечные клапаны 3–5-месячных свиней массой 50–70 кг. Сердечные клапаны после децеллюляризации в растворе 10 мМ ЭДТА («Sigma», США) в течение 2 суток составили опытную группу. Контролем служили нативные ксеногенные клапаны. Экспериментальный биоматериал выделяли в стерильных условиях в период до 4 часов после забора сердца. Сердца от места забора до места выделения из них клапанов транспортировали при температуре 4°C в контейнерах, заполненных питательной средой, содержащей пенициллин (2500 ед/мл) и стрептомицин (2,5 мг/мл). Выборка для каждой из групп составила 7 графтов.

Манипуляции с животными выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Для статистического анализа данных по исследованию упругопрочностных свойств графтов после децеллюляризации использовали пакет «MedStat 3.0». Анализ основывался на расчете непараметрического критерия Манна-Уитни, по которому определяли медиану максимальных значений давления в момент разрывов сосудов при исследовании физических свойств аортальной стенки и стенки легочной артерии в опытной и контрольной группах.

Результаты и обсуждение

Исследование упругопрочностных свойств графтов, прошедших этап децеллюляризации, на установке для измерения прочности и эластичности сосудистой стенки внутренним давлением показало, что физико-механические свойства эндоделлюлярного матрикса обработанных образцов остаются на уровне нативных.

Согласно результатам анализа стенка аорты после воздействия раствором ЭДТА по описанной

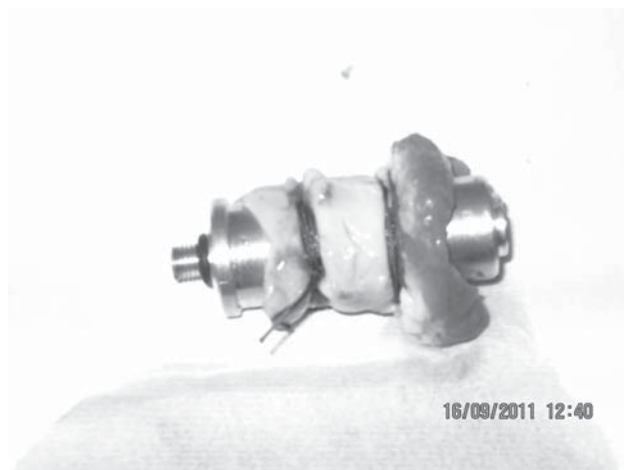


Рис. 2. Пример крепления испытываемого клапана (графта) на ниппеле во время исследования.

Fig. 2. Example of adjusting the tested valve (graft) by means of nipple during the study.

up to the moment of a vascular wall rupture. In accordance with the value of a pressure, recorded using the unit of analogue-to-digital converter on the computer screen there was composed a chart, reflecting the process of rupture in pressure vs time coordinates. The test results allow us to establish the preservation rate of extracellular matrix grafts, which underwent decellularization and their elastic strength properties to be safely applied *in vivo*.

The research objects were heart valves of 3–5-month-old pigs weighing 50–70 kg. Experimental group comprised the heart valves after decellularization in 10 mM EDTA solution (Sigma, USA) for 2 days. The control group consisted of native xenogenous valves. Experimental biomaterial was isolated under sterile conditions within 4 hours after the heart retrieval. The hearts from the place of retrieval to the one of isolation from them of the valves were transported at 4°C in the container filled with a nutrient medium containing penicillin (2,500 U/ml) and streptomycin (2.5 mg/ml). The sampling for each groups made 7 grafts.

Manipulations with the animals were performed in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress for Bioethics (Kiev, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The data on studying the strain and strength properties of grafts after decellularization were statistically analyzed using the MedStat 3.0 software. The analysis was based on the calculation of the non-parametric Mann-Whitney test according to which there was determined the median maximum pressures at the moment of the vessels rupture when studying the



выше схеме выдерживает давление 115–120 КПа (863–885 мм рт. ст.), а стенка контрольного (интактного) образца – 160–200 КПа (1200–1500 мм рт. ст.).

Стенка аорты предсказуемо прочнее и выдерживает большее давление на разрыв по сравнению с артериальной. Так, стенка легочной артерии опытного образца, подвергавшегося воздействию децеллюлирующего раствора, до разрыва выдерживала давление в 40–44 КПа (300–330 мм рт. ст.), а стенка интактного (контрольного) сосуда во время исследования прочностных характеристик легочной артерии разрывалась при нагнетании давления 75–78 КПа (562–585 мм рт. ст.).

