

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СТЕРИЛИЗАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ СУХОЖИЛИЙ СВЕРХКРИТИЧЕСКИМ ДИОКСИДОМ УГЛЕРОДА

А.А. Будаев¹, Н.В. Боровкова^{1,2}, А.М. Файн^{1,3}, А.Ю. Николаев⁴, М.С. Макаров¹, М.В. Сторожева¹, К.И. Скуратовская¹, А.Ю. Ваза¹, И.В. Фомичева⁵, Т.В. Черненькая¹, А.А. Каниболоцкий¹

¹Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

⁴Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, Россия

⁵Городская клиническая больница № 13, Москва, Россия

Резюме. *Актуальность.* Структурно-функциональные особенности ткани сухожилия человека создают определённые сложности при выборе адекватного способа консервирования трансплантатов на основе сухожилий. В процессе консервации необходимо сохранить механические и функциональные параметры сухожилий, а также обеспечить стерильность и биологическую безопасность трансплантата. Перспективными представляются методики, которые совмещают консервирование сухожилий при низких температурах и стерилизацию сверхкритическим диоксидом углерода. *Цель работы:* определить оптимальные режимы стерилизации аллогенных трансплантатов сухожилий сверхкритическим диоксидом углерода. *Материалы и методы.* В работе исследовали образцы аллогенных сухожилий, заготовленных от доноров тканей с соблюдением правил асептики и антисептики. После карантинизации и подтверждения отсутствия гемотрансмиссивных инфекций трансплантаты сухожилий разделили на три группы: в контрольной группе сухожилия не подвергали процедурам криоконсервирования и стерилизации, в двух опытных группах сухожилия обрабатывали криоконсервантом – 10 % раствором диметилсульфоксида (ДМСО) и стерилизовали сверхкритическим диоксидом углерода с медленным сбросом газа (2-я группа) или с быстрым сбросом газа (3-я группа), продолжительность стерилизации в обеих группах варьировала от 1 до 12 часов. Токсичность трансплантатов оценивали в культуре мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток человека (ММСК) на 3 и 7 сутки. Стерильность трансплантатов подтверждали на 7 и 14 сутки путём бактериологического посева на тиазидолевую среду и бульон Сабуро. Механические испытания проводили на машине LLOYD Instruments LR5K Plus со скоростью растяжения 5 мм/мин. *Результаты.* Гистологический анализ показал, что в группе с медленной декомпрессией коллагеновые волокна сохраняли свою целостность и топографию и содержали лишь локальные незначительные разрывы, при всех сроках обработки трансплантаты сухожилий были стерильными и нетоксичными. Напротив, в группе с быстрой декомпрессией отмечалось выраженное повреждение коллагеновых волокон, наблюдался рост бактериальной и грибковой флоры при посеве. Для оценки механических характеристик использовали трансплантаты контрольной группы и группы, где стерилизацию сверхкритическим диоксидом углерода проводили с медленным сбросом газа в течение 1–12 часов. В консервированных сухожилиях жёсткость и предельное напряжение достоверно не отличались от аналогичных значений в контроле ($p > 0,05$), напротив, уровень предельной деформации во всех экспериментальных образцах был достоверно снижен в 1,5–2,1 раза по сравнению с контролем. Модуль Юнга и нагрузка при разрыве в контроле и при стерилизации сухожилий в течение 1 часа имели сходные значения, тогда как при стерилизации от 3 до 12 часов эти параметры были в 1,4–2,1 раза снижены по сравнению с исходными сухожилиями ($p < 0,05$). *Выводы.* Предложенная методика консервирования сухожилий с использованием ДМСО и стерилизации сверхкритическим диоксидом углерода позволяет получить стерильные и нетоксичные трансплантаты. Структура клеток и волокон консервированных сухожилий не претерпевает значительных нарушений. Для стерилизации сверхкритическим диоксидом углерода трансплантатов сухожилий наиболее оптимальное время обработки составляет 1 час.

Ключевые слова: стерилизация, сверхкритический диоксид углерода, криоконсервант, сухожилие, заморозка, аллотрансплантат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Соответствие нормам этики. Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо.

Для цитирования: Будаев А.А., Боровкова Н.В., Файн А.М., Николаев А.Ю., Макаров М.С., Сторожева М.В., Скуратовская К.И., Ваза А.Ю., Фомичева И.В., Черненькая Т.В., Каниболоцкий А.А. Оценка эффективности стерилизации аллогенных трансплантатов сухожилий сверхкритическим диоксидом углерода. *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье.* 2023;13(4):145–153. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2023.4.TX.2>

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF ALLOGENEIC TENDON GRAFT STERILIZATION WITH SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE

A.A. Budaev¹, N.V. Borovkova^{1, 2}, A.M. Fayn^{1, 3}, A.Yu. Nikolaev⁴, M.S. Makarov¹, M.V. Storozheva¹, K.I. Skuratovskaya¹, A.Yu. Vaza¹, I.V. Fomicheva⁵, T.V. Chernen'kaya¹, A.A. Kanibolotskiy¹

¹N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Moscow, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

⁴A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵City Clinical Hospital No. 13, Moscow, Russia

