DOI: 10.15825/1995-1191-2018-1-79-85

БИОСТАБИЛЬНОСТЬ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ НА ОСНОВЕ СШИТЫХ БИОПОЛИМЕРОВ

Е.А. Немец[1], А.П. Панкина[2], В.А. Сургученко[1], В.И. Севастьянов[1]

[1] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация
[2] АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

Увеличение биостабильности медицинских изделий/материалов на основе белков и их производных, в том числе резорбируемых 2D- и 3D-матриксов для тканевой инженерии и регенеративной медицины, достигается в основном сшивкой глутаровым альдегидом (ГА). Одним из серьезных недостатков стабилизированных ГА изделий является их цитотоксичность, обусловленная следовыми количествами ГА, трудно удаляемых из сшитых биополимерных матриксов, поэтому поиск химических и физических способов сшивки таких медицинских изделий остается актуальной задачей. **Цель:** сравнить влияние различных методов сшивки на цитотоксичность образцов из коллагена и желатина. **Материалы и методы.** Образцы в виде пленок диаметром 30 мм и толщиной ~150 мкм получали методом полива из раствора склерального коллагена (СК) сельскохозяйственных животных I типа или желатина с последующей сушкой при 37 °С до постоянного веса на воздухе. Образцы пористых матриксов в виде трубок из смеси желатина и полиоксибутирата-ко-валерата в соотношении 2 : 1 по весу получали методом электроспиннинга. Исследовали цитотоксичность образцов, структурно стабилизированных пятью способами: 1) дегидротермосшивкой при остаточном давлении 10–20 мм рт. ст. и температуре 120 °С; 2) введением ГА непосредственно в раствор биополимера; 3) парами ГА; 4) парами ГА с последующей инкубацией в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при pH = 7,4; 37 °С; 24 ч; 5) парами ГА с последующей инкубацией в 0,1% растворе лизина при pH = 7,4; 37 °С; 24 ч или в среде DMEM. Цитотоксичность образцов оценивали согласно требованиям межгосударственного стандарта ГОСТ ISO 10993-5-2011 на культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3 с использованием экстрактов из образцов (37 °С; 24 ч) и методом прямого контакта образцов с этими клетками. **Результаты.** Дегидротермообработанные матриксы показали полное отсутствие цитотоксичности. Образцы, фиксированные в растворе ГА в интервале концентраций от 0,01 до 1,0%, проявляли высокий уровень цитотоксичности, не удовлетворяющий требованиям ГОСТ ISO 10993-5-2011. Фиксация коллагеновых и желатиновых матриксов парами ГА в течение 48 ч оказывает минимальное влияние на их цитотоксичность, но с увеличением времени обработки до 72 часов цитотоксичность возрастает до уровня «резкая». При последующей инкубации цитотоксичных образцов из желатина в ФСБ наблюдали снижение цитотоксичности до уровня, удовлетворяющего требованиям ГОСТ ISO 10993-5-2011. Для аналогичного снижения цитотоксичности пленок из коллагена, обработанных парами ГА в течение более 48 ч, требовалась дополнительная инкубация в растворе лизина. **Заключение.** Метод дегидротермосшивки является оптимальным с точки зрения отсутствия цитотоксичности стабилизированных биополимеров, однако область его применения ограничена риском воздействия высоких температур на медико-технические свойства изделий. Фиксация в парах ГА является универсальным и достаточно простым способом обработки медицинских изделий или покрытий на основе биополимеров, но не решает вопрос их цитотоксичности при временах обработки, превышающих 48 ч. Снизить степень цитотоксичности изделий, стабилизированных парами ГА, до значений, удовлетворяющих требованиям ГОСТ ISO 10993-5-2011, позволяет отмывка в буферном растворе в случае желатина или обработка раствором аминокислоты (лизина) в случае коллагена.

Ключевые слова: склеральный коллаген, желатин, цитотоксичность, дегидротермосшивка, глутаровый альдегид, лизин.

