

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**ОТРИМАННЯ БІОСУМІСНИХ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗОВАНИХ
КІСТКОВИХ СКАФOLDІВ**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Корчевої Вероніки Володимирівни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук Кот Л.І.

Робота виконана в лабораторії епігенетики Інституту геронтології
ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України під керівництвом завідувача
лабораторії, канд. біол. наук, наук. співроб. Красенкова Дмитра Сергійовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДПКМ	–	децелюляризований позаклітинний матрикс;
ПКМ	–	позаклітинний матрикс;
ТІ	–	тканинна інженерія;
3DP	–	three-dimensional printing (3D-друк);
BMP	–	bone morphogenetic protein (кістковий морфо генетичний білок);
BCA	–	bicinchoninic acid (біцинхонінова кислота);
DMMB	–	dimethylmethylene blue (диметилметиленовий синій);
DBM	–	demineralized bone matrix (демінералізовані кісткові матрикси);
EDTA	–	ethylene diamine tetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота);
EGTA	–	ethylene glycol tetraacetic acid (етиленглікольтетраоцтова кислота);
SDS-PAGE	–	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію);
TGF- β	–	transforming growth factor beta (трансформуючий фактор росту- β)
VEGF	–	vascular endothelial growth factor (судинний ендотеліальний фактор росту)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	2
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Біологічні основи децелюляризації та біосумісність кісткових скафолдів	7
1.1. Структурно-функціональна організація позаклітинного матриксу кісткової тканини	7
1.1.1. Біохімічний склад та механічні властивості позаклітинного матриксу кісткової тканини.....	8
1.1.2. Роль позаклітинного матриксу в регуляції клітинної проліферації та остеогенезу	9
1.2. Децелюляризація біологічних тканин як метод отримання біоматеріалів.....	11
1.2.1. Основні методи децелюляризації біологічних тканин	12
1.2.2. Застосування децелюляризованого позаклітинного матриксу в тканинній інженерії.....	14
1.3. Оцінка ефективності децелюляризації кісткових скафолдів	16
1.4. Біосумісність децелюляризованих кісткових скафолдів.....	18
1.5. Використання лабораторних тварин для оцінки біоматеріалів <i>in vivo</i>	19
1.6. Сучасні проблеми та перспективи використання децелюляризованих кісткових скафолдів	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	22
2.1. Характеристика експериментальних тварин та біологічних зразків	22
2.2. Отримання та децелюляризація кісткових матриксів	23
2.3. Виділення та кількісне визначення вмісту ДНК.....	25
2.4. Визначення концентрації білка.....	27
2.5. Гетеротопічна імплантація кісткових скафолдів	28
2.6. Оцінка біосумісності імплантованих скафолдів та системної реакції організму.....	29
2.6.1. Рентгенографічна візуалізація скафолдів.....	30
2.6.2. Морфологічний аналіз периферичної крові.....	30
2.7. Статистичний аналіз даних.....	31
РОЗДІЛ 3. Результати дослідження та обговорення	33

3.1. Біохімічна оцінка ефективності децелюляризації кісткових скафолдів...	33
3.1.1. Вміст ДНК у децелюляризованих скафолдах	33
3.1.2. Вміст загального білка у децелюляризованих матриксах	35
3.1.3. Порівняльна оцінка ефективності різних протоколів децелюляризації	38
3.2. Аналіз результатів імплантації кісткових скафолдів, отриманих за різними протоколами децелюляризації	41
3.2.1. Динаміка маси тіла експериментальних тварин після імплантації..	41
3.2.2. Оцінка зміни маси внутрішніх органів мишей після імплантації кісткових скафолдів	43
3.2.3. Макроскопічна оцінка імплантованих скафолдів.....	45
3.2.4. Рентгенографічна характеристика імплантованих скафолдів	49
3.3. Оцінка системної реакції організму на імплантацію.....	56
ВИСНОВКИ	59
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	60

ВСТУП

Відновлення кісткової тканини зазначних дефектів, які виникають унаслідок травм, онкологічних захворювань, інфекцій або вроджених аномалій, залишається актуальною проблемою сучасної медицини, оскільки природні механізми репарації часто є недостатніми для повноцінного відновлення структури та функції тканини. [1]. Традиційні методи лікування кісткових дефектів, – ауто-, ало- та ксенотрансплантація, мають низку обмежень, зокрема, дефіцит донорського матеріалу, ризик імунних реакцій передачі інфекцій, що зумовлює необхідність пошуку альтернативних стратегій [2].

Перспективним напрямом є тканнна інженерія (ТІ), в основі якої лежить використання тривимірних каркасів (скафолдів), здатних забезпечувати адгезію, проліферацію та диференціацію клітин, формуючи сприятливе мікрооточення для регенерації тканин [3]. Особливий інтерес становлять децелюляризовані позаклітинні матрикси (ДПКМ), які зберігають природну архітектоніку та біохімічний склад тканини. Вони містять структурні білки, фактори росту й інші сигнальні молекули, які сприяють інтеграції імплантату в організм [4]. Для кісткової тканини це має важливе значення з огляду на її ієрархічну організацію, яка поєднує органічний компонент (колаген I типу) та мінеральну фазу (гідроксиапатит), забезпечуючи механічні та остеокондуктивні властивості.

Ключовим чинником ефективності таких матеріалів є якість децелюляризації, яка повинна забезпечувати максимальне видалення клітинних компонентів і ДНК за одночасного збереження структури та функціональних властивостей позаклітинного матриксу (ПКМ). Порушення цього балансу може знижувати біосумісність регенеративний потенціал матеріалу [5]. Незважаючи на наявність різних протоколів децелюляризації, їх ефективність щодо кісткової тканини та вплив на біосумісність скафолдів залишаються недостатньо вивченими.

Метою роботи було проаналізувати ефективність різних протоколів децелюляризації губчастої кісткової тканини та оцінити біосумісність отриманих кісткових скафолдів.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

1. Отримати кісткові скафолди з губчастої кісткової тканини астрагалу великої рогатої худоби та провести їх децелюляризацію із застосуванням хімічних, фізичних і комбінованих протоколів.

2. Оцінити ефективність децелюляризації за показниками залишкового вмісту ДНК та загального білка у зразках, а також провести порівняльний аналіз застосованих протоколів на основі співвідношення зазначених показників.

3. Охарактеризувати структурні особливості кісткових скафолдів за даними рентгенографічного аналізу залежно від умов децелюляризації.

4. Оцінити біосумісність кісткових скафолдів у моделі підшкірної імплантації за показниками маси тіла, маси внутрішніх органів та макроскопічних змін.

5. Проаналізувати системну реакцію організму на імплантацію кісткових скафолдів.

Наукова новизна роботи полягала у проведенні комплексної порівняльної оцінки ефективності хімічних і комбінованих протоколів децелюляризації губчастої кісткової тканини з урахуванням як ступеня видалення клітинних компонентів, так і збереження білкового складу ПКМ. Уперше для даного типу матеріалу проаналізовано вплив зазначених протоколів на біосумісність сформованих скафолдів *in vivo*, що дозволило уточнити критерії ефективності децелюляризації кісткової тканини.

Отримані результати можуть бути використані для оптимізації протоколів децелюляризації кісткової тканини з метою створення біосумісних скафолдів для потреб ТІ та регенеративної медицини, а також для розробки підходів до комплексної оцінки ефективності децелюляризації та біосумісності біоматеріалів.

РОЗДІЛ 1

БІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗАЦІЇ ТА БІОСУМІСНІСТЬ КІСТКОВИХ СКАФОЛДІВ

1.1. Структурно-функціональна організація позаклітинного матриксу кісткової тканини

Кісткова тканина є спеціалізованим різновидом сполучної тканини, що виконує низку важливих функцій в організмі, зокрема механічну, опорну, захисну та метаболічну. Вона формує скелет, забезпечує підтримку тіла, захист внутрішніх органів і бере участь у регуляції мінерального обміну. Характерною особливістю кісткової тканини є її здатність до постійного ремоделювання – динамічного процесу, що включає резорбцію старої та формування нової кісткової тканини, що забезпечує адаптацію до механічних навантажень, підтримання та відновлення після ушкоджень [6].

Ключову роль у формуванні структури та властивостей кісткової тканини відіграє ПКМ, який становить її основну масу. ПКМ забезпечує механічну підтримку клітин, формує специфічне мікрооточення та бере участь у регуляції клітинних процесів, зокрема проліферації, диференціації та міграції. Завдяки складній організації він виконує не лише структурну, а й регуляторну функцію, виступаючи активним модератором клітинної поведінки [7].

ПКМ є універсальним компонентом більшості тканин багатоклітинних організмів і має загальні принципи організації незалежно від їх типу. Він складається з аморфної основної речовини та волокнистих структур, занурених у неї, серед яких домінують колагенові, еластичні та ретикулінові волокна. Ці компоненти синтезуються клітинами відповідної тканини та секретуються у міжклітинний простір, де формують тривимірну мережу для забезпечення структурної цілісності тканини [8, 9].

У кістковій тканині ПКМ характеризується особливо складною організацією, оскільки поєднує органічну складову з мінеральною фазою. Основними клітинними елементами є остеобласти, остеоцити та остеокласти, які забезпечують синтез, підтримання та резорбцію матриксу. Остеобласти відповідають за синтез органічних компонентів ПКМ, остеоцити підтримують метаболічну активність тканини та беруть участь у передачі механічних сигналів, тоді як остеокласти здійснюють резорбцію мінералізованого матриксу [6].

ПКМ формує специфічне мікрооточення клітин, яке визначає характер клітинних взаємодій та функціональну активність клітин. Завдяки наявності структурних білків, адгезивних молекул і сигнальних факторів він забезпечує передачу біохімічних та механічних сигналів між клітинами та навколишнім середовищем, підтримуючи гомеостаз кісткової тканини. Крім того, ПКМ виконує роль депо біологічно активних молекул, зокрема факторів росту та сигнальних білків, що беруть участь у регуляції процесів остеогенезу та регенерації [7].

1.1.1. Біохімічний склад та механічні властивості позаклітинного матриксу кісткової тканини

ПКМ кісткової тканини характеризується складною біохімічною організацією, що включає органічну, що становить приблизно 20–30% маси кістки та представлена переважно білками, серед яких домінує колаген I типу. Колагенові волокна формують основний каркас кісткової тканини та визначають її механічні властивості, зокрема міцність на розтяг і еластичність [10]. Окрім колагену, органічний матрикс містить неколагенові білки, які відіграють важливу роль у регуляції мінералізації та клітинно-матричних взаємодій. До таких білків належать остеокальцин, остеопонтин, остеонектин, а також протеоглікани. Ці компоненти беруть участь у процесах

клітинної адгезії, міжклітинної сигналізації та диференціації остеобластів і регуляції формування мінеральної фази кісткової тканини [7, 11].

Неорганічна частина ПКМ представлена переважно кристалами гідроксиапатиту – мінеральної сполуки кальцію та фосфору, яка забезпечує високу механічну міцність кісткової тканини та її стійкість до стискання. Кристали гідроксиапатиту інтегровані в колагенову матрицю, формуючи композитну структуру, у якій органічні та мінеральні компоненти функціонально взаємодоповнюють один одного.

Поєднання цих складових визначає оптимальне співвідношення міцності та пружності кісткової тканини. Колаген забезпечує еластичність та здатність до поглинання механічної енергії, тоді як мінеральна фаза відповідає за твердість і опір стисканню. Така композитна організація дозволяє кістковій тканині витримувати значні механічні навантаження без структурного руйнування [12].

Механічні властивості ПКМ є критично важливими для функціонування скелета та забезпечення його адаптації до змін механічного навантаження. Ця адаптація реалізується через процеси ремоделювання та механотрансдукції.

1.1.2. Роль позаклітинного матриксу в регуляції клітинної проліферації та остеогенезу

Взаємодія клітин із компонентами ПКМ здійснюється через специфічні рецептори клітинної мембрани, серед яких ключову роль відіграють інтегрини. Ці рецептори забезпечують адгезію клітин до матриксу та беруть участь у передачі сигналів до внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Активація інтегринів здатна модулювати експресію генів, регулюючи процеси проліферації та диференціації клітин [13].

ПКМ міститься значну кількість біологічно активних молекул, зокрема факторів росту та цитокінів. Серед них важливе значення мають

трансформуючий фактор росту β (TGF- β), кісткові морфогенетичні білки (BMP) та судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF). Ці молекули беруть участь у регуляції остеогенезу, стимулюють проліферацію клітин і сприяють диференціації мезенхімальних стовбурових клітин у остеобласти [14].

Важливим чинником регуляції клітинної активності є також фізичні властивості ПКМ. Жорсткість і щільність позаклітинного середовища істотно впливають на напрям диференціації клітин. Дослідження показали, що більш жорсткий матрикс сприяє остеогенній диференціації мезенхімальних стовбурових клітин і формуванню кісткової тканини, тоді як м'якше мікрооточення може стимулювати розвиток клітин інших типів [15]. Цей процес реалізується через механотрансдукцію – механізм перетворення механічних сигналів у біохімічні, що забезпечує адаптацію клітин до фізичних характеристик середовища.

У процесах регенерації кісткової тканини ПКМ виступає активним учасником відновлення пошкоджених структур. У відповідь на ушкодження активуються остеобласти та остеопрогениторні клітини, які синтезують компоненти матриксу, зокрема колаген I типу, що слугує основою для подальшої мінералізації та відновлення кісткової тканини. Крім того, такі компоненти як фібронектин та ламінін, забезпечують адгезію клітин і сприяють їх міграції до зони ушкодження, що є необхідною умовою ефективної регенерації тканини [16, 17].

Таким чином, ПКМ відіграє ключову роль у регуляції клітинної активності, формуванні тканинної структури та процесах регенерації. Його здатність формувати специфічне мікрооточення та забезпечувати передачу сигналів між клітинами і навколишнім середовищем визначає його значення у сучасних підходах регенеративної медицини та ТІ. У зв'язку з цим природні компоненти ПКМ розглядаються як перспективна основа для створення біоматеріалів, здатних відтворювати властивості нативних тканин.