Abstract. Structural and functional properties of the human tendon tissue complicate process of tendon-based grafts preserving. In the process of preservation, it is necessary to maintain mechanical and functional parameters of the tendon tissue as well as to provide sterility and biological safety of the graft. One could conclude effectiveness of techniques, combining tendon conservation at low temperatures and sterilization with the supercritical carbon dioxide. *Aim of work:* to find optimal conditions for allogeneic tendon grafts sterilization with supercritical carbon dioxide. *Materials and methods.* Allogeneic tendons were prepared from the tissue donors, following the rules of asepsis and antiseptics. After quarantine and confirmation of the absence of blood-borne infections the tendon grafts were divided into 3 groups: in the control group the tendons were not subjected to cryopreservation and sterilization procedures; in 2 experimental groups tendons were treated with a cryoprotector 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) solution and sterilized with supercritical carbon dioxide with slow gas discharge (group 2) or with fast gas discharge (group 3); the duration of sterilization in both groups varied from 1 to 12 hours. The toxicity of the grafts was assessed in human mesenchymal multipotent stromal cells (MMSC) culture on the 3rd and 7th days. The sterility of the grafts was confirmed on the 7th and 14th day by bacteriological culture on thioglycol medium and Saburo broth. Mechanical tests were performed on testing machine LLOYD Instruments LR5K Plus with the tensile speed 5 mm/min. *Results.* Histological analysis showed, that in the group with slow gas discharge collagen fibers retained their integrity and topography and contained only local minor tears; in all terms of treatment, the tendon grafts were sterile and nontoxic. On the contrary, in the group with fast gas discharge there was marked damage of the collagen fibers and growth of bacterial and fungal flora was observed in the culture. The grafts of the control group and the group, where sterilization with supercritical carbon dioxide was performed with slow gas discharge for 1–12 hours, were used to evaluate mechanical characteristics. In the preserved tendons the stiffness and ultimate strain did not significantly differ from the similar values in the control ($p > 0.05$), on the contrary, the level of ultimate strain in all experimental specimens was significantly reduced by 1.5–2.1 times comparing to the control. Young's modulus and load at rupture in the control grafts and grafts, sterilized for 1 hour, had similar values, whereas in grafts, sterilized from 3 to 12 hours, these parameters were 1.4–2.1 times lower ($p < 0.05$). *Conclusions.* The suggested technique of tendon preservation, using cryoprotector DMSO and sterilization with the supercritical carbon dioxide, allows to obtain sterile and non-toxic grafts. The structure of cells and fibers of the preserved tendons did not significantly disturbed. For supercritical carbon dioxide sterilization of tendon grafts the most optimal processing time is 1 hour.

Key words: sterilization, supercritical carbon dioxide, cryopreservative, tendon, freezing, allograft.

Competing interests. The authors declare no competing interests.

Funding. This research received no external funding.

Compliance with ethical principles. The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary.

Cite as: Budaev A.A., Borovkova N.V., Fayn A.M., Nikolaev A.Yu., Makarov M.S., Storozheva M.V., Skuratovskaya K.I., Vaza A.Yu., Fomicheva I.V., Chernen'kaya T.V., Kanibolotskiy A.A. Evaluation of the effectiveness of allogeneic tendon graft sterilization with supercritical carbon dioxide. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ". Rehabilitation, Doctor and Health.* 2023;13(4):145–153. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2023.4.TX.2>

Введение

Обеспечение биологической безопасности – наиболее важная составляющая производства трансплантатов на основе аллогенных тканей. Биологическая безопасность определяется стерильностью трансплантата, отсутствием токсичности и значимого иммунного ответа организма реципиента [1]. Последний фактор является наиболее труднореализуемым в процессе изготовления трансплантатов, содержащих живые клетки. При производстве большинства тканевых трансплантатов эта проблема решается путём децеллюляризации (удаления клеточных элементов) исходной ткани с последующей лиофилизацией [2].

Особенностью трансплантатов на основе аллогенных сухожилий является то, что для сохранения их функциональных параметров невозможно проведение их децеллюляризации и лиофилизации. Это затрудняет выбор эффективного способа стерилизации аллогенных сухожилий. Вместе с тем, в составе сухожилий резидентные

клетки (тендиноциты, макрофаги), а также клетки крови расположены в глубине плотных тяжей коллагеновых волокон, что значительно ограничивает развитие специфической иммунной реакции [3]. Сухожилия относят к тканям, которые имеют так называемую «иммунную привилегию» [4]. В связи с этим при изготовлении трансплантатов сухожилий считается допустимым не использовать агрессивные способы децеллюляризации ткани. В настоящее время методика стерилизации сухожилий не является стандартизированной. Для обеспечения стерильности мягкотканых трансплантатов в зарубежных и отечественных публикациях предлагается использовать гамма-излучение, газовую стерилизацию, применять антисептики или химические детергенты [5]. Наиболее перспективным методом, на наш взгляд, является технология обработки сухожилий сверхкритическим флюидом диоксида углерода, который позволяет проводить стерилизацию трансплантатов в консервирующем растворе. Анализируя данные

системных обзоров литературы и оригинальных исследований по возможности стерилизации тканей сверхкритическим диоксидом углерода можно заключить, что работы, посвященные этому способу, становятся актуальными, но в них отсутствует информация об условиях обработки, включая продолжительность воздействия газа, способе и скорости сброса газа, не показано влияние стерилизации на структуру соединительной ткани, нет данных о гистологической картине трансплантатов [6].

Целью данной работы было определить оптимальные режимы стерилизации аллогенных трансплантатов сухожилий сверхкритическим диоксидом углерода.

Материал и методы

В экспериментальное исследование включено 45 трансплантатов сухожилий *m. tibialis anterior*, забранных от посмертных доноров.

