

ЗНАЧЕНИЕ АВТОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТКАНЕВЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

DOI: 10.17691/stm2017.9.2.10
УДК 617–084.844–77:637
Поступила 22.08.2016 г.



М.С. Макаров, к.б.н., научный сотрудник лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования;
М.В. Сторожева, младший научный сотрудник лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования;
Н.В. Боровкова, д.м.н., зав. лабораторией трансплантации клеток и иммунотипирования

Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, 129090,
Большая Сухаревская пл., 3

Цель исследования — определить возможность оценки биологических свойств тканевых трансплантатов разных типов с помощью анализа уровня автофлюоресценции их коллагеновых волокон.

Материалы и методы. Исследовали тканевые трансплантаты разных типов, приготовленные по известным методикам, часть этих трансплантатов подвергали дополнительным воздействиям, вызывающим структурные изменения коллагена. Анализ препаратов проводили с помощью световой, флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Для оценки адгезии клеток человека на тканевых трансплантатах с разным значением автофлюоресценции коллагена использовали фибробласты человека линии М-22 и тромбоциты доноров крови.

Результаты. Автофлюоресценция коллагеновых волокон регистрируется как на нефиксированных, так и на фиксированных образцах тканевых трансплантатов, при этом уровень интенсивности свечения отдельных волокон отражает степень их компактизации. Повреждение исходной структуры коллагена приводит к появлению в составе трансплантатов пикринофильных волокон, которые обладают очень высоким уровнем автофлюоресценции и не выявляются в норме или при деконденсации коллагена в условиях гипотонии. Трансплантаты с интенсивностью автофлюоресценции коллагеновых волокон не более 30 фут-кандел являются высокоадгезивными для фибробластов человека линии М-22 и тромбоцитов доноров, тогда как при уровне 40 фут-кандел и выше их адгезивные свойства резко падают.

Заключение. Анализ автофлюоресценции коллагена дает важную информацию о топографии соединительной ткани, сохранности межклеточного матрикса, а также позволяет оценить его повреждение, в том числе — в нефиксированных тканях и трансплантатах.

Ключевые слова: тканевые трансплантаты; автофлюоресценция коллагена; адгезия клеток.

Как цитировать: Makarov M.S., Storozheva M.V., Borovkova N.V. Collagen fiber autofluorescence level in evaluating the biological properties of tissue grafts. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(2): 83–90, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.10>

English

Collagen Fiber Autofluorescence Level in Evaluating the Biological Properties of Tissue Grafts

M.S. Makarov, PhD, Researcher, Laboratory of Cell Transplantation and Immunotyping;
M.V. Storozheva, Junior Researcher, Laboratory of Cell Transplantation and Immunotyping;

Для контактов: Макаров Максим Сергеевич, e-mail: mcsimmc@yandex.ru

N.V. Borovkova, MD, DSc, Head of Laboratory of Cell Transplantation and Immunotyping

N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, 3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow, 129010, Russian Federation

The aim of the investigation was to study the possibilities of evaluating the biological properties of various tissue grafts analyzing autofluorescence level of their collagen fibers.

Materials and Methods. The study involved various types of standard-produced tissue grafts, some of them being exposed to additional treatment to stimulate changes in collagen fiber structure. Analysis of preparations was made using light, fluorescent and confocal microscopy. To evaluate human cell adhesion on tissue grafts with different autofluorescence levels, M-22 human fibroblasts and human blood platelets were used.

Results. Collagen autofluorescence has been registered in both fixed and non-fixed tissue graft samples, autofluorescence level of single fibers reflecting the extent of their compaction. Damage to the initial collagen structure leads to changes in tissue graft composition due to formation of picrinophilic fibers with very high autofluorescence levels, which do not appear in normal tissues or after collagen decondensation in conditions of hypotonia. Grafts with collagen fiber autofluorescence intensity ≤ 30 foot-candles are highly adhesive for M-22 human fibroblasts and donor platelets, whereas grafts with autofluorescence levels of more than 40 foot-candles exhibit significantly lower adhesive properties.

Conclusion. Collagen autofluorescence analysis provides important data about connective tissue topography, intercellular matrix integrity and allows collagen defects to be revealed, even in non-fixed tissue slices and grafts.

Key words: tissue grafts; collagen autofluorescence; cell adhesion.

При проведении восстановительных и реконструктивных операций все чаще используют аллогенные тканевые трансплантаты. Источником для них могут быть губчатая и кортикальная кость, серозные оболочки (перикард, брюшина, плевра), твердая мозговая оболочка, кожа, кровеносные сосуды [1–3]. В настоящее время аллогенные тканевые трансплантаты активно применяются в травматологии для замещения костных дефектов, в хирургии при герниопластике в качестве фиксирующих антиадгезивных имплантатов, в комбустиологии в виде раневых покрытий [2–5]. Перспективным направлением является использование тканей человека в качестве естественной матрицы при производстве комбинированных трансплантатов [6–8].