1.2. Децелюляризація біологічних тканин як метод отримання біоматеріалів

Децелюляризація біологічних тканин є одним із перспективних напрямів сучасної регенеративної медицини та ТІ. Суть методу полягає у видаленні клітинних компонентів із тканини або органа при одночасному збереженні тривимірної архітектури та, максимально можливо, біохімічного складу ПКМ. Як вихідний матеріал зазвичай використовують цілі органи або фрагменти тканин, що дозволяє отримати скафолди зі збереженою природною архітектонікою, необхідною для подальшої клітинної колонізації та функціональної інтеграції [5].

Процес децелюляризації, як правило, є тривалим і багатостадійним, оскільки потребує проникнення реагентів у всі клітинні структури та їх повного видалення. Тривалість обробки зростає зі збільшенням розміру зразка, що водночас підвищує ризик пошкодження компонентів ПКМ під дією хімічних або ферментативних агентів.

Джерелами отримання ДПКМ можуть бути тканини людини (алотрансплантати), тварин (ксенотрансплантати), а також лабораторних моделей. Для кісткової тканини поширеним є демінералізований матрикс із тканин великої рогатої худоби, який розглядається як перспективний матеріал для відновлення кісткових дефектів [18].

Отримання ДПКМ включає підготовку матеріалу, видалення клітинних компонентів, очищення від реагентів, стерилізацію та контроль якості. Критеріями ефективної децелюляризації є максимальне видалення клітинних елементів при збереженні структури, механічних властивостей і біохімічного складу матриксу. Водночас надмірна щільність структури може обмежувати клітинну інфільтрацію, тому в окремих випадках застосовують її контрольовану модифікацію.

Альтернативним підходом є використання подрібнених або гомогенізованих тканин із формуванням матрикс-похідних матеріалів у

вигляді порошків або гідрогелів, що застосовуються в технологіях 3D-друку та електроспінінгу. Такий підхід супроводжується втратою природної архітекtonіки, але дозволяє отримати матеріали з заданими функціональними властивостями [19].

Сфера застосування децелюляризованих матриксів є надзвичайно широкою: інтактні тканинні скафолди використовують для трансплантації, матрикси у вигляді пластин або патчів – для реконструкції м'яких тканин і серця, демінералізовані кісткові матрикси – для заповнення кісткових дефектів, гідрогелі на основі ПКМ – як ін'єкційні матеріали з регенеративними властивостями. Крім того, такі матрикси можуть слугувати носіями клітин як у моделювання *in vitro*, так і за умов застосування *in vivo* [20].

Отже, вибір підходу до децелюляризації та методів подальшої обробки визначається кінцевою метою використання матеріалу. Кожен із підходів – від інтактних тканин до порошкоподібних форм – має свої переваги та обмеження, які необхідно враховувати при розробці біоматеріалів для конкретних біомедичних застосувань [21].

1.2.1. Основні методи децелюляризації біологічних тканин

Для видалення клітинних компонентів із біологічних тканин застосовують фізичні, хімічні та ферментативні методи децелюляризації. Кожен із них характеризується специфічними механізмами дії, перевагами та обмеженнями. У сучасних протоколах, як правило, використовують комбінацію кількох методів, що дозволяє забезпечити ефективне видалення клітинного матеріалу при максимальному збереженні структурної організації та біохімічного складу ПКМ.

Фізичні методи децелюляризації ґрунтуються на механічній або температурній дії на тканину, що приводить до руйнування клітинних

мембран та вивільнення внутрішньоклітинного вмісту. Одним із найбільш поширених підходів є цикли заморожування–розморожування. У процесі заморожування утворюються кристали льоду, які пошкоджують клітинні мембрани та внутрішньоклітинні структури, тоді як подальше розморожування сприяє лізису клітин полегшує видалення їх компонентів [22].

До фізичних методів також належать механічна агітація, перфузійне промивання тканин, ультразвукова обробка та дія високого гідростатичного тиску. Перфузійні методи базуються на подачі розчинів через судинну мережу тканини, що забезпечує рівномірну доставку реагентів і ефективно видалення клітинних залишків, особливо в добре васкуляризованих органах [23]. Застосування високого гідростатичного тиску викликає руйнування клітинних мембран, при відносному збереженні структури білків ПКМ, що робить цей підхід перспективним у регенеративній медицині [24, 25]. Ультразвукова обробка, заснована на явищі кавітації, сприяє деструкції клітинних мембран та полегшує видалення клітинних компонентів. Водночас фізичні методи, як правило, не забезпечують повного видалення клітинного матеріалу, тому їх використовують як допоміжний етап у комплексних протоколах.

Хімічні методи передбачають застосування реагентів, що руйнують клітинні мембрани та екстрагують внутрішньоклітинні компоненти [18]. Найбільш поширеними є детергенти — поверхнево-активні речовини, які порушують цілісність мембран. У протоколах децелюляризації використовують аніонні (SDS), нейонні (Triton X-100) та йонні (дезоксихолат натрію) детергенти [26]. Вони ефективно видаляють ліпідні та білкові компоненти, однак при тривалій дії можуть пошкоджувати структуру матриксу, зокрема глікозаміноглікани та білки.

До хімічних підходів також належать методи осмотичного шоку, які базуються на чергуванні гіпотонічних і гіпертонічних розчинів. Така дія приводить до порушення осмотичного балансу клітин і їх руйнування,

водночас відносно зберігаючи структуру волокнистих білків матриксу, зокрема колагену [27]. У ряді випадків застосовують також кислоти та луги, однак їх використання потребує обережності через можливий негативний вплив на структуру ПКМ.

Ферментативні методи базуються на застосуванні ферментів, які розщеплюють клітинні структури. Протеолітичні ферменти (наприклад, трипсин) руйнують білки клітинних контактів, тоді як нуклеази (ДНКазі, РНКазі) забезпечують деградацію нуклеїнових кислот і зменшення їх залишкового вмісту [28]. Поєднання ферментативних і хімічних підходів підвищує ефективність децелюляризації при відносному збереженні структури матриксу.

Ефективність децелюляризації значною мірою залежить від типу тканини. Особливу складність становить кісткова тканина через її мінералізовану структуру та високу щільність колагенового каркасу. У зв'язку з цим у протоколах часто застосовують попередню демінералізацію, що підвищує доступність матриксу для подальшої обробки [20, 29].

1.2.2. Застосування децелюляризованого позаклітинного матриксу в тканинній інженерії

На сьогодні ДПКМ розглядається як один із найбільш перспективних біоматеріалів у тканинній інженерії та регенеративній медицині завдяки здатності відтворювати властивості нативного позаклітинного середовища [30].

Скафолди на основі ДПКМ виконують не лише роль пасивного каркасу, але й виступають функціонально активними елементами регенерації. Їх тривимірна структура забезпечує умови для адгезії клітин, їх міграції та інфільтрації, а також транспорт поживних речовин і метаболітів [31].

Переваги ДПКМ особливо очевидні при порівнянні з синтетичними матеріалами. На відміну від них, він зберігає природну мікроархітектуру тканини, включаючи просторову організацію волокон, пористість і механічні характеристики. Крім того, у складі ДПКМ частково зберігаються біологічно активні молекули, що сприяють регуляції клітинної поведінки [32].

Завдяки своїм властивостям ДПКМ має широкий спектр застосувань у ТІ. Його використовують для відновлення різних типів тканин, зокрема хрящової, м'язової та судинної, а також у створенні біологічних клапанів серця. Матрикс-похідні біоматеріали у вигляді біопротезів та конструкцій для відновлення м'яких тканин, включаючи великі дефекти шкіри, вже знайшли клінічне застосування [33].

Особливе значення має використання ДПКМ у регенерації кісткової тканини, зумовлено складною ієрархічною організацією кісткового матриксу, який поєднує органічні та мінеральні компоненти. Збереження цієї структури після децелюляризації створює сприятливі умови для адгезії остеогенних клітин та індукції остеогенезу. Поєднання ДПКМ із мезенхімальними стовбуровими клітинами або факторами росту дозволяє підвищити ефективність регенерації та сприяє формуванню функціонально повноцінної кісткової тканини [34]. Експериментальні дослідження показали, що клітини, культивовані на матрикс-похідних скафолдах, характеризуються підвищеною остеогенною активністю, зокрема, підвищеною експресією маркерів остеогенезу, таких як лужна фосфатаза, остеокальцин і остеопонтин [35, 36].

ДПКМ також сприяє ангиогенезу, забезпечуючи формування судинної мережі у зоні регенерації [37]. У цьому контексті ДПКМ виконує подвійну функцію: слугує структурною основою для росту нової тканини та одночасно сприяє стимуляції ангиогенезу.

Подальший розвиток цього напрямку пов'язаний із поєднанням ДПКМ із сучасними біоінженерними технологіями. Зокрема, використання компонентів матриксу у складі біоінків відкриває перспективи тривимірного біодруку тканинних конструкцій, що відтворюють мікроархітектуру

нативних тканин [38]. Крім того, створення композитних матеріалів на основі ДПКМ у поєднанні з природними або синтетичними полімерами дозволяє оптимізувати механічні властивості скафолдів і підвищити їх стабільність у зоні імплантації [39].

Таким чином, ДПКМ є біоінструктивним матеріалом із високим потенціалом у тканинній інженерії.

1.3. Оцінка ефективності децелюляризації кісткових скафолдів

Ефективність децелюляризації є ключовим чинником, що визначає можливість використання матеріалів у ТІ. Її оцінка є обов'язковим етапом через ризик імунної відповіді, пов'язаної із залишковими клітинними компонентами. Наявність залишкових клітинних структур може викликати імунну відповідь організму після імплантації, тому оцінка ступеня децелюляризації є обов'язковим етапом дослідження біоматеріалів. Оцінювання проводять із використанням морфологічних, молекулярних, біохімічних і механічних методів, що дозволяє всебічно охарактеризувати стан ПКМ після обробки.

Одним із основних критеріїв є визначення залишкового вмісту ДНК у тканині. Вважається, що ефективно децелюляризований матрикс повинен містити менше ніж 50 нг ДНК на 1 мг сухої тканини, а довжина фрагментів ДНК не повинна перевищувати 200 пар основ. Перевищення цих показників може свідчити про недостатню ефективність децелюляризації та потенційну імуногенність матеріалу [5].

Морфологічна оцінка включає гістологічні методи дослідження, зокрема фарбування гематоксиліном та еозином, що дозволяє виявити клітинні ядра та оцінити ступінь їх видалення. За відсутності клітинних ядер можна зробити висновок про ефективну децелюляризацію. Для більш чутливого

виявлення залишкових нуклеїнових кислот застосовують флуоресцентні барвники, такі як DAPI або Hoechst, які специфічно зв'язуються з ДНК [40].

Для аналізу мікроструктури децелюляризованих матеріалів широко застосовується скануюча електронна мікроскопія, яка дозволяє оцінити пористість матриксу, організацію колагенових волокон та ступінь збереження тривимірної архітектури тканини, що є критично важливим для адгезії та проліферації клітин [5, 41].

Оцінки макро- та мезоструктури матеріалу здійснюється за допомогою рентгенологічних методів. Рентгенографія дозволяє визначити загальну щільність і цілісність матеріалу, а також оцінити його взаємодію з навколишньою кістковою тканиною в умовах *in vivo*, хоча характеризується обмеженою роздільною здатністю [42]. Більш детальну інформацію забезпечує комп'ютерна томографія (КТ), яка дозволяє отримувати пошарові тривимірні зображення, оцінюючи об'єм, щільність і просторову організацію матеріалу, а також ступінь його інтеграції з кістковою тканиною. Особливе значення має мікрокомп'ютерна томографія (мікро-КТ), що забезпечує високоточний аналіз мікроархітектури, включаючи пористість, розмір пор і їх взаємозв'язок [43–45].

Біохімічна оцінка спрямована на визначення ступеня збереження компонентів ПКМ. З цією метою застосовують гідроксипроліновий аналіз для кількісної оцінки колагену, диметилметиленового синього (DMMB) — для визначення глікозаміногліканів, а також методи аналізу білків, зокрема SDS-PAGE та BCA [46]. Збереження цих компонентів є важливим для підтримання біологічної активності матриксу.

Окрему увагу приділяють оцінці механічних властивостей децелюляризованих матеріалів. Визначають такі параметри, як міцність на розтягування, модуль пружності та жорсткість, використовуючи універсальні випробувальні машини та спеціалізовані механічні тестери. Отримані навантажувально-деформаційні характеристики дозволяють оцінити відповідність матеріалу функціональним вимогам, особливо у випадку

кісткових скафолдів, які повинні витримувати значні механічні навантаження [47].

1.4. Біосумісність децелюляризованих кісткових скафолдів

Біосумісність визначає здатність матеріалу взаємодіяти з тканинами без розвитку токсичних або імунних реакцій та забезпечувати інтеграцію *in vivo*. Початковим етапом оцінки є дослідження цитотоксичності *in vitro*, що дозволяє стандартизовано оцінити потенційний вплив матеріалу на клітини [48]. Ці методи високочутливі та дають змогу виявити навіть незначні концентрації токсичних речовин, що можуть вивільнитися зі скафолду.

Для оцінки цитотоксичності застосовують як непрямі (екстракційні), так і прямі контактні методи. Екстракційний підхід передбачає інкубацію біоматеріалу в культуральному середовищі з подальшим впливом отриманого екстракту на клітини. Оцінювання здійснюють за морфологією, життєздатністю, проліферативною активністю та метаболічними показниками клітин (МТТ-тест). Методи прямого контакту дозволяють дослідити безпосередню взаємодію клітин із поверхнею скафолду, включаючи адгезію, міграцію та розподіл клітин у структурі матеріалу, що наближає експериментальні умови до фізіологічних [49, 50].

Для підвищення релевантності результатів доцільно використовувати клітинні лінії, що відповідають тканинному походженню матеріалу. Зокрема, при дослідженні кісткових скафолдів застосовують остеобласти або клітини з остеобласто подібними властивостями, що дозволяє адекватно оцінити специфічні клітинні реакції [51].