Операция по эксплантации трансплантатов осуществлялась в условиях операционной с соблюдением правил асептики и антисептики. При помощи линейных разрезов по 2 см на передней поверхности голени и стопы в проекции суставной щели голеностопного сустава и энтезисов сухожилий выполняли хирургический доступ. Производили мобилизацию сухожилий, измерение длины и отсекали от мест прикрепления. Все трансплантаты механически очищали от смежных тканей, помещали в стерильные пакеты с раствором антибиотика (Гентамицин 4 % 2 мл или Ванкомицин 1000 мг) и до получения результатов анализа на наличие трансмиссивных инфекций карантинизировали при температуре 4 °С. Затем сухожилия отмывали в физиологическом растворе хлорида натрия 0,9 % в течение 5–10 минут в условиях ламинарного бокса с соблюдением правил асептики и антисептики. В предыдущих наших работах мы доказали, что наиболее оптимальными для криохранения трансплантатов являются консерванты диметилсульфоксид (ДМСО) и полиэтиленгликоль (ПЭГ-400), а также их комбинация [6]. В этой связи, для настоящей работы нами выбран в качестве криоконсерванта 10 % ДМСО. Сухожилия погружали в 25 мл криоконсервирующего раствора на 10–15 минут, промакивали стерильными салфетками от излишней влаги и упаковывали. Стерилизацию трансплантатов производили на экспериментальной установке для обработки биоматериалов сверхкритическим диоксидом углерода, находящейся на базе ГБУЗ «НИИ СП им. Склифосовского ДЗМ» (рис. 1).

Из подготовленных к экспериментальному исследованию сухожилий было сформировано три группы. Первая группа – контрольная, в которую вошли 5 сухожилий без какой-либо обработки. Две опытные группы, различающиеся по способу сброса газа: 2-я группа (20 сухожилий) – криоконсервированные трансплантаты, стерилизованные сверхкритическим диоксидом углерода с быстрой декомпрессией и 3-я группа (20 сухожилий) – криоконсервированные трансплантаты, стерилизованные сверхкритическим диоксидом углерода с медленной декомпрессией. Опытные группы были разделены на четыре подгруппы по

5 трансплантатов в каждой в зависимости от времени воздействия сверхкритического диоксида углерода – 1 час, 3 часа, 6 часов и 12 часов.

Для оценки архитектоники ткани после стерилизации сухожилия проводили гистологическое исследование. Для этого из всех трансплантатов отбирали образцы размером 1×1 см, фиксировали 10 % раствором формалина и готовили гистологические препараты по стандартной методике. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме, окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону. Исследовано 80 микропрепаратов, которые изучали светооптически с помощью светового микроскопа Olympus CX21. Кроме того, в гистологических препаратах оценивали уровень аутофлуоресценции коллагеновых волокон (λ возбуждения – 510–560 нм, λ эмиссии – от 575 нм, время экспозиции – 1 с) по методике, разработанной Макаровым М.С. и соавт. [7].

Исследование токсичности трансплантатов сухожилий проводилось в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга тканевых доноров 3–9 пассажа. Фрагменты трансплантатов сухожилий длиной 1,0–1,5 см помещали в опытные лунки 6-луночного планшета и вносили суспензию, содержащую 50 тыс. ММСК. Параллельно 50 тыс. ММСК вносили в лунки без трансплантатов сухожилий (контроль). Клетки культивировали в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США) при 37 °С и концентрации CO₂ 5 % в течение трёх суток. Для микроскопического анализа клетки окрашивали витальным флуорохромным красителем на основе триафлавина-акридинового оранжевого или триафлавина и родамина С. Оценивали общее число клеток (тыс/см²), их морфологию, целостность клеточных мембран (ЦКМ, в баллах).

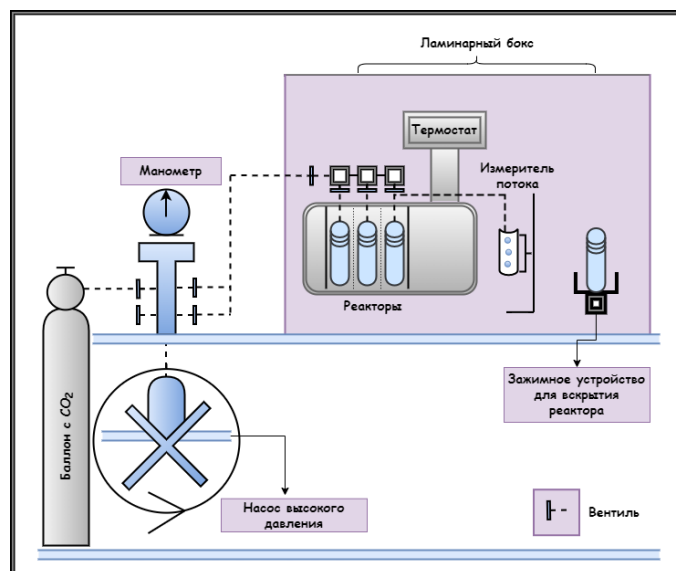


Рисунок 1. Схема основных узлов установки для стерилизации аллогенных трансплантатов сверхкритическим диоксидом углерода
Figure 1. Diagram of the main units of the installation for sterilization of allogeneic transplants with supercritical carbon dioxide

Исследование на стерильность проводили методом прямого посева в асептических условиях. После вскрытия пакетов с трансплантатами в условиях ламинарного шкафа с соблюдением правил асептики и антисептики образцы погружали в две бактериологические среды – бульон Сабуро и тиогликолевую среду. При испытании на стерильность параллельно проводились соответствующие отрицательные контроли. Посевы на тиогликолевой среде инкубировали при температуре $32,5 \pm 2,5$ °C, в среде Сабуро – при $22,5 \pm 2,5$ °C соответственно в течение 14 суток.

Испытание механических характеристик образцов проводили путём регистрации кривых растяжения на машине «LLOYD Instruments LR5R Plus» с датчиком до 5 кН со специально изготовленными, оригинальными зажимами, исключаящими повреждение ткани в процессе эксперимента. Для исследования из трансплантатов вырезали фрагменты размером $50 \times 3 \times 3$ мм. Нагрузка (20 мм/мин) прикладывалась к одному концу образца, а другой конец оставался неподвижным (рабочая область 30–50 мм в зависимости от образца). Определяли следующие параметры: нагрузка при разрыве, Н; предельная деформация, %; жесткость, Н/мм; предельное напряжение, МПа; модуль Юнга, МПа.