Учитывая широкий спектр применения тканевых трансплантатов, особое внимание следует уделять их качеству. Как правило, процедура изготовления тканевого трансплантата включает забор исходной ткани, ее модификацию, стерилизацию и хранение. При этом на каждом из указанных этапов возможно изменение или даже повреждение структуры коллагенового матрикса. Оценить структурную целостность трансплантата можно путем анализа его биомеханических свойств, таких как прочность, упругость, растяжимость [9, 10]. Однако в большинстве случаев оценку качества тканевых трансплантатов проводят с помощью световой микроскопии, используя стандартные гистологические, реже — гистохимические методики [2, 6, 11–13]. В ходе гистологического исследования трансплантата большую роль играет анализ организации компонентов межклеточного матрикса, в первую очередь — коллагеновых волокон, при этом почти не уделяется внимания такому явлению, как автофлюоресценция.

Способность к автофлюоресценции (свечению под действием возбуждающего света в отсутствие спе-

циальных флюорохромных красителей) является замечательным свойством коллагена [14, 15], которое определяется его специфическим аминокислотным составом, трехмерной организацией целых молекул, а также комплексов из них (готовых коллагеновых фибрилл или волокон). Поэтому справедливо предположить, что оценка автофлюоресценции коллагена позволит проанализировать внутреннюю топографию тканевых трансплантатов как на стандартных гистологических препаратах, так и при исследовании нефиксированных трансплантатов.

Цель исследования — определить возможность оценки биологических свойств тканевых трансплантатов разных типов с помощью анализа уровня автофлюоресценции их коллагеновых волокон.

Материалы и методы. Анализ автофлюоресценции коллагена проводили как на гистологических срезах, так и на цельных фрагментах трансплантатов. Исследовали тканевые трансплантаты на основе дермального матрикса (15 разных образцов), перикарда (5 образцов), брюшины (4 образца), твердой мозговой оболочки (4 образца), кортикальной кости (4 образца), которые были изготовлены по известным методикам [3, 4, 16, 17], а также образцы кожи и аорты доноров тканей (по 5 образцов), жидкий коллаген 1-го типа из сухожилий человека и коллагеновые повязки на его основе (10 образцов). Кроме того, исследовали автофлюоресценцию коллагеновых волокон в составе трансплантатов, подвергавшихся дополнительным воздействиям, вызывающим структурные изменения коллагена. Для этого анализировали гистологические препараты следующих типов: нативная кожа доноров тканей (контроль), кожа доноров тканей после 4 ч инкубации в дистиллированной воде (сильная гипотония), кожа доноров тканей после 14 сут хранения в питательной среде для клеток DMEM

при 37°C, дермальный матрикс [16], дермальный матрикс, подшитый подкожно лабораторным мышам, через 28 сут эксперимента. Все трансплантаты произведены в отделении консервирования тканей НИИ СП им. Н.В. Склифосовского. Гистологические препараты исследовали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии, цельные фрагменты трансплантатов — с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону.

Для оценки адгезии клеток человека на тканевых трансплантатах с разным значением средней интенсивности свечения коллагена (mean fluorescence activity, $MFI_{\text{кол}}$) использовали фибробласты человека линии М-22 и тромбоциты доноров крови. Фибробласты линии М-22 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США) на 6-луночных планшетах Costar (Corning, США), содержащих образцы трансплантатов, при 37°C и концентрации CO_2 5% в течение 3–5 сут. В качестве источника тромбоцитов использовали тромбоцитные концентраты, полученные у доноров крови путем автоматического афереза и содержавшие не менее 50% тромбоцитов с гранулами (структурно и функционально полноценные тромбоциты) от их общего числа в пробе. Оценку содержания тромбоцитов с гранулами проводили с помощью оригинального метода, основанного на витальном окрашивании тромбоцитов [17]. Для определения адгезии тромбоцитов на трансплантатах чашки Петри с 2 мл тромбоцитного концентрата и фрагментами тканевых трансплантатов помещали в термостат при 37°C и выдерживали в течение 0,5–1 ч. Для выявления адгезировавших фибробластов М-22 и тромбоцитов применяли разработанные нами методы, основанные на окрашивании клеток витальными флюорохромными красителями [17, 18] с дальнейшим их анализом на флуоресцентном микроскопе.

В работе использовали конфокальный микроскоп Nikon Eclipse 80i, совмещенный с флуоресцентной лампой Nikon Intesilight C-HGFi (Nikon Corporation, Япония).

Регистрацию автофлуоресценции коллагена в нефиксированных тканях проводили при синем светофильтре (λ возбуждения — 380–420 нм, λ эмиссии — от 450 нм, время экспозиции — 1 с), в гистологических препаратах — при красном светофильтре (λ возбуждения — 510–560 нм, λ эмиссии — от 575 нм, время экспозиции — 1 с).

Для количественной характеристики автофлуоресценции коллагеновых волокон использовали показатель $MFI_{\text{кол}}$, который определяли тем же методом, что и при анализе свечения витально окрашенных клеток [18]. Полученные цифровые фотографии переносили в программу Adobe Photoshop 8, выделяли отдельные изображения коллагеновых волокон и определяли интенсивность их флуоресценции в фут-канделах.