Для корреспонденции: Немец Евгений Абрамович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 183-86-62. E-mail: evgnemets@yandex.ru

For correspondence: Nemets Evgenij Abramovich. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (499) 183-86-62. E-mail: evgnemets@yandex.ru

BISTABILITY AND CYTOTOXICITY OF MEDICAL DEVICES BASED ON CROSS-LINKED BIOPOLYMERS

E.A. Nemets[1], A.P. Pankina[2], V.A. Surguchenko[1], V.I. Sevastianov[1]

[1] V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

[2] The Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

The increase in biostability of medical products/materials based on proteins and their derivatives, including resorbable 2D- and 3D-matrices for tissue engineering and regenerative medicine is usually achieved by means of cross-linking with glutaraldehyde (GA). One of the serious flaws of the products stabilized with GA is their cytotoxicity caused by trace amounts of GA which are difficult to remove from cross-linked biopolymer matrices, thus the search for chemical and physical methods of cross-linking of such medical products remains essential. **Aim:** to compare the influence of various cross-linking methods on the cytotoxicity of collagen and gelatin samples. **Materials and methods.** Samples – films with diameter of 30 mm and thickness of ~ 150 μm, – were obtained by irrigation method usingthesolution of scleral collagen (SC) of Type farm animals or with gelatin with the subsequent drying at 37º C until constant weight on air. Samples of porous matrices in shape of tubes of gelatin and polyoxybutirate-co-valerate with the weight ratio 2:1 were obtained by electrospinning. The cytotoxicity of structurally stabilized samples was studied by five methods: 1) dehydrothermal cross-linking with the residual pressure of 10–20 mm Hg and temperature of 120 °C; 2) injection of GA immediately into the biopolymer solution; 3) with GA vapors; 4) with GA vapors with the subsequent incubation in phosphate buffered saline (PBS) with pH = 7.4; 37 °C; 24 h; 5) with GA vapors with the subsequent incubation in 0.1% lysine solution with pH = 7.4; 37 °C; 24 hour in DMEM medium. Cytotoxicity of samples was evaluated according to the requirements of interstate standard GOST ISO 10993-5-2011 on the culture of mice fibroblasts of NIH 3T3 line using extracts from samples (37 °C; 24 h) and by means of direct contact of samples with these cells. **Results.** Matrices treated hydrothermally demonstrated complete absence of cytotoxicity. Samples, fixated in GA solution in the range of concentrations from 0.01 to 1.0% demonstrated a high level of cytotoxicity which does not answer the requirements of GOST ISO 10993-5-2011. Fixation of collagen and gelatin matrices with GA vapors during 48 h influences their cytotoxicity minimally but with the treatment time increased to 72 hours cytotoxicity escalates to severe levels. With the subsequent incubation of cytotoxic gelatin samples in PBS the decrease in cytotoxicity to the levels corresponding with the requirements of GOST ISO 10993-5-2011 was observed. For the analogous decrease in cytotoxicity of collagen films treated with GA vapors during more than 48 h an additional incubation in lysine solution was needed. **Conclusion.** Dehydrothermal cross-linking method is optimal from the view point of absence of cytotoxicity of stabilized biopolymers, however its area of application is limited by the risk of influence of high temperatures on the medico-technical properties of the products. Fixation in GA vapors is a universally applicable and a rather simple method of treatment of medical products or biopolymer-based coatings, but it does not resolve the issue of their cytotoxicity at treatment times exceeding 48 h. Rinsing in buffer solution in case of gelatin or treatment with the amino acid (lysine) solution in case of collagen allow to decrease the level of cytotoxicity of products stabilized with GA vapors to the values corresponding with the requirements of GOST ISO 10993-5-2011.

Key words: scleral collagen, gelatin, cytotoxicity, dehydrothermal cross-linking, glutaraldehyde, lysine.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы актуальным направлением в развитии тканевой инженерии и регенеративной медицины является разработка биосовместимых биополимерных матриксов с заданным и регулируемым временем резорбции в организме. Скорость биорезорбции идеального материала, из которого изготовлен матрикс, должна быть равна скорости замещения матрикса тканями организма [1, 2].