Представленные на диаграмме (рис. 3) данные испытаний сосудистой стенки на прочность являются «нормой», т. е. сосуд не подвергался децеллюляризации, аортальная стенка выдерживала давление в 160 КПа (1200 мм. рт. ст.).

По результатам статистического анализа медиана для опытной группы аортальных графтов составила 115,8 КПа, а медиана максимально выдерживаемого давления в контрольной группе – 185,3 КПа. В исследованиях упругопрочностных свойств стенки легочной артерии показатели медианы были равны 42,6 и 76,2 КПа для опытной и контрольной групп соответственно. Результаты исследований полученных графтов обоих типов демонстрируют статистически значимые различия между опытом и контролем ($p = 0,0006$).

Графическое изображение данных статистического анализа упругопрочностных показателей

physical properties of aortic wall and the one of pulmonary artery in the experimental and control groups.

Results and discussion

Investigation of strain-strength properties of the decellularized grafts at the assembly for measuring the strength and elasticity of the vascular wall by internal pressure showed that physical and mechanical properties of endocellular matrix of the treated samples remained at the level of native ones.

According to the analysis results the aortic walls after exposure to EDTA solution according to the above mentioned protocol can withstand the pressure of 115-120 kPa (863–885 mm of mercury), and the wall of the control (intact) sample can do 160–200 kPa (1,200–1,500 mm of mercury).

The aorta wall is predictably durable and can withstand higher burst pressure if compared with arterial one. Thus, the pulmonary artery wall of experimental sample exposed to decellularization solution effect up to the rupture withstood a pressure of 40–44 kPa (300–330 mm of mercury), and the wall of intact (control) vessel during studying the strength characteristics of pulmonary artery was ruptured when injecting the pressure of about 75–78 kPa (562–585 mm of mercury).

The shown in diagram (Fig. 3) data of the strength trials of vascular wall are the 'norm', i. e. the vessel was not subjected to decellularization, herewith the aortic wall withstood the pressure of 160 kPa (1,200 mm of mercury).

On the results of statistic analysis the median for experimental group of aortal grafts made 115.8 kPa, and the one of the maximal pressure held in the control group made 185.3 kPa. In the studies of elastic strength properties of pulmonary artery wall the median indices equalled 42.6 and 76.2 kPa for experimental and control groups correspondingly. The results of studies of these two types of grafts demonstrate statistically significant differences between the experimental and control groups ($p = 0.0006$).

Statistical analysis of strain-strength parameters for aortic xenogenous grafts and those of pulmonary artery is represented in Fig. 4 diagrams.

It is important to note that the time interval from the beginning of vascular wall stretching up to its rupture (which correlates with its elasticity) in decellularized grafts is longer if compared to those in the control samples (Fig. 5).

Collagen is the main strain resistant matrix component [2, 3, 12]. Individual collagen fibres endure strong deformation, but herewith they are not subjected to compression in contrast to elastin fibres which are able of stretching and contracting. So, the change in the dimensions and shape of the valve leaflets through-

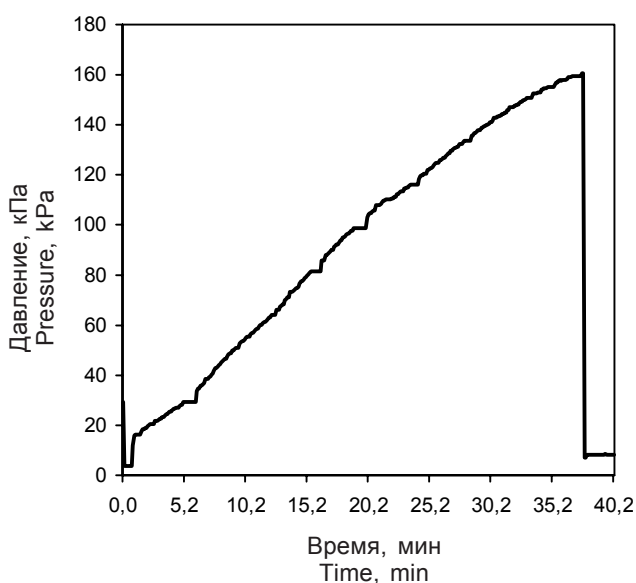


Рис. 3. Графическое отображение данных испытания сосудистой стенки на прочность.