Для статистической обработки данных вычисляли средние арифметические значения (M) и среднеквадратичные отклонения (σ), для оценки различий использовали t -критерий Стьюдента. Различия значений считали достоверными при уровне значимости более 95 % ($p < 0,05$).

Результаты

Микроскопический анализ тканей

Гистологический анализ показал, что в группе с медленной декомпрессией коллагеновые волокна сохраняли свою целостность и топографию, были параллельно ориентированы и содержали лишь локальные незначительные разрывы. Интенсивность автофлуоресценции коллагена по всей длине волокон соответствовала норме (рис. 2).

Напротив, в группе с быстрой декомпрессией в трансплантатах наблюдалась выраженная отечность, многие волокна были деконденсированы с распадом на отдельные фибриллы с формированием обширных разрывов. Интенсивность автофлуоресценции коллагена по всей длине волокон была в 2,1–3,5 раза снижена по сравнению с нативными образцами (рис. 3).

В гистологических препаратах также оценивали сохранность клеток сухожилия. Гистологическое исследование показало, что после процедур стерилизации и криохранения в составе трансплантатов сухожилий выявляются клетки-тендициты с нормальной структурной организацией. У большинства клеток структура клеточных ядер и хроматина в их составе, структура цитоплазмы не претерпевали видимых изменений по сравнению с нативной тканью. Число клеток с пикнотизированным (нефункциональным) ядром, с деформациями цитоплазмы не превышают 10–15 % от общего числа в трансплантате. Таким образом, предложенные методики обработки сухожилий не вызывают выраженной гибели клеток в составе готовых трансплантатов.

Исследование токсичности трансплантатов сухожилий

Исследование *in vitro* показало, что все исследуемые типы трансплантатов не оказывали токсического действия на клетки. В контроле и во всех опытных лунках через трое суток культивирования формировался субконфлюэнтный монослой с плотностью клеток 17–18 тыс/см². ММСК имели характерный веретенообразный вид, уровень ЦКМ во всех опытных образцах составлял 34–36 баллов и достоверно не отличался от аналогичного показателя в контроле (рис. 4).

Исследование стерильности трансплантатов

В трансплантатах контрольной группы (без криоконсервирования и стерилизации сверхкритическим диоксидом углерода) и группы, где стерилизацию проводили с медленной декомпрессией, рост бактериальной и грибковой флоры отсутствовал как на 7-е, так и на 14-е сутки. Напротив, в группе стерилизации с быстрой декомпрессией отмечалось наличие бактериальной и грибковой флоры независимо от продолжительности стерилизации. Это свидетельствует о том, что способ стерилизации с быстрым сбросом давления не обеспечивает стерильность итогового трансплантата. При медленной декомпрессии все образцы сухожилий были стерильными. Таким образом, для обеспечения стерильности трансплантаты сухожилий достаточно обрабатывать сверхкритическим диоксидом углерода в течение 1 часа.

Оценка механических характеристик трансплантатов

Механические свойства аллогенных сухожилий важны для обеспечения функциональной нагрузки трансплантата в организме реципиента. В норме сухожилия обладают способностью к обратимой деформации при сохранении структурной целостности и прочности. С учётом данных микроскопии, для оценки механических характеристик мы использовали нативные сухожилия и сухожилия, которые стерилизовали с медленной декомпрессией. Исследование сухожилий с помощью разрывной машины позволяет получить кривые зависимости напряжения и относительной деформации (рис. 5), по которым также можно определить другие механические параметры. Нативные сухожилия и сухожилия, которые стерилизовали в течение 1 часа с медленной декомпрессией, имеют схожий вид зависимости напряжение–деформация, тогда как при стерилизации 3 часа и выше наблюдается заметное увеличение относительной деформации образцов. Это говорит об изменении структуры коллагеновых волокон и подтверждает данные микроскопии. Во всех экспериментальных группах жёсткость и предельное напряжение достоверно не отличались от аналогичных значений в контроле ($p > 0,05$), напротив, уровень предельной деформации во всех экспериментальных образцах был достоверно снижен по сравнению с контролем в 1,5–2,1 раза (табл. 1). Модуль Юнга и нагрузка при разрыве в контроле и второй группе (стерилизация в течение 1 часа) имели сходные значения, тогда как при стерилизации от 3 до 12 часов эти параметры были в 1,4–2,1 раза ниже по сравнению с контрольными сухожилиями ($p < 0,05$). Таким образом, продолжительность обработки в течение одного часа является оптимальной для стерилизации сухожилий человека сверхкритическим диоксидом углерода.