Полученные статистические данные обрабатывали

с помощью методов вариационной статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel 2000. Вычисляли средние арифметические значения (M) и среднеквадратичные отклонения (σ).

Результаты и обсуждение

Анализ автофлуоресценции готовых коллагеновых трансплантатов. Автофлуоресценцию коллагена регистрировали как на цельных фрагментах обследованных трансплантатов, так и на гистологических препаратах, что позволяло видеть контуры коллагеновых волокон, их толщину и ориентацию. На примере геля коллагена 1-го типа, выделенного из сухожилий трупного донора, наблюдали отдельные фибриллы и волокна разного диаметра (рис. 1), при этом более толстые пучки коллагеновых фибрилл имели более высокий уровень автофлуоресценции. Значение $MFI_{\text{кол}}$ отдельных фибрилл варьировало от 8 до 15 фут-кандел, целых коллагеновых волокон — от 20 до 25 фут-кандел, фибриллы почти не контактировали друг с другом. В составе коллагеновых повязок почти весь коллаген был уже собран в волокна, чей уровень $MFI_{\text{кол}}$ также составлял 20–25 фут-кандел, т.е. можно говорить, что в процессе лиофилизации коллагеновых повязок наблюдалась компактизация коллагена. В тканевых трансплантатах значение $MFI_{\text{кол}}$ чаще всего было выше 25 фут-кандел (см. таблицу), достигая наибольшего уровня в трансплантатах твердой мозговой оболочки и кортикальной кости, содержащих очень плотные и толстые волокна. Таким образом, параметр $MFI_{\text{кол}}$ предоставляет возможность оценивать степень компактизации коллагеновых волокон в составе трансплантатов разных типов.

С другой стороны, уровень компактизации

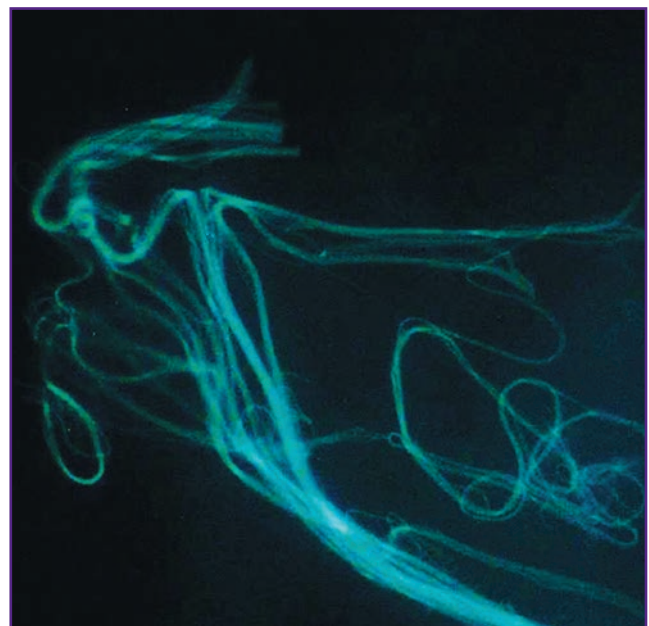


Рис. 1. Автофлуоресценция выделенных волокон коллагена 1-го типа из сухожилий доноров тканей; $\times 400$

Адгезивные характеристики тканевых трансплантатов в зависимости от интенсивности автофлуоресценции коллагеновых волокон

Типы коллагенсодержащих трансплантатов	Интенсивность автофлуоресценции коллагеновых волокон, MFI _{кол} флуор-кандел [M±σ (min-max)]	Адгезивная активность диплоидных клеток человека (фибробласты линии M-22)	Адгезивная активность тромбоцитов человека
Коллагеновые повязки	20,5±0,5 (15–24)	Образуют конфлюэнтный или субконфлюэнтный монослой, активно пролиферируют	Образуют крупные скопления (до 100 мкм в диаметре)
Дермальный матрикс	28,0±0,6 (25–30)		
Кожа доноров тканей	37,5±0,7 (33–40)	Адгезируют диффузно (без контакта с другими клетками) или образуют небольшие скопления	Образуют мелкие/средние скопления или адгезируют диффузно
Аорта	35,0±0,3 (33–38)		
Перикард	45,5±1,9 (41–50)		
Брюшина	47,0±1,1 (44–51)	Адгезируют одиночные клетки (на 1 мм ²)	Не адгезируют
Твердая мозговая оболочка	57,5±2,5 (50–70)		
Кортикальная кость	80,0±2,2 (50–90)		