Fig. 3. Strenght diagram of the data of trials of vascular wall.



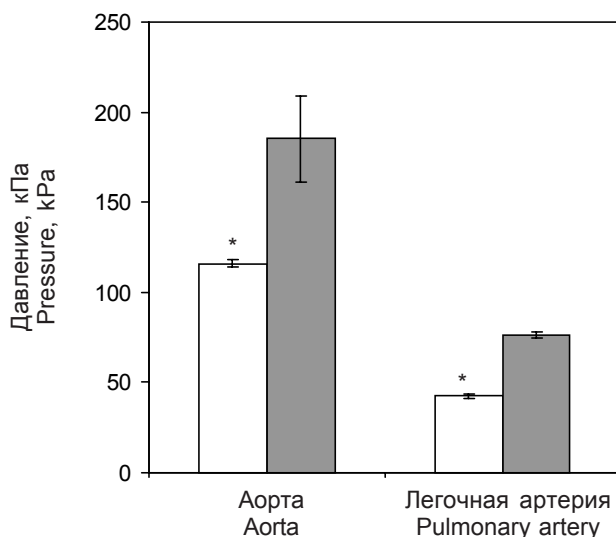


Рис. 4. Уругопрочностные показатели для аортальных графтов и графтов легочной артерии: □ – опыт; ■ – контроль; * – значимые различия по сравнению с контролем, $p < 0,001$.

Fig. 4. Strain-strength indices for aortal grafts and the ones of pulmonary artery: □ – experiment; ■ – control; * – statistically significant differences vs control, $p < 0,001$.

для аортальных ксеногенных графтов и графтов легочной артерии приведено на рис. 4.

Важно отметить, что временной интервал от начала растягивания сосудистой стенки до момента ее разрыва (что коррелирует с показателем ее эластичности) у децеллюлярных графтов больше по сравнению с таковым у контрольных образцов (рис. 5).

Основным устойчивым к напряжению компонентом матрикса является коллаген [8, 9, 15]. Отдельные коллагеновые волокна выдерживают значительную деформацию, но при этом они не поддаются сжатию, в отличие от эластиновых волокон, которые способны растягиваться и сжиматься. Так, изменение размера и формы створки клапана на протяжении сердечного цикла связаны с трансформацией структуры коллагена после обычных растяжений [18]. Натяжение створки ограничено, а сопротивление прогибу в желудочек в момент диастолы обеспечивается коллагеновыми волокнами. Коллагеновые волокна в области створки имеют направление, обеспечивающее наибольшую податливость ткани (ортогональная ориентация), но при этом они могут оказывать сопротивление наибольшему давлению (параллельная ориентация) [15].

Выводы

Результаты анализа уругопрочностных параметров децеллюлярных сосудисто-клапанных

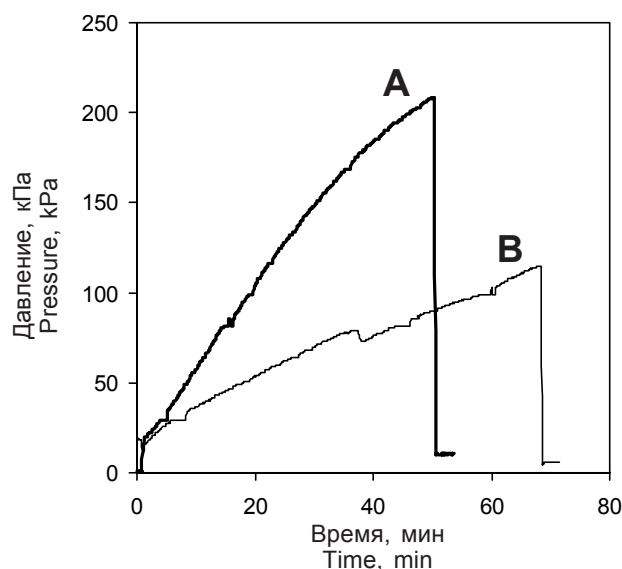


Рис. 5. Уругопрочностные свойства аортальных графтов до (А) и после (В) децеллюляризации.

Fig. 5. Strain-strength properties of aortal grafts prior to (А) and after (В) decellularization.

throughout the cardiac cycle is associated with the transformation of collagen structure after usual strains [16]. Tension of a leaflet is restricted and longitudinal stiffness in the ventricle at the diastole time is provided by collagen fibres. Collagen fibres in the leaflet area have a direction providing the highest tissue compliance (orthogonal orientation), but they can resist the highest pressure (parallel orientation) [12].