Повноцінна оцінка біосумісності потребує проведення досліджень *in vivo*, які дозволяють оцінити системну реакцію організму на імплантацію матеріалу. Основними показниками є інтенсивність запальної відповіді,

ступінь клітинної інфільтрації, формування фіброзної капсули та характер ремоделювання скафолду. Відсутність вираженої імунної реакції та поступове заміщення матеріалу власною тканиною свідчать про належну біосумісність матеріалу [49].

Найбільш інформативним етапом оцінки є клінічне застосування децелюляризованих матеріалів у людини, однак воно пов'язане з суворими етичними та правовими вимогами і можливе лише після успішного проходження доклінічних досліджень [52].

Застосування демінералізованих кісткових матриксів продемонструвало їх задовільну біосумісність, остеокондуктивні властивості та здатність до ремоделювання без розвитку виражених імунних реакцій [53]. Водночас більш складні децелюляризовані кісткові скафолди, особливо у поєднанні з клітинними технологіями, переважно перебувають на стадії доклінічних або ранніх клінічних досліджень [54]. Це зумовлено необхідністю вирішення низки завдань, зокрема забезпечення достатньої механічної міцності, васкуляризації та ефективної інтеграції матеріалу в умовах фізіологічного навантаження [55].

1.5. Використання лабораторних тварин для оцінки біоматеріалів *in vivo*

Експериментальні дослідження на тваринах є ключовим етапом доклінічної оцінки ДПКМ, що забезпечує перехід від досліджень *in vitro* до умов цілісного організму та дозволяє прогнозувати імунологічні й токсичні реакції у людини [56].

Важливою умовою адекватної оцінки є відтворення клінічно релевантних умов імплантації. Децелюляризовані кісткові матрикси імплантують у ділянки дефектів із використанням стандартних хірургічних підходів, що дозволяє оцінити їх поведінку в умовах фізіологічного

навантаження та взаємодії з кістковою тканиною. Вираженість реакції організму визначається властивостями скафолду, зокрема його структурою, хімічним складом, механічною стабільністю та ступенем децелюляризації [57].

Оцінка біосумісності *in vivo* базується на аналізі локальних і системних реакцій організму, включаючи клітинну інфільтрацію, склад запального інфільтрату, адгезію клітин і характер ремоделювання тканини. Важливе значення має фенотип макрофагів і профіль цитокінів, що відображають напрямок запальної відповіді та регенераторний потенціал. Для цього застосовують гістологічні, імуногістохімічні та молекулярні методи [58-59].

Результати експериментальних досліджень свідчать, що за умови ефективного видалення клітинних компонентів ДПКМ характеризуються високим рівнем біосумісності [60]. Вони здатні підтримувати міграцію клітин господаря, сприяти неоангіогенезу та поступово ремоделюватися з утворенням функціонально повноцінної тканини. Для кісткових скафолдів це має особливе значення, оскільки їх ефективність визначається здатністю забезпечувати остеокондукцію та інтеграцію з навколишньою кістковою тканиною.

Водночас характер біологічної відповіді може варіювати залежно від типу матриксу та якості його обробки. Наявність залишкових клітинних компонентів або порушення структури матриксу можуть індукувати запальну реакцію, а в окремих випадках — тромбоутворення (для васкуляризованих тканин) [61]. У деяких експериментальних моделях спостерігалася локалізована неспецифічна запальна інфільтрація, яка за відсутності системної імунної відповіді та за умови подальшого ремоделювання не перешкоджала інтеграції матеріалу [58].

Важливим аспектом є вибір адекватної експериментальної моделі. Найбільш інформативними є моделі, наближені до фізіології людини, зокрема свині, тоді як підшкірні імплантації мають обмежену

інформативність через відсутність специфічного кісткового мікрооточення та механічного навантаження [63].

1.6. Сучасні проблеми та перспективи використання децелюляризованих кісткових скафолдів

Незважаючи на значний прогрес у дослідженні ДПКМ, його клінічне застосування обмежується низкою проблем, зокрема імуногенністю, контролем біодеградації та необхідністю комплексної оцінки властивостей матеріалу. Ефективність застосування децелюляризованих кісткових скафолдів значною мірою визначається якістю децелюляризації. Неповне видалення клітинних компонентів, наявність залишкової ДНК або імуногенних структур, зокрема α -Gal-епітопів чи вірусних елементів у ксеногенних матеріалах, можуть індукувати імунну відповідь та порушувати процеси остеointegraції [64, 65].

Суттєвим обмеженням є переважання досліджень на дрібних лабораторних тваринах, що ускладнює екстраполяцію результатів на клінічні умови, особливо з урахуванням механічного навантаження на кісткову тканину. У зв'язку з цим перспективним є використання великих тваринних моделей та комп'ютерного моделювання [58].

Додатковою проблемою залишається відсутність уніфікованих протоколів децелюляризації та методів оцінки, що ускладнює порівняння результатів і стримує клінічне впровадження [59].

Водночас поєднання ДПКМ з клітинними технологіями, факторами росту та методами тривимірного біодруку відкриває перспективи створення індивідуалізованих біоінженерних конструкцій із покращеними остеointегративними та регенераторними властивостями [60].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика експериментальних тварин та біологічних зразків

Дослідження проведено на 15 білих аутбредних мишах-самцях лінії CD-1 віком 20-31 тиждень із середньою масою тіла $41,85 \pm 0,72$ г. Тварини були отримані з експериментальної біологічної клініки (віварію) ДУ "Інститут геронтології НАМН України". Перед початком експерименту всі тварини проходили десятиденний карантин із моніторингом стану здоров'я.

Для дослідження відбирали лише клінічно здорових особин без видимих ознак патології з нормальною руховою активністю. Усі експериментальні процедури проводили відповідно до міжнародних етичних стандартів, зокрема принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Strasbourg, 1986), а також згідно із вимогами Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Лабораторних тварин утримували в індивідуальних вентиляваних пластикових клітках за стандартних умов: температура 22-24°C, відносна вологість 40-60%, 12-годинний освітловий (день/ніч). Годування здійснювали стандартним гранульованим кормом із вільним доступом до очищеної питної води (*adlibitum*). Як підстилку використовували знепилену деревну стружку, яку регулярно замінювали.

Ідентифікацію тварин проводили за допомогою вушного мічення. Біологічними зразками у дослідженні слугували децелюляризовані кісткові скафолди з губчастої кісткової тканини та піддані подальшій експериментальній обробці.

2.2. Отримання та децелюляризація кісткових матриксів

Об'єктом дослідження була губчаста кісткова тканина – астрагал великої рогатої худоби віком 24 місяці. Первинний біологічний матеріал придбано на місцевому ринку (м. Київ, Україна). Після транспортування в охолоджену стані зразки зберігали за температури -20°C в морозильній камері SE10-45 (Tefcold, Данія) з метою збереження їх структурно-функціональних властивостей.

Перед початком експерименту кісткову тканину розморожували, після чого механічно очищали від залишків м'яких тканин та фрагментували до розмірів близько $1-1,5\text{ см}^3$ за допомогою пилки (12 TPI, Mastertool, Китай). Отримані зразки тричі відмивали у відповідних розчинах на орбітальному шейкері OS-20 (Joanlab, Китай) за температури $+4^{\circ}\text{C}$ та швидкості обертання 100 об/хв протягом ночі. Співвідношення об'єму розчину до об'єму зразка становило 10:1. Для подальшої обробки використовували різні середовища залежно від методу: для хімічної децелюляризації – фосфатно-сольовий буфер (PBS, Sigma, США), для фізичної – 0,9% розчин NaCl.

На основі аналізу сучасних літературних даних було відібрано та чотири протоколи децелюляризації, які відрізнялися концентрацією реагентів, тривалістю інкубації та типом дії. У більшості протоколів використовували подібні реагенти, змінюючи умови їх застосування. Протоколи умовно позначено як № 1–4. У якості контролю використовували нативну губчасту кісткову тканину після демінералізації у 0,6 М HCl.

Протокол №1 (0,5% Triton X-100, 12 год)

Зразки інкубували у стерильних ємностях об'ємом 200 мл, що містили 100 мл ddH₂O (MQ) при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 24 год на орбітальному шейкері (100 об/хв). Далі їх переносили у 0,5% розчин Triton X-100 у PBS (Sigma-Aldrich, США) на 12 год. Після цього проводили повторну інкубацію у ddH₂O (MQ) за аналогічних умов. Наступним етапом було дворазове

інкубування в 0,1% Triton X-100 у 3% NaCl протягом 48 год із заміною розчину через 24 год. Завершальним етапом було п'ятиденне промивання зразків у PBS за кімнатної температури на орбітальному шейкері (100 об/хв) із щоденною заміною буфера.

Протокол № 2 (0,5% Triton X-100, 12 год, демінералізація та деліпідація)

Початкові етапи відповідали Протоколу № 1. Після завершального промивання у PBS зразки піддавали демінералізації у 0,6 М розчині HCl протягом 53 год за кімнатної температури та постійному струшуванні (100 об/хв). Далі проводили деліпідацію в ізопропанолі. Після цього зразки промивали у PBS протягом 5 днів за аналогічних умов із щоденною заміною буфера.

Протокол №3 (1% Triton X-100, 6 год, ультразвукова обробка)

Зразки поміщали у сонікатор Degas DR-LD 20 (Deui, Китай), що містив 1% Triton X-100 у PBS. Сонікацію проводили протягом 3 год за температури 46-52 °C. Після цього зразки промивали у PBS за кімнатної температури на орбітальному шейкері (100 об/хв) протягом 5 днів із щоденною заміною буфера.

Протокол № 4 (1% Triton X-100, 6 год, демінералізація)

Початкові етапи відповідали Протоколу № 3. Після промивання у PBS зразки піддавали демінералізації у 0,6 М розчині HCl протягом 53 год за кімнатної температури та постійного струшування(100 об/хв). Завершальним етапом було промивання зразків у PBS за температури +4°C протягом 3 днів із щоденною заміною буфера.

2.3. Виділення та кількісне визначення вмісту ДНК

Виділення ДНК децелюляризованих кісткових скафолдів проведено за допомогою методу фенол-хлороформної екстракції з модифікаціями [66].

Використані реактиви: лізуючий буфер: 5 мМ Tris-HCl, рН 7,6; 25 мМ EDTA, рН 8,0; 5 М NaCl, 10% SDS, ПротеїназаК (New England Biolabs, США), 3М ацетат натрію, рН 7,5; суміш фенол : хлороформ : ізоаміловий спирт (25:24:1), фенол (Thermo Fisher Scientific, США), хлороформ (Lotte, Корея), ізопропанол (INEOS, Німеччина), 70% етанол, деіонізована вода.

Обладнання: автоматичні дозатори (Thermo Fisher Scientific, США), одноразові наконечники, мікропробірки (Eppendorf), центрифуга-вортекс «Мікроспін» FV-2400 (Biosan, Латвія), термостат типа «Драй-блок» TDB-120 з блоком А-103 (Biosan, Латвія), центрифуга (Eppendorf 5424), настільна центрифуга з охолодженням (Eppendorf 5417R).

Перед виділенням ДНК зразки промивали у деіонізованій воді (100 мл) за температури +4°C на орбітальному шейкері (100 об/хв) із заміною води кожні 24 год (загалом 4 цикли). Після промивання зразки висушували під витяжкою та інкубували за температури 45°C протягом 40 хв.

Процедура виділення ДНК

Зразки подрібнювали до однорідної маси, переносили у мікропробірки та додавали 300 мкл ddH₂O (MQ). Лізуючий буфер готували відповідно до таблиці 2.1.

До кожної пробірки додавали по 360 мкл лізуючого буфера та інкубували за температури 37°C протягом 144 год. Далі додатково додавали по 366 мкл лізуючого буфера та інкубували за температури 55°C протягом 2 год. Після цього пробірки інкубували за температури 95°C протягом 10 хв. Зразки центрифугували при 12000 g протягом 10 хв після чого супернатант переносили у чисті пробірки, а осад видаляли. До супернатанту додавали 66 мкл 3 М ацетату натрію (рН 7,5) та перемішували.

Таблиця 2.1

Схема приготування лізуючого буфера

Компонент, мкл	1	6	10	13
Буфер для лізису	300	1800	3000	3300
SDS	66	396	660	858
Протеїназа К	1	6	10	13

Далі вносили рівний об'єм (близько 600мкл) суміші фенол : хлороформ : ізоаміловий спирт (25:24:1) та обережно перемішували інвертуванням до утворення однорідної фази. Після центрифугування при 12000 g протягом 10 хв (за кімнатної температури) відбирали верхню водну фазу у нові пробірки та додавали рівний об'єм хлороформу (~600 мкл). Після повторного центрифугування (12 000 g протягом 10 хв) верхню фазу переносили у чисті пробірки, попередньо додавши 20 мкл 5 М NaCl.

Осадження ДНК здійснювали шляхом додавання одного об'єму охолодженого (-20°C) ізопропанолу з подальшим перемішуванням інвертуванням 30 с. За відсутності видимого осаду зразки інкубували за температури -20°C протягом 2 год або залишали на ніч. Після цього пробірки центрифугували при максимальній швидкості протягом 30 хв.

Осад ДНК що утворювався у вигляді білуватої маси, промивали 70% етанолом (1 мл) із подальшим центрифугуванням при 5000 g протягом 1 хв. Супернатант видаляли, а осад підсушували за температури 65°C , уникаючи пересушування. Для регідратації ДНК осад ресуспендували у 50 мкл деіонізованої води. За потреби розчинення проводили протягом 24–48 год. Зразки зберігали за температури $+4^{\circ}\text{C}$ (до 1 тижня) або за -20°C для тривалого зберігання.

Кількісне визначення ДНК проводили з використанням флуоресцентного барвника SYBR Green I, який специфічно зв'язується з

дволанцюговою ДНК (dsDNA). Інтенсивність флуоресценції зростає пропорційно концентрації ДНК, що дозволяє здійснювати її точне кількісне визначення. Вимірювання проводили за допомогою мультидетекторного мікропланшетного рідера Varioskan flash (Thermo Fischer Scientific, США). Для аналізу використовували барвник SYBR Green-1, розведений у TE-буфері. Параметри флуоресценції: пік збудження – 498 нм, пік випромінювання – 522 нм. Аналіз проводили у триразовій повторності для кожного зразка [67].