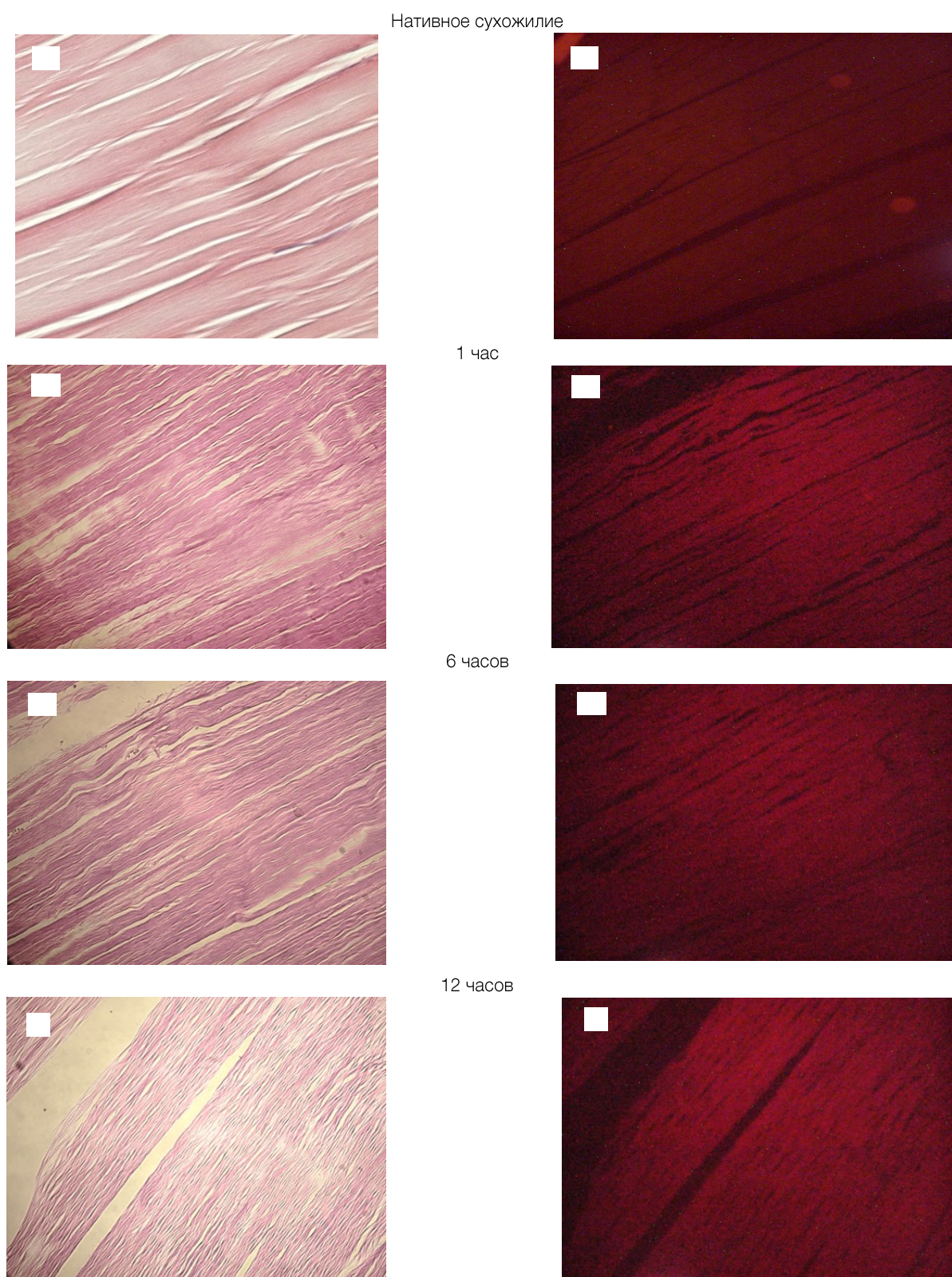


Рисунок 2. Гистологические препараты нативного сухожилия и аллогенных трансплантатов сухожилий, стерилизованных сверхкритическим диоксидом углерода с медленным сбросом газа. Увеличение x100. Слева – окраска гематоксилином и эозином, справа – автофлуоресценция коллагена. А, А' – контроль; Б, Б' – стерилизация 1 час; В, В' – стерилизация 6 часов; Г, Г' – стерилизация 12 часов

Figure 2. Histological preparations of native tendon and allogeneic tendon grafts sterilized with supercritical carbon dioxide with slow gas discharge. Magnification x100. Hematoxylin and eosin staining on the left and collagen autofluorescence on the right. А, А' – control; Б, Б' – sterilization for 1 hour; В, В' – sterilization for 6 hours; Г, Г' – sterilization for 12 hours