Коллаген или его денатурированную форму – желатин, а также композиции на основе данных полимеров часто используют для разработки биорезорбируемых матриксов [2, 3]. Одно из наиболее важных свойств таких матриксов – способность стимулировать репаративные процессы в поврежденных тканях. Однако существенным недостатком коллагена/желатина и изделий из них является нерегулируемое и часто слишком быстрое время резорбции, а также ограниченный срок функционирования (менее 1 месяца) в условиях живого организма [4].

В целях повышения механических свойств и устойчивости к ферментативной деградации матриксы на основе белков, в том числе коллагена и/или желатина, могут быть сшиты различными метода-

ми, предполагающими образование интра- и интермолекулярных ковалентных связей между функциональными группами, например, амино ($–NH_2$) и/или карбоксильными (–COOH).

К настоящему времени разработано большое количество методов сшивки, которые могут быть разделены на два больших класса: физические и химические.

Среди физических методов стабилизации наибольшее распространение получили ультрафиолетовое облучение (УФ) и дегидротермосшивка (ДТС) [5–8]. Применение этих методов сопровождается увеличением прочности и повышением ферментативной устойчивости на фоне нарушения молекулярной структуры коллагена. Хотя УФ-облучение требует значительно меньших затрат по времени обработки, его применение эффективно лишь для тонких или прозрачных матриксов.

Химические методы, используемые для ковалентной сшивки материалов на основе белков, более разнообразны. Активно применяют карбодиимиды, особенно его водорастворимую форму (ВРК) [9], изоцианаты (преимущественно гексаметилендиизоцианат) [10, 11], эпоксисоединения [11], дженипин – сшивающий агент растительного происхождения [12]. Наиболее часто используемым и хорошо изученным среди сшивающих агентов является глутаровый альдегид (ГА) [11, 13, 14].

Сравнение 16 различных методов стабилизации структуры коллагена показало, что химическая сшивка эффективнее, чем физическая или биологическая [11], при этом эффективность самых распространенных химических сшивающих агентов убывает в следующей последовательности: ГА > ВРК > дженипин [13].

Благодаря высокой степени сшивки ГА на протяжении многих лет является наиболее широко применяемым сшивающим агентом в области биоматериалов [15]. Основной недостаток метода химической сшивки заключается в выделении при имплантации токсических агентов, что особенно опасно в случае ГА [6, 16, 17].

Поэтому с целью снижения токсического эффекта, но при сохранении высокой степени сшивки белка используют пониженную концентрацию ГА [18] или проводят обработку в парах ГА [5, 17].

Ранее нами показано, что дегидротермосшивка и обработка в парах ГА являются эффективными методами сшивки биополимерных материалов [19], но вопрос их цитотоксичности остался открытым.

Целью данной работы явилось проведение сравнительного анализа влияния различных методов сшивки на цитотоксичность образцов из коллагена и желатина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Подготовка образцов из биополимеров, фиксированных различными методами

1.1. Образцы в виде пленок получали методом полива из раствора склерального коллагена сельскохозяйственных животных I типа (СК) (ООО «МакМеди», Россия) или желатина («Sigma-Aldrich», США), предназначенного для работ с культурами клеток. Раствор биополимера (1,5% в 0,2 N уксусной кислоте в случае СК и 5% в дистиллированной воде в случае Ж) предварительно прогревали при 37 °С до вязкотекучего состояния, аликвоту раствора наливали в чашку Петри и высушивали при 37 °С до постоянного веса.

1.2. Образцы пористых матриксов в виде трубок диаметром 4 мм из смеси желатина и сополимера полиоксибутирата-ко-оксивалерата (п(ОБ-со-ОВ)) («Aldrich», США) в соотношении 2:1 по массе были получены методом электроспиннинга из 10% раствора в гексаметиленизопропаноле («Aldrich», США) на установке NANON-01A («МЕСС СО», Япония). Напряжение между электродами 20 кВ, расстояние между электродами 15 см, скорость вращения стержня от 1000 об/мин.

2. Методы стабилизации

2.1. Введение ГА в раствор биополимера (контроль)

Глютаровый альдегид вводили в раствор биополимера в концентрациях от 0,0005 до 1%, высушивали при комнатной температуре до образования 2D-матрикса, затем досушивали при 37 °С до постоянного веса.