2.4. Визначення концентрації білка

Концентрацію білка у зразках визначали за методом Бредфорда з незначними модифікаціями [68].

Зразки подрібнювали, зважували та піддавали гідролізу у 300 мкл 0,5 М HCl. Інкубацію проводили за температури 37°C протягом 1 год, після чого зразки зберігали за температури +4°C протягомночі.

Робочий розчин реактиву Бредфорда готували шляхом розчинення барвника Coomassie Brilliant Blue G-250 у 95% етанолі з подальшим додаванням 85% (w/v) фосфорної кислоти та доведенням об'єму дистильованою водою до кінцевого об'єму 1 л.

Для аналізу у лунки мікротитрувального планшета вносили по 65 мкл підготовленого лізату та 110 мкл реактиву Бредфорда. Суміш інкубували за кімнатної температури протягом 5 хв. Оптичну щільність вимірювали при довжині хвилі 595 нм за допомогою спектрофотометра.

Кількісне визначення білка здійснювали за калібрувальною кривою, побудованою з використанням стандартних розчинів бичачого сироваткового альбуміну (BSA) різних концентрацій, приготованих у 0,9% розчині NaCl.

2.5. Гетеротопічна імплантація кісткових скафолдів

Децелюляризовані кісткові скафолди перед імплантацією стерилізували методом опромінення електронним пучком (e-beam). Усі маніпуляції проводили в умовах асептики у ламінарній шафі. Скафолди формували у вигляді кубів розміром приблизно 0,5 см³ за допомогою стерильних одноразових скальпелів № 15 (Medicare, Україна) та розміщували у стерильних чашках Петрі (60 мм; Склоприлад, Україна).

Перед імплантацією проводили ідентифікацію зразків та їх розподіл відповідно до експериментального дизайну. Для кожної тварини передбачали двобічну імплантацію у підшкірні кишені міжлопаткової ділянки. Скафолди різних експериментальних груп імпантували з урахуванням латералізації: один тип — з правого боку, інший — з лівого, відповідно до заздалегідь визначеної схеми.

Масу тіла тварин визначали на аналітичних вагах (Radwag, Польща) для розрахунку дози анестезії та контролю фізіологічного стану. Анестезію проводили внутрішньом'язовим введенням 2,5% розчину триброметанолу (ТБЕ) (Sigma-Aldrich, США). Для запобігання висиханню рогівки застосовували офтальмологічний гель.

Операційну ділянку готували шляхом видалення шерсті тонким стерильним хірургічним лезом (Medicare, Україна) із подальшою обробкою 70% етанолом та 10% розчином повідон-йоду («Бетадин», Egis, Україна). У дорсальній ділянці виконували два розрізи довжиною 0,5–1 см, після чого формували підшкірні кишені за допомогою стерильного пінцета. У сформовані кишені імпантували скафолди відповідно до експериментального плану. Рани закривали вузловими швами з використанням нерассмоктувальної хірургічної нитки (пролен 6-0, Ethicon, Шотландія), після чого на операційні ділянки наносили антисептичний засіб.

Післяопераційний догляд включав щоденний контроль стану тварин, оцінку поведінки, стану післяопераційної рани та, за необхідності, додаткову антисептичну обробку.

2.6. Оцінка біосумісності імплантованих скафолдів та системної реакції організму

Після оперативного втручання тварин утримували під наглядом до повного виходу з анестезії, після чого щоденно оцінювали їх загальний стан, поведінку та фізіологічне відновлення. Візуальний моніторинг включав аналіз рухової активності тварин, поведінкових реакцій та можливих ознак дискомфорту. Тваринам забезпечували вільну рухову активність у клітках відповідно до стандартних умов утримання.

Протягом усього експериментального періоду проводили клінічне спостереження за ділянкою імплантації з метою виявлення місцевих ознак запалення, зокрема гіперемії, набряку та підвищення локальної температури. Динаміку маси тіла кожної тварини визначали шляхом зважування з подальшим порівнянням із початковими значеннями, отриманими до оперативного втручання.

На 30-ту добу після імплантації проводили евтаназію тварин із подальшою некропсією. Ділянку тканин у зоні імплантації разом зі скафолдами вилучали, фіксували у 10% формаліні та зберігали за температури 4°C до подальшого дослідження. Під час розтину також вилучали життєво важливі органи, зокрема серце, печінку, селезінку, які зважували для оцінки можливих системних змін. Отримані дані використовували для макроскопічної оцінки біосумісності імплантованих матеріалів, аналізу місцевої тканинної реакції та виявлення можливих проявів системної імунної або запальної відповіді організму (рис. 2.1).

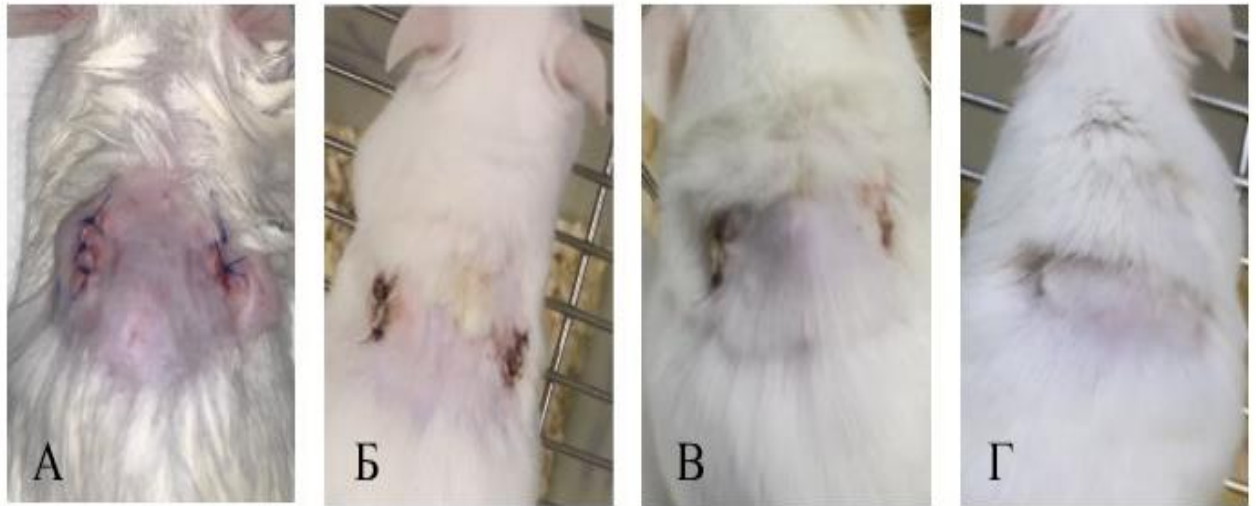


Рис. 2.1. Динаміка загоєння післяопераційної рани у тварин після підшкірної імплантації кісткових скафолдів: одразу після оперативного втручання (А), через один (Б), два (В) та чотири тижні (Г)

2.6.1. Рентгенографічна візуалізація скафолдів

Рентгенографічну візуалізацію скафолдів проводили за допомогою системи Faxitron Core Vision Radiography System (BIOPTICS, США) із використанням програмного забезпечення Bioptics Vision для отримання та подальшого аналізу зображень. Параметри рентгенографії: напруга — 20.0 kV, сила струму — 1.00 mA, експозиція — 4.02 mAs, тривалість експозиції — 4.02 s.

2.6.2. Морфологічний аналіз периферичної крові

Забір крові здійснювали методом кардіальної пункції під глибокою загальною анестезією без відновлення тварин (термінальна процедура) відповідно до загальноприйнятих біоетичних вимог щодо роботи з

лабораторними тваринами. Пункцію проводили безпосередньо перед проведенням некропсії.

Кров отримували з порожнини серця шляхом аспірації з використанням стерильного шприца та голки відповідного діаметру. Забір проводили повільно з метою запобігання колапсу серцевих камер та гемолізу зразка. Після завершення процедури тварин піддавали евтаназії, після чого проводили некропсію та подальший відбір матеріалу.

Із кожної тварини готували по два мазки периферичної крові шляхом нанесення краплі крові на предметне скло з подальшим рівномірним розподілом. Мазки висушували на повітрі за кімнатної температури.

Фарбування препаратів проводили за методом Романовського–Гімзи з використанням азур-еозинового барвника. Після фарбування препарати промивали, висушували та аналізували методом світлової мікроскопії.

Мікроскопічне дослідження включало оцінку морфології формених елементів крові та підрахунок лейкоцитарної формули. Підрахунок здійснювали шляхом аналізу не менше 100 клітин у полі зору мікроскопа з визначенням відносного вмісту (%).

2.7. Статистичний аналіз даних

Статистичну обробку експериментальних даних, отриманих у дослідженні модифікованих методів децелюляризації ПКМ, проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel (версія 2019). Для оцінки достовірних відмінностей між експериментальними групами застосовували параметричні методи статистичного аналізу, зокрема t-критерій Стьюдента.

Розраховували середні значення (M), стандартне відхилення (SD), а також мінімальні та максимальні значення. Результати представляли у вигляді $M \pm SD$, що дозволяло оцінити варіабельність показників у

досліджуваних групах. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Біохімічна оцінка ефективності децелюляризації кісткових скафолдів

3.1.1. Вміст ДНК у децелюляризованих скафолдах

Залишковий вміст ДНК є одним із ключових критеріїв оцінки ефективності децелюляризації кісткової тканини, оскільки відображає ступінь видалення клітинних компонентів із кісткового матриксу та потенційну імуногенність отриманого матеріалу. Відповідно до загальноприйнятих критеріїв, вміст залишкової ДНК у зразках після децелюляризації не повинен перевищувати 50 нг/мг сухої маси тканини.

Аналіз отриманих даних показавсуттєві відмінності між досліджуваними протоколами децелюляризації. Найбільш ефективними щодо видалення клітинних компонентів із кісткової тканини виявилися протоколи № 1 та № 2 (рис. 3.1).

Зокрема, після застосування протоколу № 1 рівень залишкової ДНК становив $6,58 \pm 0,02$ нг/мг, тоді як після протоколу № 2 – $6,12 \pm 0,02$ нг/мг, що було найнижчим серед усіх досліджуваних груп. Обидва показники були статистично значущо нижчими порівняно з контролем ($19,96 \pm 0,02$ нг/мг; $p < 0,05$) та у 3,0 та 3,3 рази, відповідно, меншими за нього, що могло свідчити про високу ефективність видалення клітинного матеріалу. Водночас отримані значення не лише відповідали, але й значно перевищували вимоги до ефективної децелюляризації (<50 нг/мг)

Висока ефективність протоколу № 1 може бути зумовлена поєднанням осмотичної дії гіпо- та гіпертонічних розчинів із обробкою детергентом

Triton X-100, що забезпечувало руйнування клітинних мембран і видалення внутрішньоклітинного вмісту без значного пошкодження білкового каркаса позаклітинного матриксу. Подібний рівень ефективності протоколу № 2 свідчив про те, що додаткові етапи демінералізації та деліпідації не призводили до суттєвого підвищення ступеня видалення ДНК, але могли впливати на інші властивості матриксу (рис. 3.1).

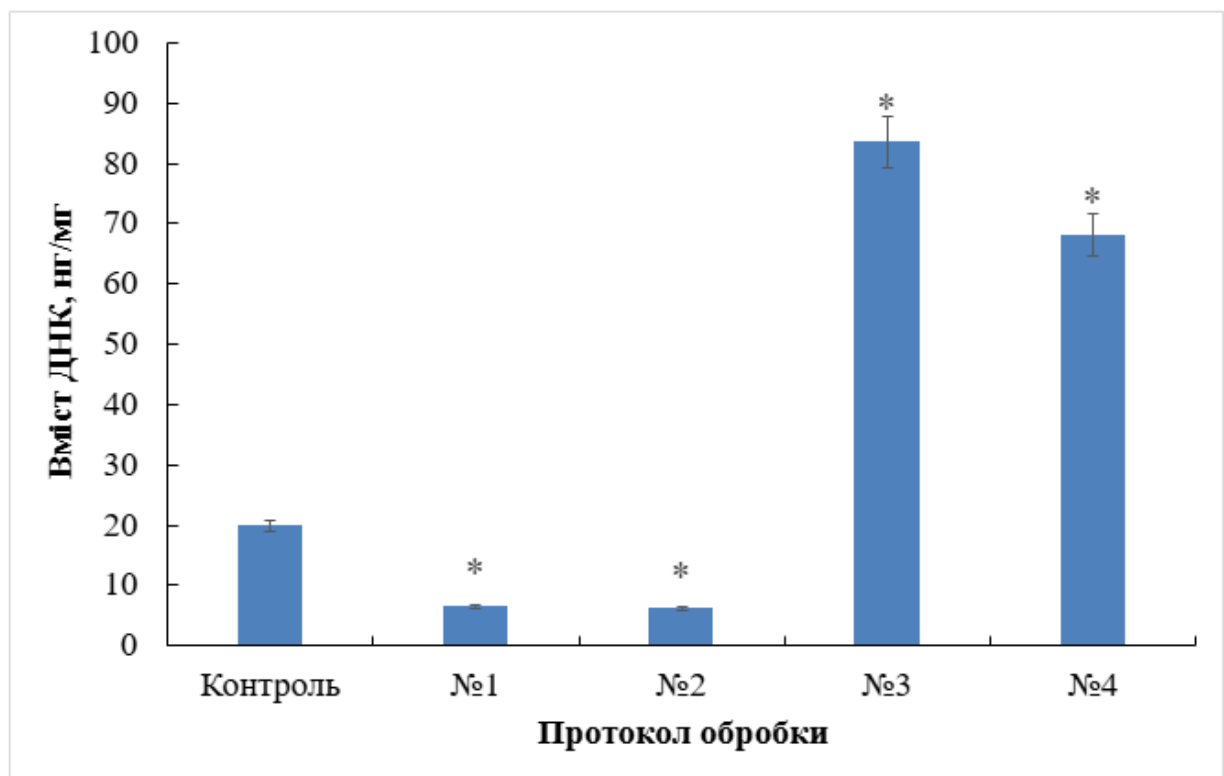


Рис. 3.1. Вміст залишкової ДНК у зразках трабекулярної кісткової тканини після децелюляризації. № 1 – Triton X-100, 12 год; № 2 – 0,5% TritonX-100, 12 год, демінералізація та деліпідація; № 3 – 1% Triton X-100, 6 год, ультразвукова обробка; № 4 – 1% Triton X-100, 6 год, де мінералізація. $M \pm SD$ ($n = 4$).