Conclusions

The results of analysis of strain strength parameters of decellularized vascular-valvular carcasses testify to preservation of structural fibres and physical properties of extracellular matrix. Such an ‘integrity’ is expressed in maintaining the strength of vascular wall, sufficient for withstanding the intravascular pressure *in vivo*, on the background of a slight increase in its elasticity. Since the properties of extracellular matrix are also determined by its biochemical composition, then the findings can testify to an integrity of structural fibres, making the matrix basis.

The obtained results can be used in the passport of biological objects stored in cryobanks.

References

1. Avtonomova L.V., Dergun S.M., Goncharova G.A., Stepchuk A.V. Mechanical trials on strain and internal pressure of grafts' vessels: Proc. of the reports. Vestnik NTU 'KhPI' 2009; (30): 3–7.

каркасов свидетельствуют о сохранности структурных волокон и физических свойств экстрацеллюлярного матрикса. Такая «ненарушенность» выражается в сохранении прочности сосудистой стенки, достаточной для выдерживания внутрисосудистого давления *in vivo*, на фоне незначительного повышения ее упругости. Поскольку свойства экстрацеллюлярного матрикса также определяются его биохимическим составом, то экспериментальные данные могут свидетельствовать о целостности структурных волокон, составляющих основу матрикса.

Полученные результаты могут быть включены в паспорт биообъектов, хранящихся в криобанках.

Литература

1. Автономова Л.В., Дергун С.М., Гончарова Г.А., Степчук А.В. Механические испытания на растяжение и внутреннее давление сосудов имплантатов: Сб. научн. тр. Вестник НТУ «ХПИ». – 2009. – №30. – С. 3–7.
2. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., Миронов П.В. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии. – Красноярск: СФУ, 2009. – С.168–170.
3. Курапеев Д.И., Лаврешин А.В., Анисимов С.В. Тканевая инженерия клапанов сердца: децеллюляризация алло- и ксенографтов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7, №1. – С. 34–39.
4. Самусев Р.П., Смирнов А.В. Атлас по цитологии, гистологии и эмбриологии. – М., 2006. – С. 66–69.
5. Сандомирский Б.П., Бызов Д.В., Михайлова И.П. Новый подход к созданию сосудистых протезов малого диаметра. В кн.: Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. – Харьков, 2012. – С. 623–654
6. Таганович А.Д., Кухта В.К., Морозкина Т.С. и др. Биологическая химия: краткий курс лекций для иностранных учащихся stomфака. – Минск.: БГМУ, 2005. – 119 с.
7. Ярилин А.А., Игнатьева Г.А., Гушин И.С. и др. Актуальные проблемы патофизиологии // Под ред. Б.Б. Мороз. – М.: Медицина, 2001. – С.13–48.
8. Badylak S.F., Weiss D.J., Caplan A., Macchiarini P. Engineered whole organs and complex tissues // Lancet. – 2012. – Vol. 379, №9819. – P. 943–952.
9. Grauss R.W., Hazekamp M.G., van Vliet S. et al. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling // J. Thorac Cardiovasc Surg. – 2003. – Vol. 126, №6. – P. 2003–2010.
10. Lam M.T., Wu J.C. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration // Expert Rev. Cardiovasc Ther. 2012. – Vol. 10, №8. – P. 1039–1049.
11. Rabkin-Aikawa E., Farber M., Aikawa M., Schoen F.J. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. // J. Heart Valve Dis. – 2004. – Vol. 13, №5. – P. 841–847.
12. Robinson K.A., Li J., Mathison M. et al. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair // Circulation. – 2005. – Vol. 112, Suppl 9. – P. 135–143.
13. Schmidt D., Hoerstrup S.P. Tissue engineered heart valves based on human cells // Swiss Med. Wkly. – 2007. – Vol. 137, Suppl 155. – P. 80S–85S.
14. Schmidt D., Stock U.A., Hoerstrup S.P. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric
2. Badylak S.F., Weiss D.J., Caplan A., Macchiarini P. Engineered whole organs and complex tissues. Lancet 2012; 379(9819): 943–952.
3. Grauss R.W., Hazekamp M.G., van Vliet S. et al. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 126(6): 2003–2010.
4. Kurapeyev D.I., Lavreshin A.V., Anisimov S.V. Tissue engineering of heart valves: decellularization of allo- and xenografts. Cell Transplantation and Tissue Engineering 2012; 7(1): 34–39.
5. Lam M.T., Wu J.C. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration. Expert Rev Cardiovasc Ther 2012; 10(8): 1039–1049.
6. Rabkin-Aikawa E., Farber M., Aikawa M., Schoen F.J. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. J Heart Valve Dis 2004; 13(5): 841–847.
7. Robinson K.A., Li J., Mathison M., Redkar A. et al. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. Circulation 2005; 112 (9): 135–143.
8. Samusev R.P., Smirnov A.V. Atlas in cytology, histology and embryology. – Moscow: JSC "Mir i Obrazovanie" Publishing House, 2006; 66–69.
9. Sandomirsky B.P., Byzov D.V., Mikhaylova I.P. New approach when designing vascular prostheses of small diameter. In: Actual problems of cryobiology and cryomedicine. Kharkov; 2012. p. 623–654.
10. Schmidt D., Hoerstrup S.P. Tissue engineered heart valves based on human cells. Swiss Med Wkly 2007; 137(155): 80S–85S.
11. Schmidt D., Stock U.A., Hoerstrup S.P. Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2007; 362(1484): 1505–1512.
12. Schoen F.J. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. Circulation 2008; 118(18): 1864–1880.
13. Steinhoff G., Stock U., Karim N. et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. Circulation 2000; 102(19): 50–55.
14. Taganovich A.D., Kukhta V.K., Morozkina T.S. et al. Biological chemistry: brief lecture course for foreign students of dentistry faculty. Minsk: 2005.
15. Tudorache I., Cebotari S., Sturz G. et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. J Heart Valve Dis 2007; 16(5): 567–573.
16. Vesely I. Heart Valve Tissue Engineering. Circ Res 2005; 97(8): 743–755.
17. Volova T.G., Shishatskaya E.I., Mironov P.V. Materials for medicine, cell and tissue engineering. Krasnoyarsk: SFU, 2009; 168–170.
18. Weber K.T., Sun Y., Tyagi S.C., Cleutjens J.P. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. J Mol Cell Cardiol 1994; 26(3): 279–292.
19. Yarin A.A., Ignatieva G.A., Guschin I.S. et al. Actual problems of pathophysiology. Moscow: Meditsyna; 2001.
20. Wilson E.M., Spinale F.G. Myocardial remodeling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. Ann Med 2001; 33(9): 623–634.
21. Yannas I.V., Tzeranis D.S., Harley B.A., So P.T. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. Philos Trans A Math Phys Eng Sci 2010; 368(1917): 2123–2139.
22. Zhai W., Zhang H., Wu C., Zhang J. et al. Crosslinking of saphenous vein ECM by procyanidins for small diameter blood