2.2. Обработка в парах ГА

Для достижения равновесного набухания образцы инкубировали в дистиллированной воде при комнатной температуре в течение 18 ч. Обработку парами ГА производили, помещая образцы в замкнутую емкость (эксикатор), содержащую 25% раствор ГА, таким образом, чтобы избежать прямого контакта образца с раствором ГА, и инкубировали при комнатной температуре в течение выбранного интервала времени (от 24 до 72 ч).

2.3. Дегидротермосшивка

Высушенные до постоянного веса пленки инкубировали в вакуумном шкафу при остаточном давлении 10–20 мм рт. ст. и температуре 120 °С в течение выбранного интервала времени (от 6 до 24 ч).

2.4. Дополнительная обработка образцов для снижения цитотоксичности образцов после сшивки

Пленочные образцы инкубировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH = 7,4 или в растворе лизина – 1 мг/мл в ФСБ (соотношение «площадь поверхности / объем» 10 мл/см^2) при 37 °С в течение

Таблица

Степень ответной реакции клеток

The degree of cells response

Степень	Реакция	Наблюдения	
0	Отсутствует	Единичные интрацитоплазматические гранулы Пролиферирующих клеток более 90%	Нет лизиса
1	Незначительная	Не больше 20% клеток, круглые, слабо прикрепленные, без интрацитоплазматических гранул Пролиферирующих клеток от 80 до 90%	Лизис не больше 20%
2	Нерезкая	Не больше 50% клеток, круглые, не имеющие интрацитоплазматических гранул Пролиферирующих клеток от 50 до 80%	Лизис не больше 50%
3	Умеренная	Не больше 70% монослоя содержит круглые клетки Пролиферирующих клеток от 30 до 50%	Лизис не больше 70%
4	Резкая	Практически полностью разрушенный монослой Пролиферирующих клеток менее 30%	Лизис больше 70%

24 ч, затем ополаскивали дистиллированной водой и высушивали при 37 °С до постоянного веса и стерилизовали γ-излучением (1,5 Мрад).

Стерильные пористые трубчатые матриксы непосредственно перед испытаниями помещали в стерильный ФСБ, pH = 7,4, и среду DMEM, содержащую набор аминокислот (соотношение «площадь поверхности / объем» 10 мл/см^2) при 37 °С на 24 ч.

3. Исследование на цитотоксичность

Цитотоксичность образцов оценивали в условиях *in vitro* согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-5-2011 [20] на культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3 [20]. Определяли цитотоксичность экстрактов из образцов биополимерных пленок и пористых трубчатых матриксов и методом прямого контакта образцов с клетками [21]. В качестве экстрактанта (модельной среды) использовали стерильный раствор ФСБ, pH = 7,4, время экстракции составляло 24 ч при 37 °С. Отрицательным контролем служил стерильный раствор ФСБ, pH = 7,4, положительным контролем – стандарт цинка одноэлементный водный 10 000 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Все процедуры проводили в асептических условиях.

Подготовка клеток. Фибробласты мыши линии NIH/3T3, полученные из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), культивировали в стандартных культуральных флаконах площадью 25 см^2 (CELLSTAR®GreinerBio-One, Германия), в ростовой среде DMEM, содержащей GlutaMAX™ (Gibco®byLifeTechnologies™, СК), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, SV30160.03, США), антибиотика и антимикотика Anti - Anti (Gibco® by Life Technologies™, США) и 1 мМ HEPES (Gibco® by Life Technologies™, СК) в CO_2-инкубаторе при стандартных условиях: 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1% CO_2. Клетки удаляли с поверхности культурального пластика с помощью диссоциирующего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК). Исходное количество клеток в суспензии определяли с использованием гемоцитометра (камеры Горяева) (МиниМед®, Россия).

Фибробласты высевали в культуральные плоскодонные планшеты (CELLSTAR®Greiner Bio-One, Германия) и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1% CO_2, до образования 80 ± 10% монослоя, после чего вносили в лунки исследуемые экстракты и контроли либо помещали фрагменты исследуемых образцов непосредственно на монослой клеток. Визуально культуру оценивали с помощью бинокулярного инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония).