* $p < 0,05$ – різниця статистично значуща порівняно з контролем

Застосування лише демінералізації (контроль) також сприяло частковому видаленню клітинних компонентів, однак її ефективність була нижчою: вміст залишкової ДНК залишався у 3,0 рази вищим порівняно з

протоколами № 1 та № 2 ($p < 0,05$), що могло вказувати на недостатність такого підходу для повноцінної децелюляризації кісткової тканини.

Натомість застосування протоколів № 3 та № 4 виявилось значно менш ефективним. При використанні протоколу № 4, який включав демінералізацію після обробки Triton X-100, рівень залишкової ДНК у тканині становив $68,13 \pm 0,02$ нг/мг, що перевищувало допустимі критерії децелюляризації та було статистично значущо вищим у 3,4 раза порівняно з контролем, та у 10,4 і 11,1 раза – порівняно з протоколами № 1 та № 2 відповідно ($p < 0,05$). Отримані результати могли свідчити про недостатню ефективність короткотривалої детергентної обробки навіть у поєднанні з подальшою демінералізацією для повного видалення клітинних компонентів із кісткової тканини.

Найнижчу ефективність показано за використання протоколу № 3, який передбачав ультразвукову обробку в поєднанні з Triton X-100: рівень залишкової ДНК становив $83,61 \pm 0,02$ нг/мг, що перевищувало контрольний показник у 4,2 раза та показники, отримані за використання протоколів № 1 та № 2 — у 12,7 та 13,7 раза відповідно ($p < 0,05$). Ймовірно, недостатня ефективність цього підходу пов'язана з обмеженим проникненням детергенту вглиб щільного кісткового матриксу за короткого часу обробки, а також можливим ущільненням тканини під дією ультразвуку, що перешкоджає повноцінному видаленню клітинних компонентів.

3.1.2. Вміст загального білка у децелюляризованих матриксах

Збереження білкового складу ПКМ є одним із ключових критеріїв якості децелюляризованих кісткових скафолдів, оскільки структурні білки, зокрема колаген, еластин і ламінін, визначають механічні властивості, біосумісність та здатність матеріалу до інтеграції з тканинами організму. Відомо, що надмірно інтенсивна фізико-хімічна обробка може призводити до деградації

або вимивання цих компонентів, що негативно впливає на функціональні характеристики матриксу [1, 2]. У зв'язку з цим проведено кількісну оцінку вмісту загального білка у зразках після застосування різних протоколів децелюляризації.

Аналіз отриманих даних показав, що досліджувані протоколи суттєво відрізнялися за здатністю зберігати білковий компонент ПКМ у кісткових скафолдах. Найвищі значення концентрації загального білка відмічено за умов застосування протоколу № 1, де цей показник перевищував контроль у 3,25 раза ($p < 0,05$) (рис. 3.2). Отримані дані могли свідчити про ефективне збереження білкового каркаса матриксу за умов застосування осмотично-детергентної схеми децелюляризації. Висока ефективність протоколу № 1, ймовірно, зумовлена поєднанням осмотичного лізису клітин (за рахунок чергування гіпо- та гіпертонічних середовищ) із дією нейонного детергенту Triton X-100, який солюбілізував ліпідні компоненти клітинних мембран без значної денатурації білків [5, 22, 69]. Такий підхід забезпечував ефективне видалення клітинних компонентів при мінімальному пошкодженні структур ПКМ, зокрема колагену.

За умов застосування протоколу № 3, який поєднував використання ультразвукової обробки з Triton X-100, концентрація загального білка також була статистично значуще вищою за контроль (у 2,1 раза, $p < 0,05$), однак залишалася нижчою (в 1,54 раза) порівняно з протоколом № 1. Це може бути пов'язано з використанням ультразвукової обробки, яка супроводжувалася кавітаційними ефектами та механічним руйнуванням тканини. Хоча така обробка полегшувала видалення клітинних компонентів, вона була менш селективною і могла приводити до часткової фрагментації білків матриксу [70].

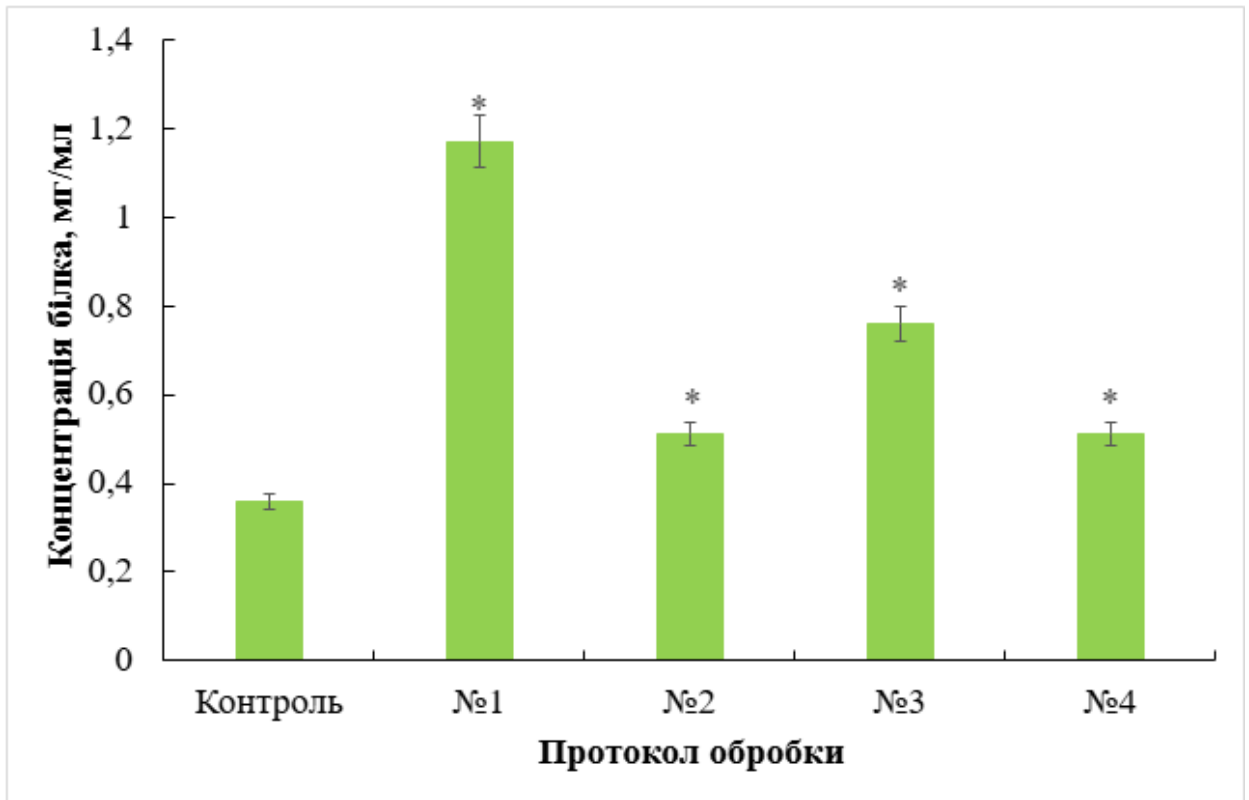


Рис. 3.2. Концентрація білка у зразках трабекулярної кісткової тканини після децелюляризації. № 1 – Triton X-100, 12 год; № 2 – 0,5% TritonX-100, 12 год, демінералізація та деліпідация; № 3 – 1% Triton X-100, 6 год, ультразвукова обробка; № 4 – 1% Triton X-100, 6 год, демінералізація. $M \pm SD$, $n = 4$.

* $p < 0,05$ – різниця статистично значуща порівняно з контролем;

Протоколи № 2 та № 4 характеризувалися нижчими значеннями концентрації білка (у 2,3 рази) порівняно з протоколом № 1 ($p < 0,05$). Водночас лише протокол № 2 забезпечував статистично значуще підвищення концентрації білка відносно контролю (в 1,4 рази, $p < 0,05$), тоді як для протоколу № 4 відзначалася лише тенденція до її збільшення. Зниження вмісту білка за умов застосування вище зазначених протоколів, імовірно, пов'язане з включенням етапу демінералізації. Незважаючи на те, що цей процес спрямований на видалення мінерального компонента, він може супроводжуватися частковим вилуговуванням та підвищенням розчинності

колагену та неколагенових білків, зокрема факторів росту [71, 72]. Додатково, використання ізопропанолу у протоколі № 2 могло спричинити порушення гідрофобних взаємодій у білкових структурах та їх часткову денатурацію, що також впливало на зниження їх вмісту у зразках. Найнижчі значення концентрації білка зафіксовано у контрольній групі, що узгоджувалося з використанням лише демінералізації без додаткових методів стабілізації білкового матриксу.

Таким чином, отримані результати свідчили, що осмотично-детергентна схема децелюляризації (протокол № 1) забезпечувала найбільш оптимальні умови для збереження білкового компоненту ПКМ. У поєднанні з результатами оцінки залишкового вмісту ДНК це підтверджувало, що саме протокол № 1 забезпечував найкращий баланс між ефективним видаленням клітинних компонентів і збереженням структурно-функціональних властивостей матриксу.

3.1.3. Порівняльна оцінка ефективності різних протоколів децелюляризації

Для узагальненої оцінки ефективності децелюляризації кісткової тканини проведено порівняльний аналіз результатів дослідження із використанням інтегрального показника — індексу ефективності (ІЕ), який розраховували як співвідношення вмісту залишкової ДНК до рівня збереження загального білка ПКМ. Такий підхід дозволив одночасно враховувати як ступінь видалення клітинних компонентів, так і збереження структурно-функціональних властивостей матриксу. Відповідно, нижчі значення ІЕ свідчили про вищу ефективність децелюляризації.

Аналіз отриманих результатів показав, що найменше значення ІЕ характерне для протоколу № 1 (0,02), що могло вказувати на оптимальне поєднання ефективного видалення клітинних компонентів і збереження

білкового каркаса ПКМ (табл. 3.1). Це узгоджується з результатами підрозділів 3.1.1 і 3.1.2, де саме для протоколу № 1 було показано низький рівень залишкової ДНК та найвищий рівень збереження білка.

Таблиця 3.1

Порівняльна оцінка ефективності протоколів децелюляризації кісткових скафолдів, ($M \pm SD$; $n = 4$)

№ зразка	Умови децелюляризації	Індекс ефективності (ДНК/білок)
Контроль	демінералізація	0,20
1	0,5% Triton X-100, 12 год	0,02
2	0,5% Triton X-100, 12 год, демінералізація та деліпідація	0,68
3	1% Triton X-100, 6 год, ультразвукова обробка	0,40
4	1% Triton X-100, 6 год, демінералізація	0,04

Протокол № 4 характеризувався відносно низьким значенням ІЕ (0,04), однак він був менш ефективним порівняно з протоколом № 1. Незважаючи на певне зниження вмісту ДНК порівняно з контролем, цей протокол не забезпечував достатнього рівня децелюляризації (за абсолютними значеннями ДНК), а також супроводжувався зменшенням вмісту білка. Це свідчило про те, що комбінація короткотривалої детергентної обробки з подальшою демінералізацією не дозволяла досягти оптимального балансу між очищенням і збереженням матриксу.

Контрольні зразки (демінералізація) характеризувалися проміжним значенням ІЕ (0,20), що було у 10 разів вищим порівняно з протоколом № 1 та у 5 разів — порівняно з протоколом № 4. Це підтверджувало, що демінералізація як самостійний метод не є достатньою для ефективної децелюляризації кісткової тканини, оскільки супроводжувався як неповним видаленням клітинних компонентів, так і значними втратами білкового матриксу.

Найвищі значення ІЕ встановлено для протоколів № 2 (0,68) та № 3 (0,40), які перевищували показники протоколу № 1 у 34 та 20 разів відповідно. Для протоколу № 2 це могло бути обумовлено значними втратами білкового компоненту, незважаючи на ефективне видалення ДНК, що пов'язано з додатковими етапами демінералізації та деліпідації. У випадку протоколу № 3 високий ІЕ зумовлений як недостатнім зниженням рівня ДНК, так і частковою деградацією білків під впливом ультразвукової обробки.

Таким чином, результати біохімічного аналізу показали, що ефективність децелюляризації кісткової тканини визначається не лише здатністю видаляти клітинні компоненти, але й ступенем збереження білкового каркаса ПКМ. Найбільш ефективним виявився протокол № 1, який базувався на осмотично-детергентному підході та забезпечував оптимальний баланс між очищенням тканини і збереженням її структурно-функціональних властивостей. Протокол № 4 міг розглядатися як частково ефективний, однак поступався за інтегральними показниками. Натомість протоколи № 2 та № 3 були менш оптимальними через порушення цього балансу, що обмежувало їх застосування для створення біосумісних кісткових скафолдів.

3.2. Аналіз результатів імплантації кісткових скафолдів, отриманих за різними протоколами децелюляризації

Порівняльний аналіз результатів імплантації кісткових скафолдів, отриманих за різними протоколами децелюляризації, проводили на основі оцінки показників біосумісності *in vivo*. Оцінювання включало аналіз динаміки маси тіла експериментальних тварин, як інтегрального показника загального фізіологічного стану, визначення маси внутрішніх органів для виявлення можливих системних реакцій організму, а також макроскопічну оцінку ділянки імплантації та стану імплантованих матеріалів.