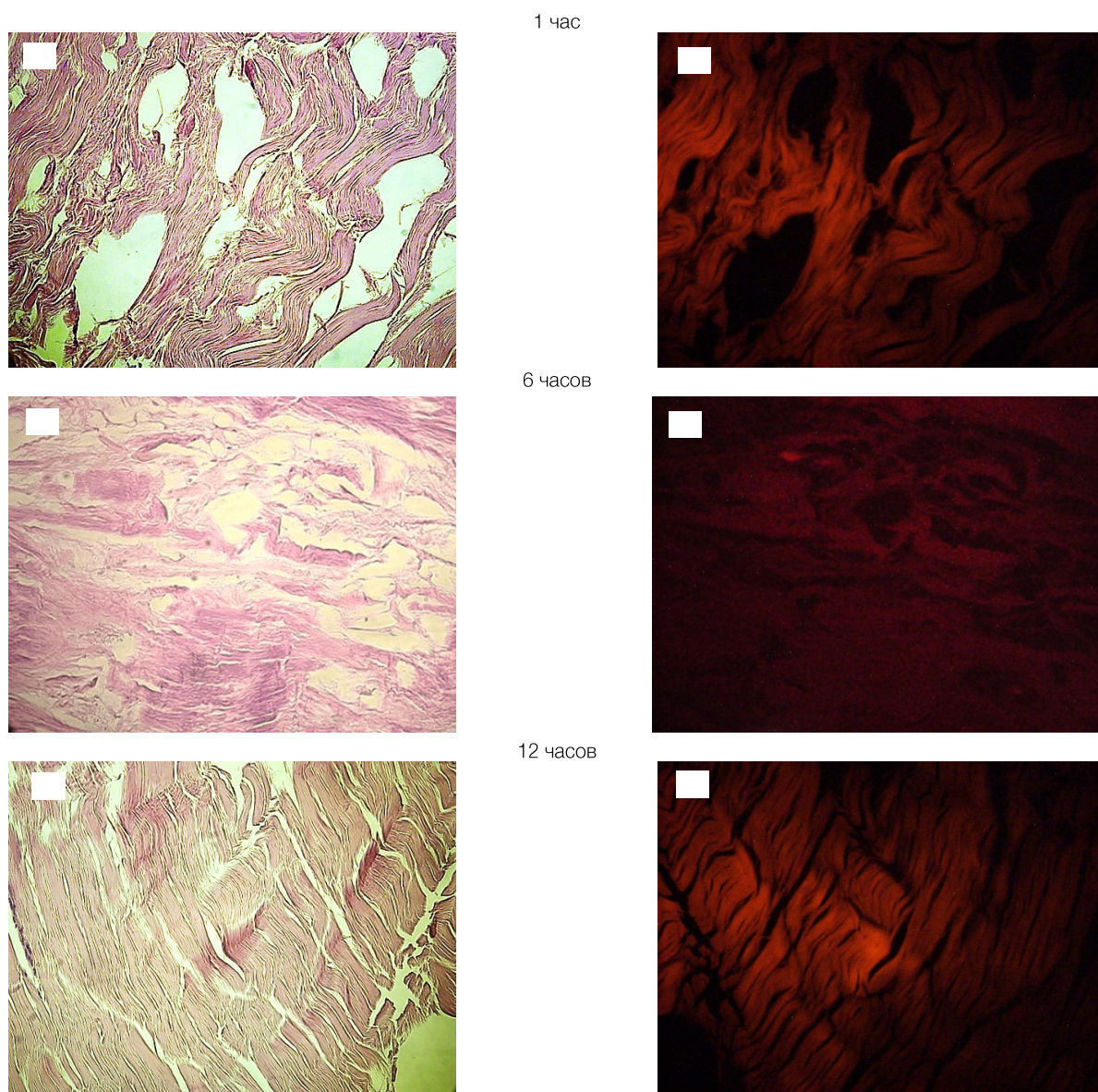


Рисунок 3. Гистологические препараты аллогенных трансплантатов сухожилий, стерилизованных сверхкритическим диоксидом углерода с быстрым сбросом газа. Увеличение x100. Слева – окраска гематоксилином и эозином, справа – автофлуоресценция коллагена. А, А' – стерилизация 1 час; Б, Б' – стерилизация 6 часов; В, В' – стерилизация 12 часов

Figure 3. Histological preparations of allogeneic tendon grafts sterilized with supercritical carbon dioxide with rapid gas discharge. Magnification x100. Hematoxylin and eosin staining on the left and collagen autofluorescence on the right. А, А' – sterilization for 1 hour; Б, Б' – sterilization for 6 hours; В, В' – sterilization for 12 hours



Рисунок 4. Микроскопические фотографии аллогенного трансплантата сухожилия в культуре ММСК. Увеличение x100. А – ММСК в проходящем свете, стрелками показаны веретеновидные живые клетки на поверхности трансплантата, Б – окраска ММСК трипафлавином-акридино-вым оранжевым. Красной линией отмечена граница ткани трансплантата

Figure 4. Microscopic photographs of allogeneic tendon graft in MMSC culture. Magnification x100. А – MMSCs in transmitted light, arrows show spindle-shaped live cells on the graft surface, Б – staining of MMSCs with tripaflavin-acridine orange. The red line marks the border of the graft tissue

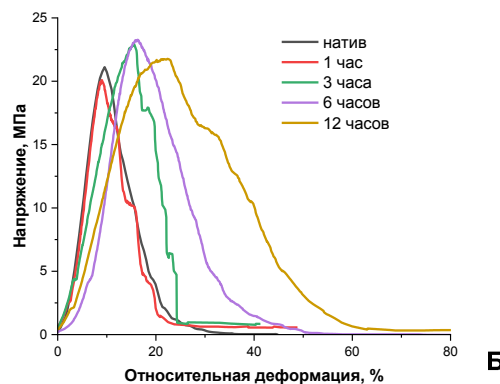
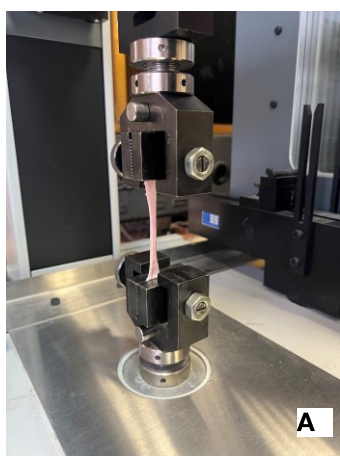


Рисунок 5. Закреплённый в установке образец (А) и кривые зависимости напряжение–деформация для различного времени обработки образцов (Б)
Figure 5. The specimen is fixed in the unit (A) and stress-strain curves for different times of specimen processing (B)

Таблица 1. Влияние продолжительности стерилизации сверхкритическим флюидом диоксида углерода на механические характеристики трансплантатов сухожилий
Table 1. Influence of duration of sterilization by supercritical carbon dioxide fluid on mechanical characteristics of tendon grafts

Время обработки, ч	Нагрузка при разрыве, Н	Модуль Юнга, МПа	Предельная деформация, %	Жесткость, Н/мм	Предельное напряжение, МПа
Контроль	601 ± 80	322 ± 42	63 ± 12	75 ± 8	80 ± 8
1	623 ± 85	313 ± 36	34 ± 10*	80 ± 9	82 ± 10
3	427 ± 60*	193 ± 20*	28 ± 7*	80 ± 9	81 ± 9
6	363 ± 50*	264 ± 21*	30 ± 5*	78 ± 9	79 ± 10
12	332 ± 50*	152 ± 14*	31 ± 10*	83 ± 10	75 ± 10

* $p < 0,05$ относительно контроля

В сухожилиях, взятых от разных доноров, наблюдалась высокая вариация механических параметров. Тем не менее, прослеживается чёткая обратная зависимость между модулем Юнга и продолжительностью стерилизации сухожилий ($r = -0,809$). Таким образом, способность сухожилий к упругой деформации снижается по мере увеличения сроков стерилизации. Это может быть связано не только с повреждением коллагеновых волокон, но также с потерей других компонентов межклеточного матрикса сухожилий, изменением их химического состава. Следовательно, в процесс стерилизации сухожилий сверхкритическим диоксидом углерода необходимо по возможности минимизировать срок обработки.