Результаты. Анализ результатов проводился согласно оценочной шкале степени ответной реакции клеток после инкубации с экстрактами или непосредственного контакта с образцами матриксов согласно ГОСТ ISO 10993.5 (табл.). Отрицательный контроль должен соответствовать степени реакции 0, положительный контроль – 3 или 4. Степень ответной реакции исследуемого образца не должна превышать 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных экспериментальных данных следует, что снижение на три порядка концентрации ГА, вносимого непосредственно в раствор коллагена на стадии, предшествующей формированию образцов в виде пленок, сопровождается лишь незначительным снижением степени их цитотоксичности (рис. 1). При этом в случае прямого контакта исследуемых образцов с монослоем фибробластов NIH/3T3 реакция клеток более острая по сравнению с результатами, полученными при исследова-

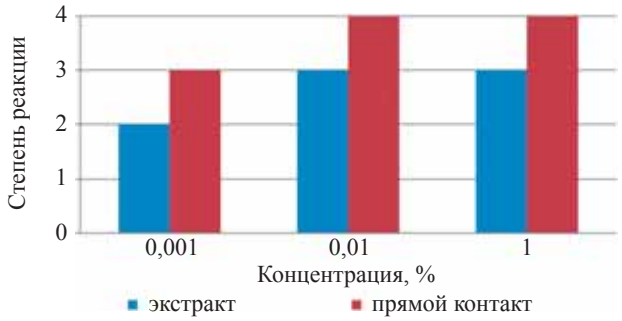

Рис. 1. Влияние концентрации ГА, введенного непосредственно в раствор коллагена, на цитотоксичность коллагеновых пленок

Fig. 1. The effect of the concentration of HA directly introduced into the collagen solution on the cytotoxicity of collagen films

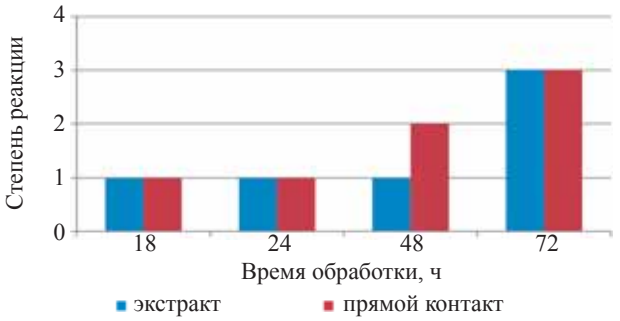

Рис. 2. Влияние времени обработки парами ГА на цитотоксичность пленок из СК

Fig. 2. The influence of GA vapor processing time on the cytotoxicity of SC films

нии цитотоксичности экстрактов (рис. 1). Это свидетельствует о дополнительном вкладе, вносимом в общую цитотоксичность непрореагировавшими группами глютарового альдегида, расположенными на поверхности стабилизированных образцов.

На рис. 2 и 3 приведены результаты изучения влияния времени обработки в парах ГА на цитотоксичность пленок из склерального коллагена I типа и желатина. На сроках обработки менее 18 ч исследуемые образцы из СК демонстрируют полное отсутствие цитотоксичности. В интервале 18–48 ч обработки (рис. 2) их цитотоксичность возрастает до уровней «незначительная» или «нерезкая» (табл.), что является приемлемым результатом с точки зрения требований ГОСТ ISO 10993-5-2011. К 72 ч фиксации в парах ГА цитотоксичность достигает неприемлемых значений («умеренная» или «резкая»), наблюдаются заметный лизис клеток в монослое (70% и более) и существенные изменения в морфологии клеток. Такие материалы не пригодны для клинического применения.

Динамика изменения цитотоксичности желатиновых пленок при обработке в парах ГА (рис. 3) в целом совпадает с данными, полученными для СК образцов, за исключением того, что в случае желатина первые признаки цитотоксичности проявляются несколько позже – через 48 ч обработки, а для пленок СК – через 18 ч (рис. 2).

С целью снижения цитотоксичности пленок из СК и желатина, фиксированных в парах ГА, образцы дополнительно инкубировали в ФСБ (pH = 7,4) при 37 °С в течение 24 ч. Результаты представлены на рис. 4 и 5. Как видно из рис. 4, отмывка в буферном растворе не влияет на цитотоксичность сшитых СК пленок, но снижает цитотоксичности сшитых образцов желатина (рис. 5).