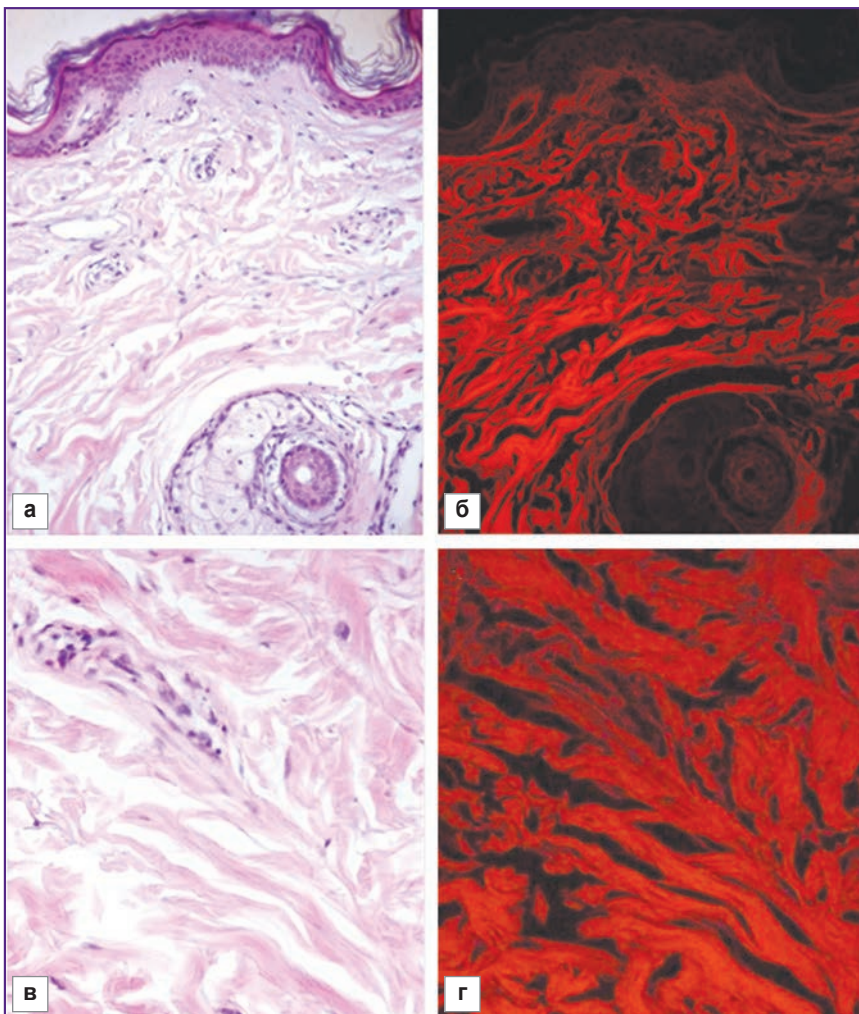


Рис. 2. Нативная кожа доноров тканей:
 а, в — окраска гематоксилином и эозином; б, г — автофлуоресценция коллагеновых волокон; ×100 (верхний ряд) и ×400 (нижний ряд)

коллагена исходной ткани может быть изменен при последующих воздействиях, в ходе процедур изготовления трансплантата. Использование тканевых трансплантатов как в клинической практике, так и при клеточно-тканевом инжиниринге часто подразумевает контакт трансплантата с факторами, способными влиять на структуру и топографию коллагеновых волокон в его составе. В настоящее время очень часто применяется процедура девитализации трансплантатов (удаление клеточных элементов из их состава) [3–6]. Производство девитализированных коллагеновых матриксов основано на использовании детергентов, растворов с высокой ионной силой и других химически активных веществ, потенциально способных нарушить исходную структуру коллагена и его топографию.

В настоящей работе влияние девитализации исследовали на гистологических препаратах дермального матрикса, используя в качестве контроля препараты исходной (нативной) кожи доноров тканей. Установлено, что в исходной коже химическая фиксация трансплантатов значительно не влияла на уровень MFI_{кол} — на гистологических препаратах кожи

доноров тканей можно отчетливо наблюдать автофлуоресценцию коллагена по всей площади среза (рис. 2), при этом наиболее интенсивное свечение отмечено у самых крупных волокон (35–40 фут-кандел). Параллельно регистрировали слабое остаточное свечение цитоплазмы клеток, что может быть обусловлено действием фиксатора формалина, который способен усиливать флуоресценцию. На препаратах дермального матрикса отмечено снижение автофлуоресценции основной части волокон (до 28 фут-кандел), хотя в проходящем свете видимые изменения коллагеновых структур не выявлялись (рис. 3, а). Наряду с этим можно было обнаружить фрагменты очень ярких волокон с уровнем $MFI_{кол}$ выше 60 фут-кандел (рис. 3, б, в), хотя при окрашивании гематоксилином и эозином такие волокна имели стандартную окраску, т.е. интенсивность автофлуоресценции здесь не была связана с компактизацией волокон. При окраске по Ван-Гизону волокна с $MFI_{кол} \geq 60$ фут-кандел имели не характерный красный, а бледно-желтый или бледно-оранжевый цвет (рис. 3, в), т.е. были пикринофильными (адсорбирующими пикрин, желтый компонент красителя), чего никогда не наблюдалось в препаратах нативной кожи (см. рис. 2).