3.2.1. Динаміка маси тіла експериментальних тварин після імплантації

Оцінка динаміки маси тіла експериментальних тварин після підшкірної імплантації кісткових скафолдів є важливим інтегральним показником загального фізіологічного стану організму, оскільки дозволяє виявити можливі прояви системної реакції на імплантований матеріал.

У даному дослідженні застосовано модель двосторонньої підшкірної імплантації, за якої кожній тварині одночасно імплантували два кісткові скафолди, отримані за різними протоколами децелюляризації. Такий підхід дозволив мінімізувати вплив міжіндивідуальної варіабельності та підвищити коректність порівняльного аналізу.

Аналіз отриманих результатів показав, що в усіх досліджуваних групах зміни маси тіла перебували в межах фізіологічно допустимих значень (табл. 3.2). Відсутність стійкої тенденції до її зниження, а також наявність випадків помірного підвищення свідчили про збереження задовільного загального стану тварин у післяопераційному періоді.

Таблиця 3.2

**Динаміка маси тіла експериментальних тварин після імплантації
кісткових скафолдів, ($M \pm SD$; $n = 4$)**

Група протоколів	Маса тварини, г		Δ маси, % $M \pm SD$
	До імплантації	Після імплантації	
Контроль	$40,45 \pm 1,11$	$38,87 \pm 1,32$	$-3,84 \pm 4,46$
№ 1 / № 2	$45,54 \pm 3,52$	$45,23 \pm 5,33$	$-0,88 \pm 5,11$
№ 3 / № 4	$42,48 \pm 2,38$	$44,26 \pm 3,60$	$+4,43 \pm 10,8$

У групі тварин із імплантацією скафолдів, отриманих за протоколами № 3 та № 4, відмічено найбільшу варіабельність індивідуальних показників: від зменшення маси тіла на 5,13% до її збільшення на 16,19%. Такий розкид значень може свідчити про індивідуальні особливості адаптаційної відповіді організму на імплантацію та різний ступінь толерантності до матеріалів.

У групі тварин із застосуванням протоколів № 1 та № 2 зміни маси тіла були менш вираженими та знаходилися в діапазоні від -5,47% до +4,64 %, що вказувало на стабільний перебіг післяопераційного періоду та відсутність суттєвого впливу імплантованих скафолдів на загальний стан організму дослідних тварин. У контрольній групі (демінералізована кісткова тканина) тварин спостерігалася тенденція до незначного зниження маси тіла (від -6,48% до +1,30%). Водночас такі зміни не супроводжувалися іншими ознаками порушення загального стану, і, ймовірно, пов'язані з адаптаційними процесами після оперативного втручання.

Таким чином, отримані результати свідчили про відсутність критичних змін маси тіла у експериментальних тварин після імплантації кісткових скафолдів, що опосередковано вказувало на задовільну біосумісність досліджуваних матеріалів незалежно від використаного протоколу

децелюляризації. Водночас виявлена індивідуальна варіабельність показників обґрунтовувала необхідність подальшого аналізу маси внутрішніх органів локальних тканинних реакцій для більш повної оцінки біологічної відповіді організму.

3.2.2. Оцінка зміни маси внутрішніх органів мишей після імплантації кісткових скафолдів

Оцінка маси внутрішніх органів, зокрема печінки та селезінки, є важливим показником системної відповіді організму на імплантовані біоматеріали. Зміни маси цих органів можуть свідчити про розвиток запальних процесів, токсичний вплив або активацію імунної системи.

Як наведено в табл. 3.3, маса селезінки у всіх досліджуваних групах мишей залишалася в межах фізіологічної норми. Відсутність її збільшення свідчила про відсутність вираженої системної імунної відповіді або генералізованого запального процесу в організмі тварин. Показники маси печінки у більшості груп також відповідали референтним значенням, що вказувало на відсутність токсичного впливу імплантованих матеріалів на печінку як центральний орган метаболізму та детоксикації.

У групах тварин із імплантацією скафолдів, отриманих за протоколами № 1 та № 2 та № 3 та № 4, абсолютні та відносні показники маси печінки перебували в межах фізіологічного діапазону (4,5–6,0%), що не супроводжувалося ознаками ні гіпертрофії, ні атрофії органа. Водночас у групі № 3 та № 4 відмічено статистично значуще підвищення абсолютної маси печінки порівняно з контролем ($p < 0,05$), однак ці значення залишалися в межах референтних показників і не супроводжувалися змінами маси селезінки, що не дозволяло трактувати їх як прояв патологічного процесу.

У контрольній групі (демінералізована кісткова тканина) спостерігалось зниження середнього показника маси печінки (в 1,25 рази, $p < 0,05$) порівняно

з групою № 3 та № 4, а також тенденція до його зменшення відносно нижньої межі референтних значень. Водночас такі зміни не супроводжувалися збільшенням маси селезінки або іншими ознаками системної реакції, що, ймовірно, пов'язано з індивідуальною фізіологічною варіабельністю або адаптаційними процесами після оперативного втручання.

Таблиця 3.3

Маса внутрішніх органів експериментальних тварин після імплантації кісткових скафолдів, (M ± SD; n = 4)

Група протоколів	Маса печінки, г	Маса селезінки, г	Відносна маса печінки, %
Контроль	1,833 ± 0,21	0,13 ± 0,03	4,29 – 5,16
№ 1 / № 2	2,287 ± 0,24	0,17 ± 0,03	4,9 – 5,19
№ 3 / № 4	2,298 ± 0,04*	0,13 ± 0,03	4,9 – 5,8
Референтні значення	2,0 – 3,0	0,05 – 0,2	4,5 – 6,0

* p < 0,05 – різниця статистично значуща порівняно з контролем

Таким чином, отримані результати свідчили про відсутність вираженого токсичного чи запального впливу імплантованих кісткових скафолдів на організм експериментальних тварин. Відповідність показників маси печінки та селезінки фізіологічним межам, а також відсутність ознак спленомегалії чи гепатомегалії вказувала на задовільну біосумісність досліджуваних матеріалів на системному рівні.

3.2.3. Макроскопічна оцінка імплантованих скафолдів

Макроскопічна оцінка імплантованих кісткових скафолдів була важливим етапом визначення їх біосумісності, оскільки дозволяла виявити ознаки запальної реакції, некрозу, фіброзу, біодеградації або відторгнення імплантованого матеріалу.

На момент імплантації всі зразки зберігали макроструктурну цілісність та фіксувалися в зоні підшивки без значних технічних труднощів. Подальше спостереження дозволило виявити відмінності у характері взаємодії скафолдів із тканинами реципієнта залежно від застосованого протоколу децелюляризації.

Зокрема, скафолди, отримані за протоколом № 1, на момент завершення експерименту зберігали відносно стабільну форму та структурну цілісність (рис 3.3). Виражених ознак деградації не спостерігалось, що могло свідчити про обмежене ремоделювання та інтеграцію матеріалу в тканини. Додатково відмічено формування сполучнотканинної капсули навколо імплантату. Васкуляризація в зоні імплантації була слабкою або помірною. Ознак гострої запальної реакції навколишніх тканин не відмічено.

У групі протоколу № 2 у частині випадків відзначалося зниження чіткості макроскопічної візуалізації: імплантати мали розмиті межі або частково не визначалися (рис. 3.3). Відмічено ділянки, що можуть відповідати частковій біодеградації або інфільтрації скафолду клітинами. У зоні імплантації спостерігалася виражена васкуляризація з формуванням судиняк на поверхні, так і в товщі матриксу. Капсуляція матеріалу була мінімальною або нерівномірною, що свідчить про зниження ізолюючої реакції та більш тісну взаємодію з тканинами тварини. Ознак гнійного або некротичного процесу навколишніх тканин не виявлено.

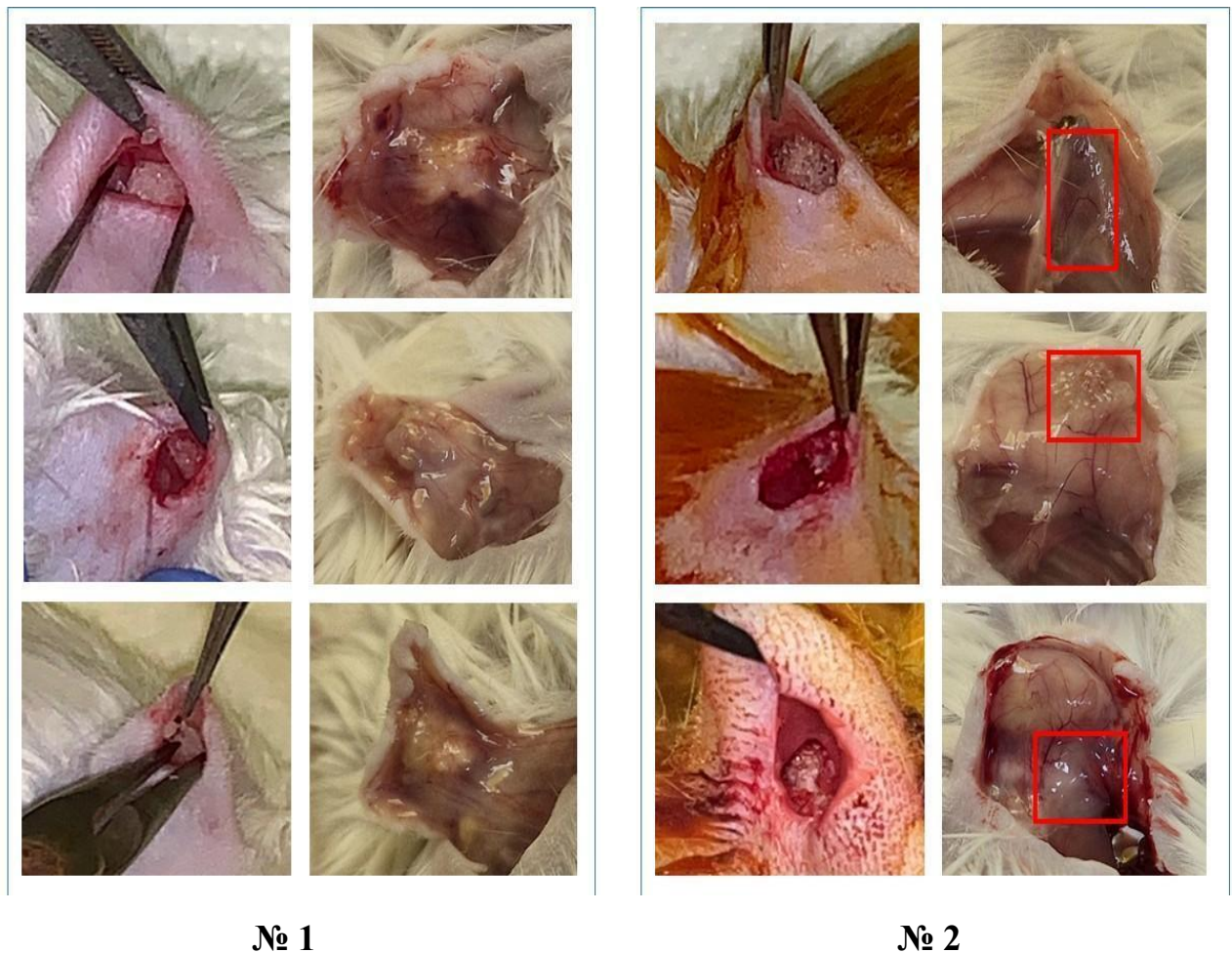


Рис. 3.3. Макроскопічний вигляд кісткових скафолдів, отриманих за протоколами № 1 та № 2: під час імплантації (ліворуч) та після завершення експерименту (праворуч)

У групі тварин із застосуванням протоколу № 3 імпланти в більшості випадків залишалися макроскопічно ідентифікованими, однак спостерігалася їх часткова інтеграція з навколишніми тканинами (рис. 3.4). Відзначалося помірне формування сполучнотканинного оточення без повної ізоляції. Васкуляризація була більш вираженою порівняно з протоколом № 1, із проникненням судин у поверхневі шари матриксу. У ряді випадків спостерігалися ознаки часткової деградації структури. Ознак гострої запальної реакції не виявлено.

Скафолди, отримані за протоколом № 4, на момент завершення експерименту характеризувалися більш вираженою інтеграцією з тканинами реципієнта порівняно з протоколом № 3 (рис. 3.4). У частини зразків імплантат не визначався або мав нечіткі межі. Спостерігалася інтеграція в навколишні тканини та інтенсивна васкуляризація як на поверхні, так і в товщі матриксу без чітко вираженої капсули, що може свідчити про активні процеси інтеграції та біодеградації. Ознак запальної реакції не виявлено.