По-видимому, помимо свободного ГА, способного к экстракции в водную фазу, в объеме и на поверхности пленок из биополимеров присутствуют молекулы сшивающего агента, прореагировавшие с

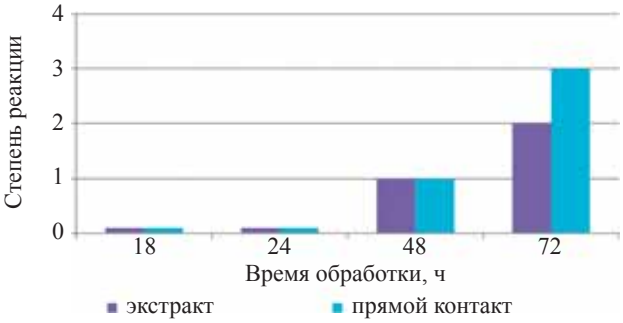

Рис. 3. Влияние времени обработки парами ГА на цитотоксичность пленок из желатина

Fig. 3. The influence of GA vapor processing time on the cytotoxicity of gelatin films

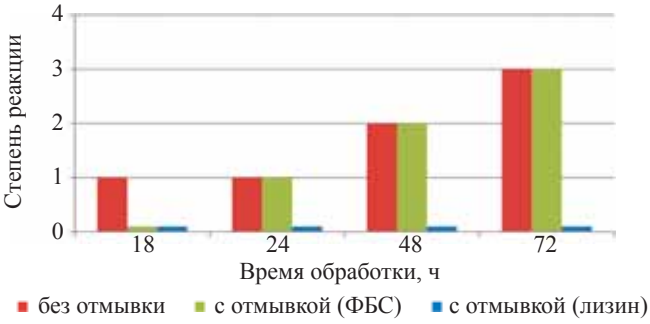

Рис. 4. Влияние отмывки (24 ч, ФБС, 37 °С), а также блокировки непрореагировавших альдегидных групп взаимодействием с лизином (0,1 мг/мл, 24 часа, ФБС, 37 °С) на цитотоксичность пленок из СК (метод прямого контакта)

Fig. 4. Influence of washing (24 hours, PBS, 37 °C), as well as blocking of non-reacted aldehyde groups by interaction with lysine (0.1 mg/ml, 24 hours, PBS, 37 °C) on cytotoxicity of SC films (direct contact method)

аминогруппами белка лишь одной из двух функциональных групп, что также отрицательно влияет на цитотоксичность фиксированных материалов. Таким образом, материалы из СК нуждаются в специальной обработке, позволяющей не только удалить свободный ГА, но и инактивировать непрореаги-

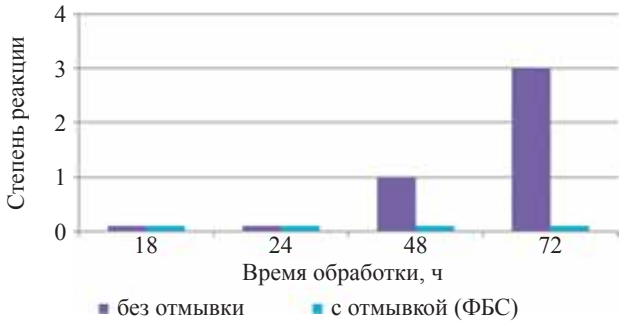

Рис. 5. Влияние отмывки (24 ч, ФБС, 37 °С) на цитотоксичность пленок из желатина (метод прямого контакта)

Fig. 5. Influence of washing (24 hours, FBS, 37 °C) on cytotoxicity of gelatin films (direct contact method)

ровавшие функциональные группы частично прореагировавшего ГА. Например, с этой целью применяют блокировку свободных альдегидных групп соединениями, содержащими первичную аминогруппу ($–NH_2$), чаще всего глутаминовую кислоту [23, 24]. Для достижения данной цели нами была выбрана аминокислота лизин, содержащая в своей структуре две первичные аминогруппы. Действительно, пленки из стабилизированного СК, обработанные раствором лизина, демонстрируют отсутствие цитотоксичности на всех сроках обработки в парах ГА (рис. 4).