В клеточной биологии пикринофилия волокон рассматривается как явный признак деградации коллагена, нарушения его исходной структуры [19], т.е. в ходе процедуры получения дермального матрикса происходит необратимое разрушение части коллагеновых волокон. Примечательно, что во флуоресцентном микроскопе при стимуляции автофлуоресценции коллагена пикринофильные волокна различимы гораздо лучше, чем в проходящем свете, даже при использовании окраски по Ван-Гизону. Это показывает, что на основе анализа автофлуоресценции появляется возможность выявления сильно поврежденных волокон в составе трансплантатов, чей уровень $MFI_{кол}$ в норме не превышает 60 фут-кандел. Отметим, что пикринофильные волокна практически всегда присутствовали в образцах дермального матрикса, однако их количество на единицу объема значительно варьировало. Можно заключить, что использованная в нашей работе технология девитализации кожи не нарушает общей топографии коллагена в ее составе, однако способна вызвать деградацию отдельных волокон, а также их частичную деконденсацию.

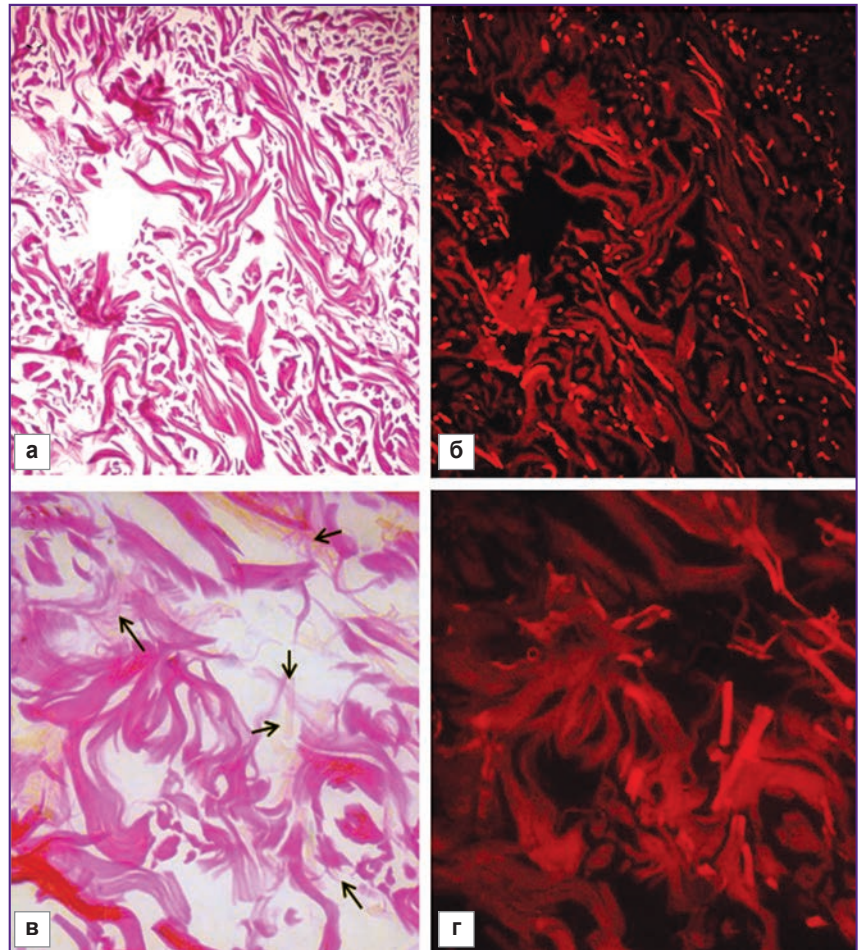


Рис. 3. Дермальный матрикс, полученный из кожи доноров тканей: а, в — окраска по Ван-Гизону; б, г — автофлуоресценция коллагеновых волокон; $\times 100$ (верхний ряд) и $\times 400$ (нижний ряд); стрелками указаны пикринофильные волокна

Влияние дополнительных воздействий на уровень автофлуоресценции коллагеновых трансплантатов.

На примере геля коллагена 1-го типа было установлено, что выделенные коллагеновые фибриллы не содержат структур с $MFI_{кол} \geq 60$ фут-кандел. Дальнейшие исследования показали, что инкубация цельных трансплантатов в условиях сильной гипотонии также не приводит к образованию в них пикринофильных волокон. Так, после инкубации образцов кожи тканевых доноров в дистиллированной воде волокна с $MFI_{кол} \geq 60$ фут-кандел не выявлялись, напротив, наблюдалось снижение интенсивности автофлуоресценции до 15 фут-кандел (рис. 4, а), т.е. в данном случае происходила деконденсация коллагеновых пучков без химической деградации коллагена. С другой стороны, после длительного хранения лоскутов кожи при 37°C волокна с $MFI_{кол} \geq 60$ фут-кандел выявлялись по всему объему дермы (рис. 4, б), что свидетельствует о полном химическом разрушении коллагена дермы. Оно могло быть обусловлено действием многих протеолитических ферментов, выде-