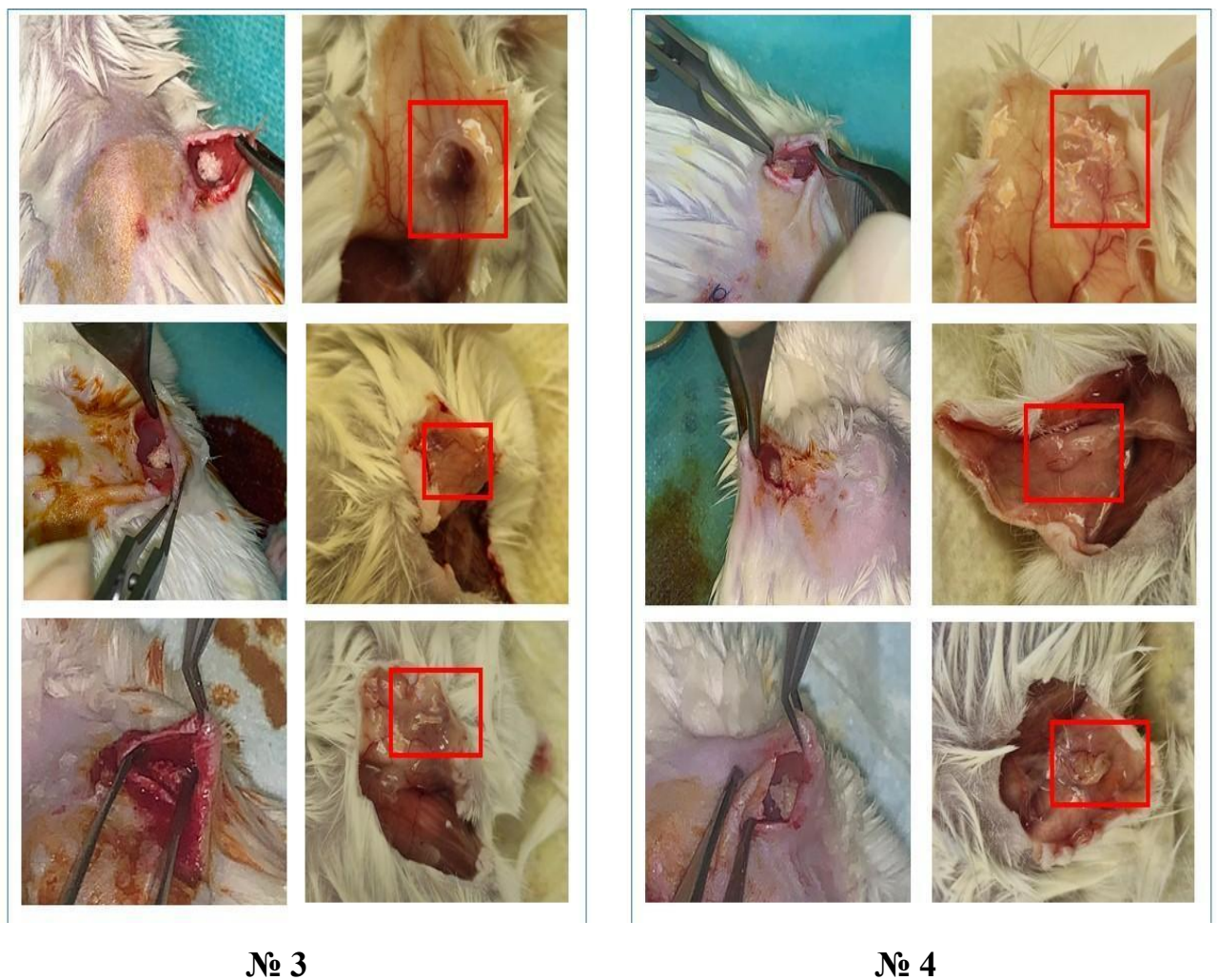


Рис. 3.4. Макроскопічний вигляд кісткових скафолдів, отриманих за протоколами № 3 та № 4: під час імплантації (ліворуч) та після завершення експерименту (праворуч)

На момент завершення експерименту скафолд (контроль), характеризувалися помірною біодеградацією (рис. 3.5). Відзначалося часткове порушення структури, зменшення щільності та локальна деструктуризація матриксу. У деяких зразках відмічено фрагментацію, що вказує на поступову деградацію матеріалу *in vivo*. Водночас повного руйнування не відбулося, що вказувало на збереження базової структурної цілісності. Спостерігалися ознаки васкуляризації з проникненням судин у товщу імплантату. У більшості випадків формувалася тонка сполучнотканинна капсула, що відображає помірну реакцію організму без вираженої ізоляції. Ознак гострого запалення не виявлено, що свідчить про добру біосумісність матеріалу.

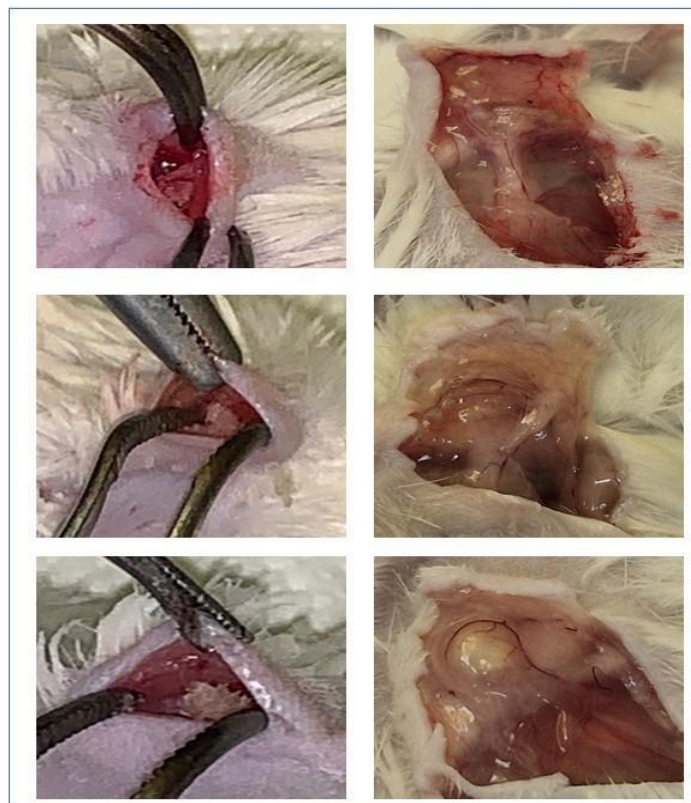


Рис. 3.5. Макроскопічний вигляд кісткових скафолдів, отриманих за протоколом Контроль: під час імплантації (ліворуч) та після завершення експерименту (праворуч)

3.2.4. Рентгенографічна характеристика імплантованих скафолдів

Рентгенографічну оцінку кісткових скафолдів проводили до імплантації лабораторним тваринам з метою аналізу їх мікроархітектурних характеристик. Встановлено, що всі зразки чітко візуалізувалися, зберігали визначені контури та не мали ознак структурних порушень, що свідчило про їхню цілісність і придатність до подальшого використання в експерименті.

Скафолди, отримані за протоколом № 1, характеризувалися вираженою неоднорідністю радіощільності. Візуалізувалася пориста (комірчаста) структура з чергуванням ділянок підвищеної та зниженої інтенсивності сигналу. Периферичні зони мали вищу радіощільність, тоді як центральні ділянки характеризувалися її зниженням. Аналіз профілів інтенсивності показав стабільний характер розподілу сигналу: на периферії значення досягали ~1800–2000 у.о., тоді як в центральних зонах знижувалися до ~400–800 у.о. Профілі мали хвилеподібну форму з вираженими локальними мінімумами, що підтверджувало наявність внутрішньої пористої структури та неоднорідного розподілу щільності. Ознак деструкції або повної радіопрозорості не виявлено (рис. 3.6).

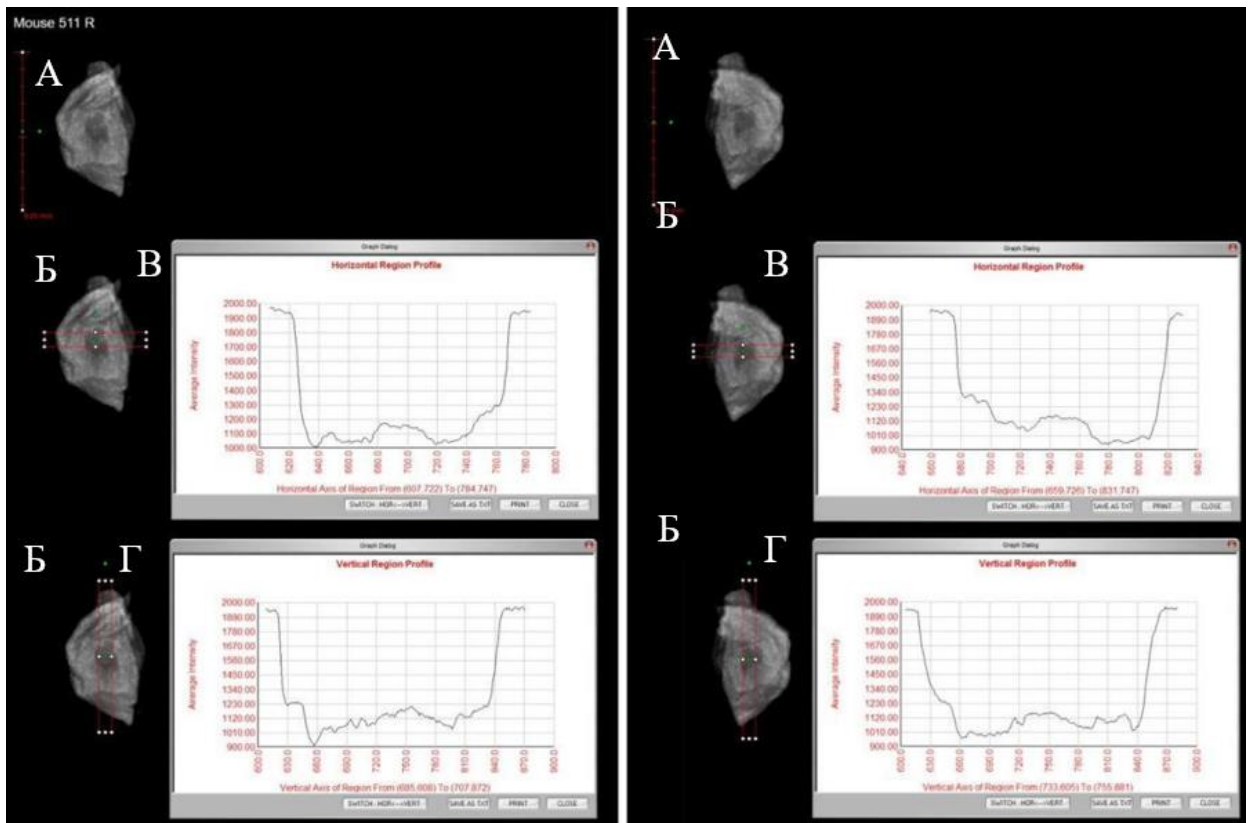


Рис. 3.6. Рентгенографічне зображення імплантованого кісткового скафолдута профілі інтенсивності сигналу – протокол № 1 (Triton X-100, 12 год): А – загальний вигляд імплантату; Б – область аналізу інтенсивності (ROI); В – горизонтальний профіль інтенсивності рентгенівського сигналу; Г – вертикальний профіль інтенсивності рентгенівського сигналу

Скафолди, отримані за протоколом № 2, показали помірну неоднорідність радіющільності. Візуально визначалась пориста структура без різко виражених зон розрідження. Периферичні ділянки характеризувалися підвищеною радіющільністю, тоді як центральні — більш рівномірно зниженими значеннями інтенсивності. Профілі інтенсивності мали переважно плавний U-подібний характер: інтенсивність на периферії досягала ~1800–2000 у.о., у центральних зонах — ~900–1100 у.о. Відсутність глибоких локальних мінімумів свідчила про більш рівномірний розподіл

щільності порівняно з протоколом № 1. Ознак деструкції росту не виявлено (рис. 3.7).

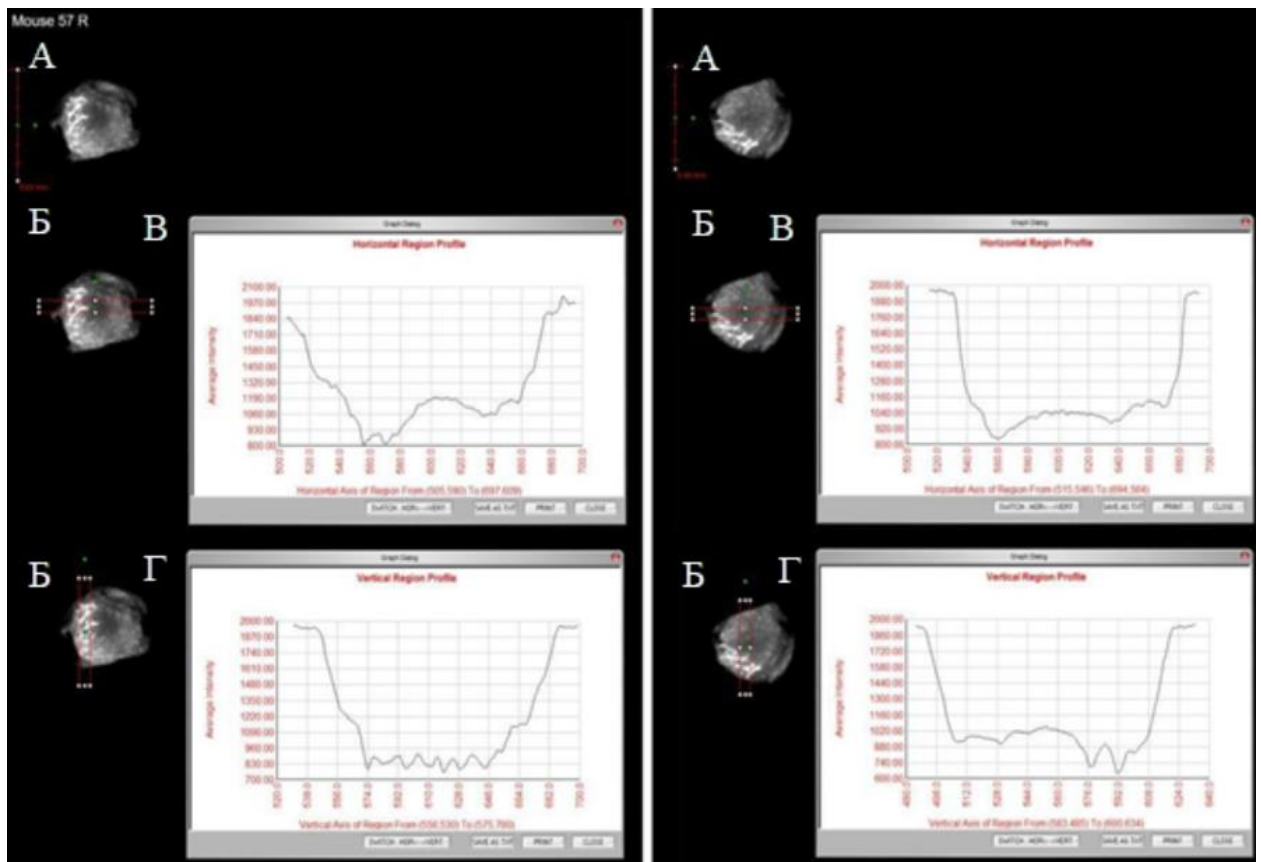


Рис. 3.7. Рентгенографічне зображення імпантованого кісткового скафолду та профілі інтенсивності сигналу – протокол № 2 (0,5% Triton X-100, 12 год, демінералізація та деліпідація): А – загальний вигляд імпантату; Б– область аналізу інтенсивності (ROI); В – горизонтальний профіль інтенсивності рентгенівського сигналу; Г – вертикальний профіль інтенсивності рентгенівського сигналу

Для скафолдів, отриманих за протоколом № 3, характерною була виражена неоднорідність радіощільності з чітко візуалізованою пористою організацією. У центральних ділянках виявлено нижчу інтенсивність сигналу порівняно з периферією. Профілі інтенсивності характеризувалися підвищенням показників на периферії до ~1800–2000 у.о. та зниженням у

центральных зонах до $\sim 600\text{--}900$ у.о., а також хвилеподібною формою з наявністю декількох локальних мінімумів. Варіабельність профілів була вищою порівняно з протоколом № 2, проте менш вираженою, ніж у зразках протоколу № 1, що свідчило про проміжний характер пористості. Ознак деструкції не виявлено (рис. 3.8).