Подходы к снижению цитотоксичности, разработанные для образцов в виде пленок, были применены при разработке технологии получения трехмерных пористых матриксов, предназначенных для формирования тканеинженерных конструкций сосудистых протезов малого диаметра. Основу матриксов в виде трубок составляют биосовместимые, биодеградируемые высокомолекулярные материалы природного происхождения: желатин и полиоксибутират-ко-оксивалерат [1].

Нестабилизированный образец матрикса в виде трубки продемонстрировал отсутствие цитотоксичности. В то же время стабилизация в парах ГА в течение 72 часов (рис. 6), сопровождается возрастанием степени цитотоксичности образцов до уровня «умеренная» (табл.), что является неприемлемым результатом с точки зрения требований ГОСТ ISO 10993-5-2011. Обработка ФБС снижает уровень цитотоксичности до приемлемых значений («незначительная»), а обработка средой DMEM, содержащей набор аминокислот, полностью подавляет даже слабую реакцию клеток на контакт со стабилизированным материалом.

Независимо от времени обработки дегидротермосшитые образцы пленок из СК и Ж, а также пористых трубок, сформированных из желатина и п(ОБ-со-ОВ), как в случае экстрактов, так и в условиях прямого контакта исследуемых образцов с монослоем фибробластов показали полное отсутствие цитотоксичности.

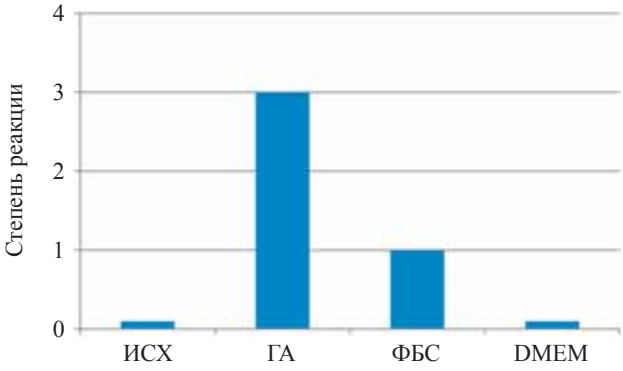

Рис. 6. Влияние отмывки (24 ч, ФБС, 37 °С), а также блокировки непрореагировавших альдегидных групп взаимодействием с аминокислотами (среда DMEM, 24 ч, 37 °С) на цитотоксичность пористого матрикса из П(ОБ-ОВ) + желатин (1 : 2) в виде трубок (метод экстракта)

Fig. 6. Influence of washing (24 hours, PBS, 37 °C), as well as blocking of non-reacted aldehyde groups by interaction with amino acids (DMEM medium, 24 hours, 37 °C) on cytotoxicity of porous matrix from P(OB-OV) + gelatin (1 : 2) in the form of tubes (extract method)

ВЫВОДЫ

Для биополимерных образцов метод дегидротермосшивки является оптимальным с точки зрения отсутствия цитотоксичности стабилизированных изделий, однако область его применения ограничена риском воздействия высоких температур на медико-технические свойства изделий. Фиксация в парах ГА является универсальным и достаточно простым способом обработки медицинских изделий или покрытий на основе биополимеров, но не решает вопроса их цитотоксичности при временах обработки, превышающих 48 ч.

Снизить степень цитотоксичности изделий, стабилизированных парами ГА, до значений, удовлетворяющих требованиям ГОСТ ISO 10993-5-2011, позволяет отмывка в фосфатно-солевом буферном растворе, а в случае их недостаточной эффективности – обработка растворами, содержащими аминокислоты.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Волкова ТГ, Севастьянов ВИ, Шишацкая ЕИ.* Полиоксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины. Ред. В.И. Шумаков. Новосибирск: СО РАН, 2003: 8–36. *Volkova TG, Sevastianov VI, Shishackaya EI.* Polyoxyalkanoates – bioresorbable polymers for medicine. Ed. V.I. Shumakov. SB RASci, Novosibirsk, 2003: 8–36.