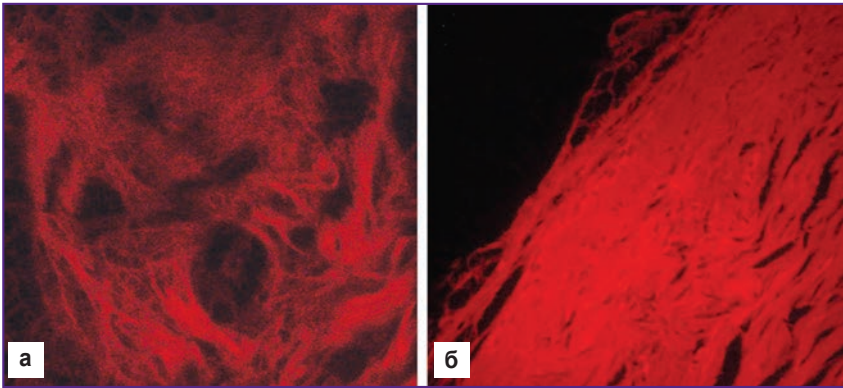


Рис. 4. Образцы кожи доноров тканей в условиях гипотонии (а) и после длительного хранения при 37°C (б); автофлуоресценция коллагеновых волокон; $\times 400$

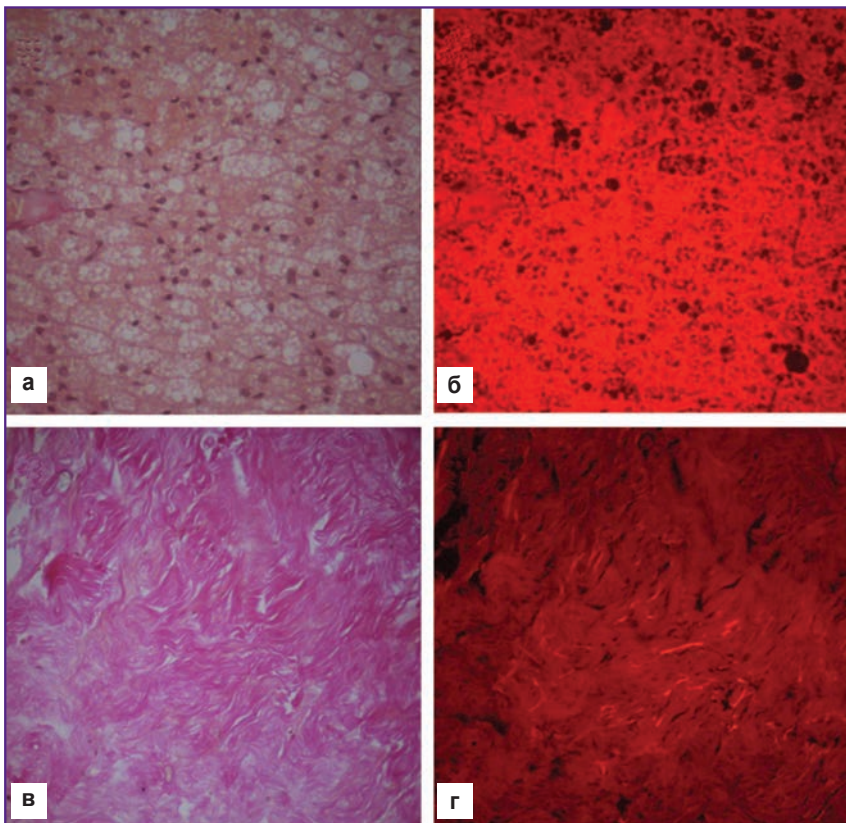


Рис. 5. Дermalный матрикс, подшитый подкожно лабораторным мышам, через 28 сут эксперимента с высокой (а, б) и низкой (в, г) степенью инфильтрации клетками воспаления: слева — окраска по Ван-Гизону, справа — автофлуоресценция коллагеновых волокон; $\times 100$

ляемых разрушающимися клетками в процессе хранения.

Лизис коллагеновых волокон особенно отчетливо виден при исследовании фрагментов дермального матрикса, подкожно подшитых мышам. Через 28 сут исследования у большинства животных отмечена интенсивная инфильтрация дермального матрикса клетками воспаления по всему объему трансплантата

(рис. 5, а), при этом все волокна в его составе имели $MFI_{кол}$ от 60 до 90 фут-кандел (рис. 5, б), что говорит о тотальной деградации коллагена. Однако подобная картина наблюдалась не всегда — у некоторых мышей степень инфильтрации дермального матрикса клетками воспаления была низкой (рис. 5, в) и, соответственно, число волокон с $MFI_{кол} \geq 60$ фут-кандел было значительно меньше, а в отдельных случаях не превышало их исходного уровня в трансплантате (рис. 5, г). Это говорит о том, что потенциально существует возможность приживания аллогенного и ксеногенного дермального матрикса. При этом остается невыясненным, влияет ли уровень пикринофильных волокон в исходном трансплантате на его конечную приживаемость *in vivo*. Данный вопрос требует дальнейшего исследования.