Закключение

Проведённое исследование показало, что влияние определённых параметров (скорость сброса газа и время обработки в реакторе) при стерилизации трансплантатов сухожилий сверхкритическим диоксидом углерода являются ключевым. С учётом того, что трансплантаты перед стерилизацией обрабатываются криоконсервантом, в процессе стерилизации трансплантат испытывает двойное воздействие криоконсерванта и сверхкритического диоксида углерода. Оба этих фактора могут вызывать повреждение волокон и клеток. Длительная экспозиция диплоидных клеток с ДМСО вызывает значительную деформацию их мембранных и ядерных структур при положительных температурах, кроме того, ДМСО способен вызывать коагуляцию белков [8]. Проведённые нами исследования показали, что выбранная концентрация ДМСО значимо не влияет на сохранность коллагеновых волокон,

следовательно, этот способ криоконсервирования является адекватным для стерильных сухожилий. В процессе стерилизации сверхкритическим диоксидом углерода формируется угольная кислота, которая является слабой, но при этом способна влиять на pH биологических структур. Гистологически снижение pH тканей и клеток выражается в увеличении их сродства с эозином и другими кислотными красителями. В нашей работе мы не отмечали повышенной эозинофильности сухожилий даже в случае сильной деформации волокон. Минимальное время воздействия консервирующего раствора при стерилизации, а также экспозиция аллогенного сухожилия в физиологическом растворе 0,9 % NaCl перед клиническим применением в течение 10–15 минут, позволяет полностью убрать токсический эффект готового к применению трансплантата. Важно отметить, что быстрый сброс давления после процесса стерилизации сильно повреждает архитектуру коллагеновых волокон и разрушает жизнеспособные тендиноциты, в то время как медленная декомпрессия сохраняет анатомию сухожилия и не повреждает структурные элементы ткани.

Выводы

Стерилизация сверхкритическим диоксидом углерода с параметрами: давление в реакторе – 100 атм., температура среды – 35 °C, время обработки – 1 час с последующим медленным сбросом газа может быть рекомендована для получения аллогенных криоконсервированных трансплантатов сухожилий, предназначенных для использования в клинической практике.

Литература [References]

- Воробьев К.А., Божкова С.А., Тихилов Р.М., Черный А.Ж. Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы). *Травматология и ортопедия России*. 2017;23(3):134-147. <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2017-23-3-134-147> [Vorobyev K.A., Bozhkova S.A., Tikhilov R.M., Cherny A.J. Modern methods of processing and sterilization of allogeneic bone tissues (literature review). *Traumatology and orthopedics of Russia*. 2017;23(3):134-147. <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2017-23-3-134-147> (In Russ)]
- Wang S, Wang Y, Song L, Chen J, Ma Y, Chen Y, et al. Decellularized tendon as a prospective scaffold for tendon repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;77:1290-1301. PMID: 28532007 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.279>
- Liu W, Wang B, Cao Y. Engineered Tendon Repair and Regeneration. In: Gomes ME, Reis RL, Rodrigues M.T. (eds.) *Tendon Regeneration: Understanding Tissue Physiology and Development to Engineer Functional Substitutes*. Academic Press. 2015;14:381-412. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801590-2.00014-4>
- Зорников Д.Л., Литусов Н.В., Новоселов А.В. Иммунопатология. Екатеринбург: Изд-во УГМУ; 2017. [Zornikov D.L., Litusov N.V., Novoselov A.V. Immunopathology. Yekaterinburg: Publishing House of ASMU; 2017. (In Russ)]
- Gökler DJ, Faragó D, Szebényi G, Kiss RM, Pap K. The effect of sterilization and storage on the viscoelastic properties of human tendon allografts. *J Biomech*. 2021;127:110697. PMID: 34419827. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2021.110697>
- Baldini T, Caperton K, Hawkins M, McCarty E. Effect of a novel sterilization method on biomechanical properties of soft tissue allografts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2016;24(12):3971-3975. PMID: 25100489. <https://doi.org/10.1007/s00167-014-3221-0>
- Макаров М.С., Сторожева М.В., Боровкова Н.В. Значение автофлуоресценции коллагеновых волокон для оценки биологических свойств тканевых трансплантатов. *Современные технологии в медицине*. 2017;9(2):83-90. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.10> [Makarov M.S., Storozheva M.V., Borovkova N.V. The value of autofluorescence of collagen fibers for assessing the biological properties of tissue grafts. *Modern technologies in medicine*. 2017;9(2):83-90. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.10> (In Russ)]
- Костяев А.А., Мартусевич А.К., Андреев А.А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья). *Научное обозрение. Медицинские науки*. 2016;(6):54-74. [Kostyaev A.A., Martusevich A.K., Andreev A.A. Toxicity of cryoprotectors and cryopreservants based on them for blood and bone marrow components (review article). *Scientific review. Medical sciences*. 2016;(6):54-74. (In Russ)]

Авторская справка**Author's reference****Будаев Антон Аркадьевич**

Научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.

ORCID 0000-0002-5864-5683; BudaevAA@sklif.mos.ru

Вклад автора: обработка полученных результатов, написание текста статьи.

Anton A. Budaev

Researcher of the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3 Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia.

ORCID 0000-0002-5864-5683; BudaevAA@sklif.mos.ru

Author's contribution: processing of the results obtained, writing the text of the article.

Боровкова Наталья Валерьевна

Д-р мед. наук, заведующая научным отделением биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.

Доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова д. 1, Москва, Россия, 117997.

ORCID 0000-0002-8897-7523; BorovkovaNV@sklif.mos.ru

Вклад автора: разработка дизайна исследования, редакция и корректура текста.

Natal'ya V. Borovkova

Doctor of Medical Sciences, Head of the Scientific Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3 Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia.

Associate Professor of the Department of Transplantology and Artificial Organs, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia.

ORCID 0000-0002-8897-7523; BorovkovaNV@sklif.mos.ru

Author's contribution: development of the research design, revision and correction of the text.

Файн Алексей Максимович

Д-р мед. наук, заведующий научным отделением неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.

Профессор кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, ул. Делегатская, 20, стр. 1, Москва, Россия, 127473.

ORCID 0000-0001-8616-920X; FainAM@sklif.mos.ru

Вклад автора: обработка полученных результатов, редакция и корректура текста.

Aleksey M. Fayn

Dr. Sci. (Med.), Head of the Scientific Department of Emergency Traumatology of the Musculoskeletal System, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3 Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia.

Professor of the Department of Traumatology, Orthopedics and Medicine kartastrof, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20 Bldg. 1 Delegatskaya str., Moscow 127473, Russia.

ORCID 0000-0001-8616-920X; FainAM@sklif.mos.ru

Author's contribution: processing of the results obtained, editing and correction of the text.

Николаев Александр Юрьевич

Канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории физической химии полимеров, Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, ул. Вавилова, д. 28, Москва, Россия, 119334.

ORCID 0000-0002-0841-182X; nikolaev@polly.phys.msu.ru

Вклад автора: обработка полученных результатов, написание текста статьи.

Aleksandr Y. Nikolaev

Cand. Sci. (Physical and Mathematical), Senior Researcher at the Laboratory of Physical Chemistry of Polymers, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, 28 Vavilova str., Moscow, 119334, Russia.

ORCID 0000-0002-0841-182X; nikolaev@polly.phys.msu.ru

Author's contribution: processing of the results obtained, writing the text of the article.

Макаров Максим Сергеевич

Канд. биол. наук, старший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.
ORCID 0000-0002-2184-2982; MakarovMS@sklif.mos.ru
Вклад автора: сбор материала, анализ литературы.

Сторожева Майя Викторовна

Научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.
ORCID 0000-0003-1927-2404; StorozevaMV@sklif.mos.ru
Вклад автора: участие в экспериментальной части работы, анализ полученных результатов.

Скуратовская Кристина Ивановна

Младший научный сотрудник отделения неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.
ORCID 0000-0003-3074-453X; SkuratovskayaKI@sklif.mos.ru
Вклад автора: обзор публикаций, написание статьи.

Ваза Александр Юльевич

Канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник отделения неотложной травматологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.
ORCID 0000-0003-4581-449X; VazaAU@sklif.mos.ru
Вклад автора: редакция и корректировка текста, участие в экспериментальной части работы.

Фомичева Ирина Викторовна

Медицинский лабораторный техник, патологоанатомического отделения, Городская клиническая больница № 13, ул. Велозаводская, д. 1/1, Москва, Россия, 115280.
irenaf72@mail.ru
Вклад автора: участие в экспериментальной части работы, подготовка гистологических препаратов.

Черненко Татьяна Витальевна

Канд. мед. наук, заведующая научной лабораторией клинической микробиологии, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.
ORCID 0000-0002-6167-7117; ChernenkayaTV@sklif.mos.ru
Вклад автора: участие в экспериментальной части работы.

Каниболоцкий Александр Алексеевич

Канд. мед. наук, доцент, врач-патологоанатом, заведующий патологоанатомическим отделением, Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, Москва, Россия, 129090.
ORCID 0000-0001-6123-8387; dr.kaa@mail.ru;
Вклад автора: анализ и интерпретация данных патологоанатомического и гистологического исследований, подготовка иллюстраций.

Maksim S. Makarov

Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher at the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3 Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia.
ORCID 0000-0002-2184-2982; MakarovMS@sklif.mos.ru
Author's contribution: collection of material, analysis of literature.

Mayya V. Storozeva

Researcher of the Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Bolshaya Sukharevskaya pl., 3, Moscow, Russia, 129090.
ORCID 0000-0003-1927-2404; StorozevaMV@sklif.mos.ru
Author's contribution: participation in the experimental part of the work, analysis of the results obtained.

Kristina I. Skuratovskaya

Junior Researcher of the Department of Emergency Traumatology of the Musculoskeletal System, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3 Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia.
ORCID 0000-0003-3074-453X; SkuratovskayaKI@sklif.mos.ru
Author's contribution: review of publications, writing an article.

Aleksandr Y. Vaza

Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of the Department of Emergency Traumatology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3 Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia.
ORCID 0000-0003-4581-449X; VazaAU@sklif.mos.ru
Author's contribution: revision and correction of the text, participation in the experimental part of the work.

Irina V. Fomicheva

Medical Laboratory Technician, Pathology Department, City Clinical Hospital № 13, 1/1 Velizavodskaya str., Moscow, 115280, Russia.
irenaf72@mail.ru
Author's contribution: participation in the experimental part of the work, preparation of histological preparations.

Tat'yana V. Chernen'kaya

Candidate of Medical Sciences, Head of the Scientific Laboratory of Clinical Microbiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3 Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia.
ORCID 0000-0002-6167-7117; ChernenkayaTV@sklif.mos.ru
Author's contribution: participation in the experimental part of the work.

Aleksandr A. Kanibolotskiy

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, pathologist, Head of the Pathology Department, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3 Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia.
ORCID 0000-0001-6123-8387; dr.kaa@mail.ru;
Author's contribution: analysis and interpretation of the data of pathologic and histological studies, preparation of illustrations.