2. *Vert M*. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine*. 2009; 20: 437–446.
3. *Tsujimoto H, Tanzawa A, Matoba M, Hashimoto A, Suzuki S, Morita S et al.* The anti-adhesive effect of thermally cross-linked gelatin film and its influence on the intestinal anastomosis in canine models. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater*. 2013; 101: 99–109.
4. *Goissis G, Suzigan S, Parreira DR*. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif. Organs*. 2000; 24: 217–223.
5. *Wess TJ, Orgel JP.* Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. *Thermochimica Acta*. 2000; 365: 119–128.
6. *Park S, Kim SH, Lim HG, Lim C, Kim YJ.* The anti-calcification effect of dithiobispropionimidate, carbodiimide and ultraviolet irradiation cross-linking compared to glutaraldehyde in rabbit implantation models. *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2013; 46: 1–13.
7. *Charulatha V, Rajaram A*. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*. 2003; 24: 759–767.
8. *Weadock KS, Miller EJ, Bellincampi LD, Zawadsky JP, Dunn MG*. Physical crosslinking of collagen fibers: Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 1373–1379.
9. *Powell HM, Boyce ST.* EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. *Biomaterials*. 2006; 27: 5821–5827.
10. *Zeugolis DI, Paul GR, Attenburrow G*. Cross-linking of extruded collagen fibers – A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res*. 2009; 89A: 895–908.
11. *Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, Chabal YJ, Miksan JR, Shreiber DI.* Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *J. Biomed. Mater. Res*. 2008; 87: 308–320.
12. *Wu X Black L, Santacana-Laffitte G, Patrick CW.Jr.* Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res*. 2007; 81: 59–65.
13. *Slusarewicz P, Zhu K, Hedman T.* Kinetic characterization and comparison of various protein crosslinking reagents for matrix modification. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2010; 21: 1175–1181.
14. *Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F.* Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*. 2010; 3: 1863–1887.
15. *Guldner NW, Jasmund I, Zimmermann H, Heinlein M, Girndt B, Meier V. et al.* Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering. *Circulation*. 2009; 119: 1653–1660.
16. *Fathima NN, Baias M, Blumich B, Ramasami T*. Structure and dynamics of water in native and tanned collagen fibers: effect of crosslinking. *Int. J. Biol. Macromol*. 2010; 47: 590–596.
17. *Martinez AW, Caves JM, Ravi S, Li W, Chaikof EL*. Effects of Crosslinking on the Mechanical Properties Drug Release, and Cytocompatibility of Protein Polymers. *Acta Biomater.* 2014; 10: 26–33.
18. *Umashankar PR, Arun T, Kumari TV.* Short duration gluteraldehyde cross linking of decellularized bovine pericardium improves biological response. *J. Biomed. Mater. Res*. 2011; 97A: 311–320.
19. *Немец ЕА, Панкина АП, Севастьянов ВИ.* Сравнительный анализ способов повышения биостабильности пленок коллагена. *Перспективные материалы*. 2017; 3: 26–32. *Nemets EA, Pankina AP, Sevastianov VI.* Comparative analysis of methods for increasing biostability of collagen films. *Advanced materials*. 2017; 3: 26–32.
20. Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*». 2013. Interstate standard GOST ISO 10993-5-2011 «Medical products. Assessment of the biological effects of medical devices. Part 5. A study on the in vitro cytotoxicity». 2013.
21. Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-1-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования». 2013. Interstate standard GOST ISO 10993-1-2011 «Medical products. Assessment of the biological effects of medical devices. Part 1. Evaluation and research». 2013.
22. *Zhu B, Li W, Chi N, Lewis RV, Osamor J, Wang R.* Optimization of Glutaraldehyde Vapor Treatment for Electrospun Collagen/Silk Tissue Engineering Scaffolds. *ACS Omega*. 2017; 2: 2439−2450.
23. *Braile MC, Carnevalli NC, Goissis G, Ramirez VA, Braile DM. In vitro* properties and performance of glutaraldehyde-crosslinked bovine pericardial bioprostheses treated with glutamic acid. *Artif. Organs*. 2011; 35: 497–501.

Статья поступила в редакцию 19.02.2018 г.
The article was submitted to the journal on 19.02.2018