Адгезивная активность клеток на коллагеновых трансплантатах с разным уровнем автофлуоресценции. Независимо от того, ставится или нет задача полного приживания тканевого трансплантата, большое значение имеет оценка его биосовместимости с нормальными клетками и тканями. В первую очередь это подразумевает отсутствие токсического действия на культивируемые диплоидные клетки человека [6, 10–11, 20]. Кроме того, важным свойством тканевых трансплантатов являются их адгезивные характеристики. В зависимости от поставленных целей требования к адгезивности трансплантатов могут варьировать. Так, при клеточно-тканевом инжиниринге, производстве комбинированных биотрансплантатов используемая в их основе коллагеновая матрица должна быть высокоадгезивной для клеток. Напротив, при ряде хи-

рургических вмешательств, таких как герниопластика, тканевые трансплантаты должны обладать антиадгезивными свойствами. На примере использования линии диплоидных клеток человека (фибробласты М-22) и тромбоцитов человека нами выявлено, что адгезивность коллагеновых матриксов зависит в том числе и от плотности упаковки коллагена в их составе (см. таблицу). Максимально выражены адгезивные

свойства у трансплантатов с $MFI_{\text{кол}} \leq 30$ фут-кандел, т.е. именно такие коллагеновые трансплантаты наиболее пригодны для использования в качестве матрицы при создании клеточно-тканевых конструкций. Адгезивность трансплантатов резко падает при $MFI_{\text{кол}}$, равном 40 фут-кандел и выше, — на таких трансплантатах слабо адгезировали фибробласты и совсем не адгезировали тромбоциты. Клетки обоих указанных типов полностью отсутствовали *in vitro* на образцах трансплантатов твердой мозговой оболочки, которые в настоящее время считают весьма перспективными при лапароскопической герниопластике, пластике передней брюшной стенки при лечении вентральных грыж [1]. Вместе с тем есть данные, что трансплантаты на основе твердой мозговой оболочки могут быть *in vitro* заселены хондробластами человека [5], т.е. по отношению к хондробластам твердая мозговая оболочка не обладает антиадгезивными свойствами. Таким образом, при оценке биосовместимости тканевых трансплантатов с помощью клеточных культур необходимо в том числе учитывать тип используемых клеток.

Заключение. Анализ автофлуоресценции позволяет не только выявить коллагеновые волокна в составе соединительных тканей, но также оценить их структурную целостность и компактность. В отсутствие специального окрашивания флюорохромами регистрация автофлуоресценции коллагена может дать важную информацию о топографии соединительной ткани, сохранности межклеточного матрикса, а также позволит оценить его повреждение, в том числе — в нефиксированных тканях и трансплантатах. Это создает возможность динамического анализа коллагеновых структур при работе с клеточными культурами *in vitro*, при разработке и изготовлении новых типов комбинированных биотрансплантатов.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Ермолов А.С., Македонская Т.П., Радыгина М.В., Ярцев П.А., Титова Г.П., Петухова М.Н., Папанинов А.С., Кислицына О.С., Андреев Ю.В. Оценка возможности использования тканевых трансплантатов в абдоминальной хирургии. *Хирург* 2015; 2: 47–60. Yermolov A., Macedonian T., Radygina M., Yartsev P., Titov G., Petukhov M., Papanino A., Kislitsina O., Andreyev Yu. Evaluation of the possibility of using tissue grafts in abdominal surgery. *Khirurg* 2015; 2: 47–60.
2. Кармадонов А.В., Подолужный В.И., Зайков И.Н. Применение модифицированного ксеноперикарда при «ненатяжных» пластиках грыж передней брюшной стенки. *Сибирский медицинский журнал (Томск)* 2008; 23(2): 28–32. Karmadonov A.V., Podolugny V.I., Zaicov I.N. Using modified xenopericardium in “non-strained plasties” of inferior abdominal wall hernia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk)* 2008; 23(2): 28–32.
3. Александров В.Н., Хубулава Г.Г., Леванович В.В. Тканеинженерные сосудистые трансплантаты. *Педиатр* 2015; 6(1): 87–95. Aleksandrov V.N., Khubulava G.G., Levanovich V.V. Tissue-engineered vascular grafts. *Pediatr* 2015; 6(1): 87–95.
4. Хватов В.Б., Свищев А.В., Ваза А.Ю., Боровкова Н.В., Миронов А.С., Похитонов Д.Ю., Андреев Ю.В. Способ изготовления лиофилизированного аллотрансплантата кости. *Трансплантология* 2016; 1: 13–18. Khvatov V.B., Svishchev A.V., Vaza A.Yu., Borovkova N.V., Mironov A.S., Pokhitonov D.Yu., Andreev Yu.V. Method of manufacturing a lyophilized allograft bone. *Transplantologiya* 2016; 1: 13–18.
5. Schug-Pass C., Sommerer F., Tannapfel A., Lippert H., Köckerling F. The use of composite meshes in laparoscopic repair of abdominal wall hernias: are there differences in biocompatibility? *Surg Endosc* 2008; 23(3): 487–495, <https://doi.org/10.1007/s00464-008-0085-8>.
6. Bobrova M.M., Safonova L.A., Agapova O.I., Krashennikov M.E., Shagidulin M.Yu., Agapov I.I. Liver tissue decellularization as a promising porous scaffold processing technology for tissue engineering and regenerative medicine. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2015; 7(4): 6–13, <https://doi.org/10.17691/stm2015.7.4.01>.
7. Pokhitonov D.Y., Borovkova N.V., Filippov O.P., Klyukvin I.Y., Khvatov V.B., Ponomaryov I.N., Shugai S.V., Andreev Y.V., Smirnov S.V., Zhirkova E.A. Experimental substantiation and clinical use of a combination of dermal matrix with allogenic or autologous cells for the treatment of extensive traumatic wounds. *Bull Exp Biol Med* 2014; 157(5): 705–710, <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2647-1>.
8. Monteiro G.A., Rodriguez N.L., Delossantos A.I., Wagner C.T. Short-term in vivo biological and mechanical remodeling of porcine acellular dermal matrices. *J Tissue Eng* 2013; 4: 204173141349018, <https://doi.org/10.1177/2041731413490182>.
9. Lamme E.N., de Vries H.J., van Veen H., Gabbiani G., Westerhof W., Middelkoop E. Extracellular matrix characterization during healing of full-thickness wounds treated with a collagen/elastin dermal substitute shows improved skin regeneration in pigs. *J Histochem Cytochem* 1996; 44(11): 1311–1322, <https://doi.org/10.1177/44.11.8918906>.
10. Ahlfors J.-E.W., Billiar K.L. Biomechanical and biochemical characteristics of a human fibroblast-produced and remodeled matrix. *Biomaterials* 2007; 28(13): 2183–2191, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.12.030>.
11. Jiang H., Rhee S., Ho C.-H., Grinnell F. Distinguishing fibroblast promigratory and procontractile growth factor environments in 3-D collagen matrices. *FASEB J* 2008; 22(7): 2151–2160, <https://doi.org/10.1096/fj.07-097014>.
12. Pedersen J.A., Boschetti F., Swartz M.A. Effects of extracellular fiber architecture on cell membrane shear stress in a 3D fibrous matrix. *J Biomech* 2007; 40(7): 1484–1492, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2006.06.023>.
13. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev Phys Chem* 1996; 47(1): 555–606, <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.47.1.555>.
14. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 227–256, [https://doi.org/10.1016/s1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/s1387-2656(05)11007-2).
15. Baschong W., Suetterlin R., Laeng R.H. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-

embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem* 2001; 49(12): 1565–1571, <https://doi.org/10.1177/002215540104901210>.

16. Хубуття М.Ш., Андреев Ю.В., Боровкова Н.В., Хватов В.Б., Миронов А.С., Жиркова Е.А., Пономарев И.Н., Волков К.С., Шугай С.В., Конюшко О.И., Макаров М.С. Способ изготовления дермального матрикса. Патент РФ 2524619. 2014. Khubutija M.Sh., Andreev J.V., Borovkova N.V., Khvatov V.B., Mironov A.S., Zhirkova E.A., Ponomarev I.N., Volkov K.S., Shugaj S.V., Konjushko O.I., Makarov M.S. *Sposob izgotovleniya dermal'nogo matriksa* [Method for making dermal matrix]. Patent RU 2524619. 2014.

17. Макаров М.С., Хватов В.Б., Конюшко О.И., Боровкова Н.В., Сторужева М.В., Пономарев И.Н. Метод морфофункциональной оценки клеточного компонента биотрансплантатов. Патент РФ 2484472. 2013. Makarov M.S., Khvatov V.B., Konjushko O.I., Borovkova N.V., Storozheva M.V., Ponomarev I.N. *Metod morfofunktsional'noy otsenki kletochnogo komponenta biotransplantatov* [Method for morphofunctional assessment of cell component of biografts]. Patent RU 2484472. 2013.

Storozheva M.V., Ponomarev I.N. *Metod morfofunktsional'noy otsenki kletochnogo komponenta biotransplantatov* [Method for morphofunctional assessment of cell component of biografts]. Patent RU 2484472. 2013.

18. Makarov M.S., Kobzeva E.N., Vysochin I.V., Borovkova N.V., Khvatov V.T. Morphofunctional analysis of human platelets by vital staining. *Bull Exp Biol Med* 2014; 156(3): 409–412, <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2360-0>.

19. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М: Советская наука, 1957. 470 с. Roskin G.I., Levinson L.B. *Mikroskopicheskaya tekhnika* [Microscopic technique]. Moscow: Sovetskaya nauka, 1957; 470 p.

20. Makarov M.S., Storozheva M.V., Konyushko O.I., Borovkova N.V., Khvatov V.B. Effect of concentration of platelet-derived growth factor on proliferative activity of human fibroblasts. *Bull Exp Biol Med* 2013; 155(4): 576–580, <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2199-9>.