- starter matrices // *Philos. Trans. R. Soc Lond B Biol Sci.* – 2007. – Vol. 362, №1484. – P. 1505–1512.
15. Schoen F.J. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering // *Circulation.* – 2008. – Vol. 118, №18. – P. 1864–1880.
 16. Steinhoff G., Stock U., Karim N. et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102, №19, Suppl 3. – P. 50–55.
 17. Tudorache I., Cebotari S., Sturz G. et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves // *J. Heart Valve Dis.* 2007. – Vol. 16, №5. – P. 567–573.
 18. Vesely I. Heart Valve Tissue Engineering // *Circ Res.* – 2005. – Vol. 97, №8. – P. 743–755.
 19. Weber K.T., Sun Y., Tyagi S.C., Cleutjens J.P. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1994. – Vol. 26, №3. – P. 279–292.
 20. Wilson E.M., Spinale F.G. Myocardial remodeling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium // *Ann Med.* 2001. – Vol. 33, №9. – P. 623–634.
 21. Yannas I.V., Tzeranis D.S., Harley B.A., So P.T. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization // *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* – 2010. – Vol. 368, №1917. – P. 2123–2139.
 22. Zhai W., Zhang H., Wu C., Zhang J. et al. Crosslinking of saphenous vein ECM by procyanidins for small diameter blood vessel replacement // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2014. – Vol. 102, №5. – P. 936–949.
 23. Zhou J., Hu S., Ding J. et al. Tissue engineering of heart valves: PEGylation of decellularized porcine aortic valve as a scaffold for in vitro recellularization // *Biomed. Eng. Online.* – 2013. – Vol.12. – P. 87.