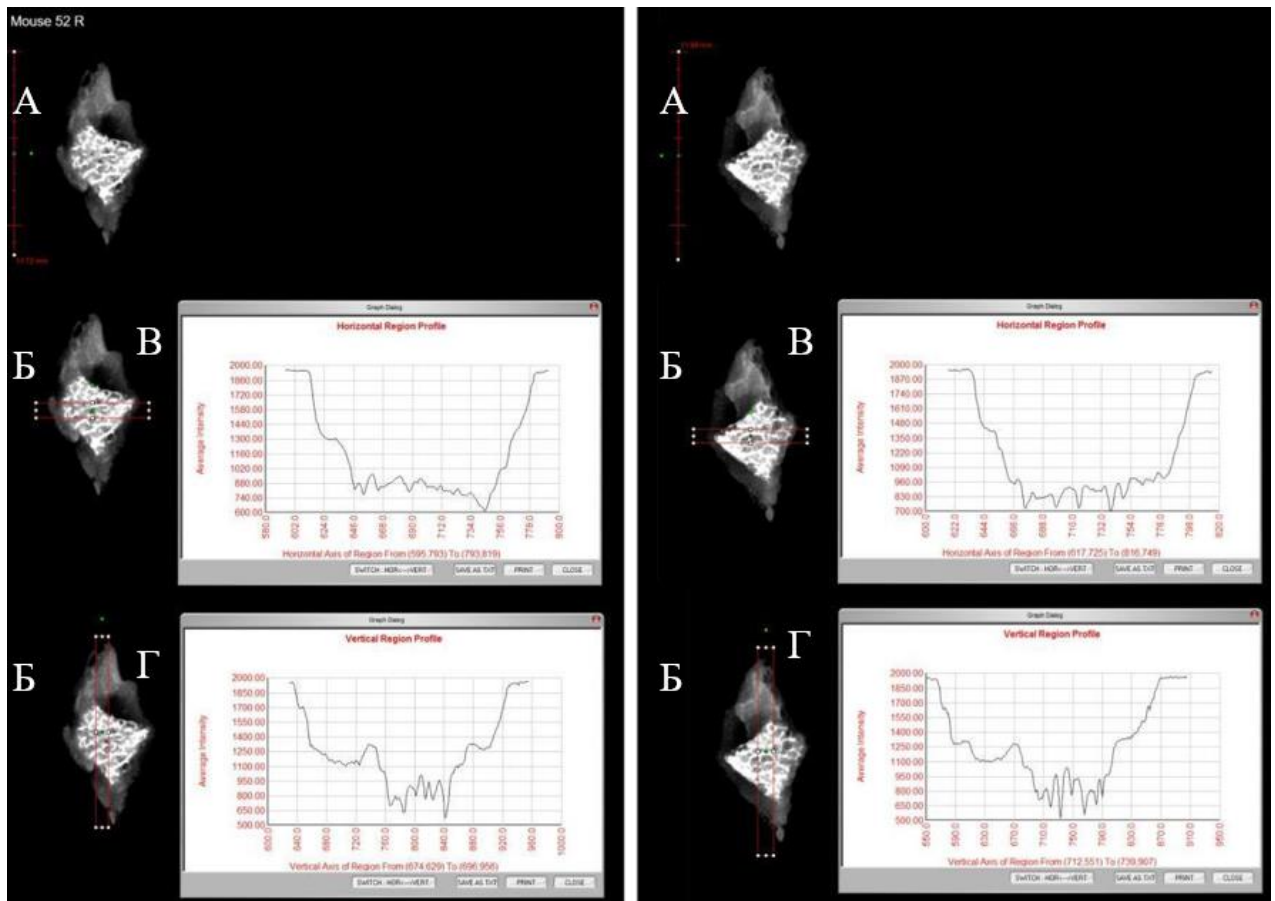


Рис. 3.8 . Рентгенографічна оцінка імплантованого кісткового скафолду та профілі інтенсивності сигналу – протокол № 3 (1% Triton X-100, 6 год, ультразвукова обробка): А – загальний вигляд імплантату; Б – область аналізу інтенсивності (ROI); В – горизонтальний профіль інтенсивності рентгенівського сигналу; Г – вертикальний профіль інтенсивності рентгенівського сигналу

Скафолди, отримані за протоколом № 4, характеризувалися відносно рівномірним розподілом радіощільності та менш вираженою пористою

структурою. Візуально вони мали більш компактну організацію без чітко виражених комірчастих елементів. Профілі інтенсивності демонстрували високі значення на периферії (~1800–2000 у.о.) та відносно високі значення у центральних ділянках (~1200–1500 у.о.) з плавним U-подібним характером. Низька варіабельність профілів та відсутність глибоких спадів інтенсивності свідчили про більш однорідний розподіл щільності та меншу пористість порівняно з іншими протоколами. Ознак деструкції не виявлено (рис.3.9)

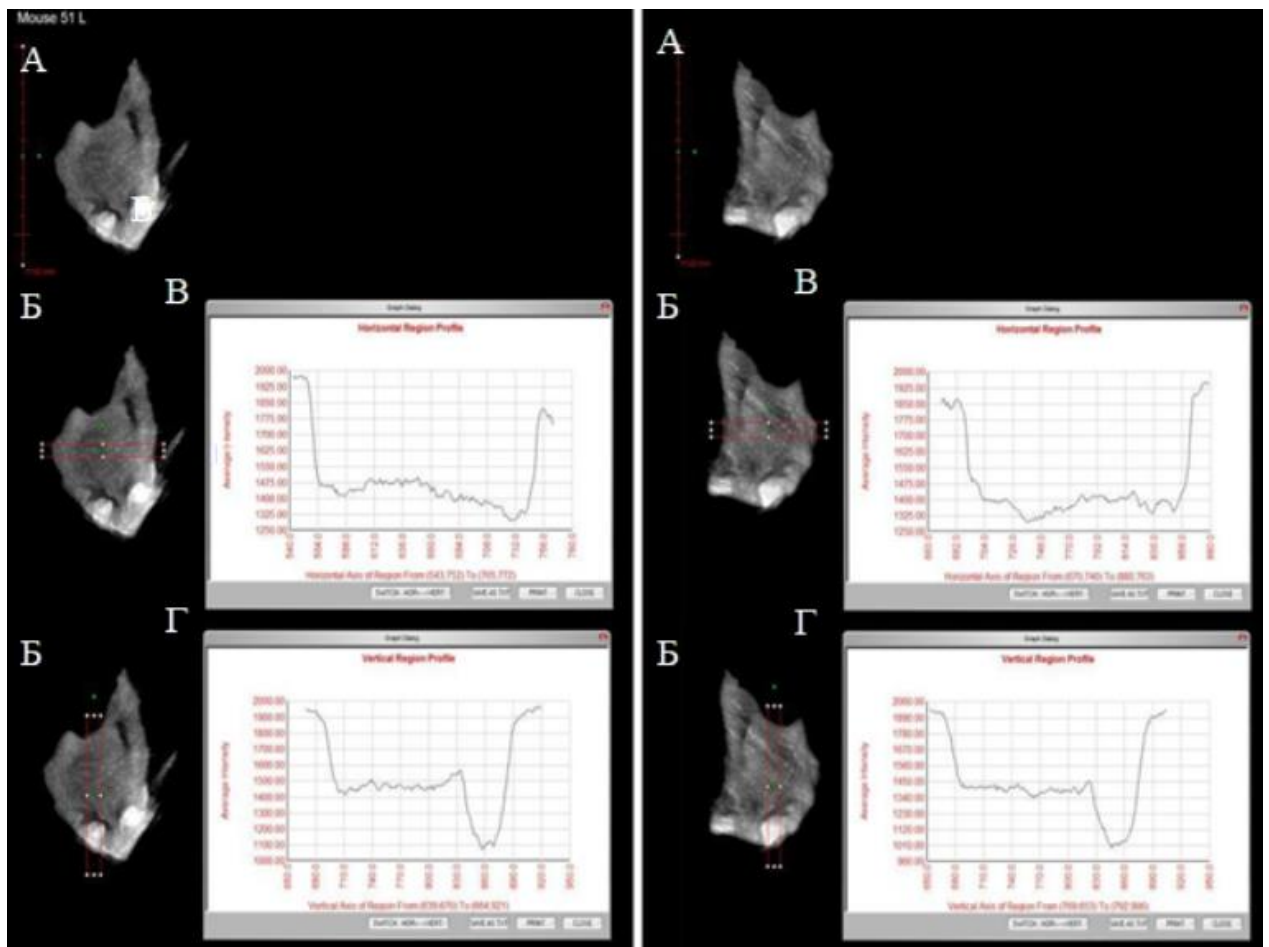


Рис. 3.9. Рентгенографічне зображення імпантованого кісткового скафолду та профілі інтенсивності сигналу – протокол № 4 (1% Triton X-100, 6 год, демінералізація): А – загальний вигляд імпантату; Б – область аналізу інтенсивності (ROI); В – горизонтальний профіль інтенсивності рентгенівського сигналу; Г – вертикальний профіль інтенсивності рентгенівського сигналу

Згідно з результатами аналізу рентгенографічних зображень кісткових скафолдів встановлено, що їх внутрішня структура суттєво залежала від застосованого протоколу децелюляризації та відрізнялася ступенем пористості й рівномірністю розподілу радіощільності. Найбільш виражену неоднорідність виявлено для скафолдів, отриманих за протоколом № 1. Для них характерні найнижчі значення радіощільності у центральних ділянках (~400–800 у.о.) та хвилеподібні профілі інтенсивності з глибокими локальними мінімумами, що свідчило про високу пористість матриксу.

Помірну пористість виявлено для скафолдів, отриманих за протоколом № 3. Інтенсивність сигналу на рентгенографічних зображеннях у центральних ділянках перебувала в межах ~600–900 у.о., а профілі мали нерівномірний характер без різко виражених провалів, що відображало помірну пористість і неоднорідність структури.

Скафолди, отримані за протоколом № 2, демонстрували більш рівномірний розподіл радіощільності порівняно з протоколами № 1 та № 3. Інтенсивність сигналу в центральних ділянках становила ~900–1100 у.о., а профілі мали плавний характер без виражених локальних мінімумів, що свідчило про більш однорідну структуру з помірною пористістю.

Найбільш рівномірну та щільну структуру виявлено у скафолдів, отриманих за протоколом № 4, для яких характерні високі значення інтенсивності як у периферичних, так і центральних ділянках (~1200–1500 у.о.) та низька варіабельність профілів. Це вказувало на компактну організацію матриксу. Водночас для всіх досліджуваних протоколів зберігалися чіткі контури скафолдів без ознак деструкції або повної резорбції. Таким чином, ступінь пористості та структурної неоднорідності зменшувався у ряду: № 1 > № 3 > № 2 > № 4 (табл. 3.5).

Отримані результати свідчили, що структурні характеристики скафолдів, зокрема ступінь пористості та рівномірність розподілу радіощільності, залежали від протоколу децелюляризації та могли визначати їх подальше функціональне призначення. Зокрема, більш пористі структури

були доцільними для використання у випадках, де була необхідною активна клітинна інфільтрація та формування судинної мережі, наприклад, при заповненні об'ємних кісткових дефектів або як матрикси для заселення клітинами *in vitro* перед імплантацією. Такі скафолди могли забезпечувати сприятливі умови для остеогенезу та ремоделювання тканини. Натомість більш щільні та структурно однорідні скафолди були доцільними для застосування у випадках, де пріоритетом була механічна стабільність і збереження форми імплантату, зокрема при заміщенні невеликих дефектів кістки, у ділянках із підвищеним механічним навантаженням або як опорні елементи, що мали зберігати геометрію до моменту повної інтеграції з тканинами реципієнта.

Таблиця 3.5

Порівняльна характеристика радіощільності та структурної організації кісткових скафолдів за даними рентгенографії ($M \pm SD$; $n = 4$)

Протокол децелюляризації	Інтенсивність сигналу в центральних ділянках, у.о.	Структурна характеристика скафолдів
№ 1	400–800	Високопориста структура з вираженою неоднорідністю та різкими перепадами радіощільності
№ 2	900–1100	Відносно однорідна структура з помірно пористістю
№ 3	600–900	Помірно пориста структура з неоднорідним розподілом радіощільності
№ 4	1300–1500	Щільна, структурно однорідна та компактна матриця

3.3. Оцінка системної реакції організму на імплантацію

Для оцінки системної реакції організму на імплантацію кісткових скафолдів було проведено аналіз показників лейкоцитарної формули та рівня тромбоцитів у периферичній крові експериментальних тварин. Зазначені параметри є чутливими індикаторами розвитку запальних процесів, імунної відповіді та можливих порушень гемостазу, що можуть виникати у відповідь на введення біоматеріалів. Аналіз лейкоцитарної формули дозволяє оцінити характер і спрямованість імунної реакції (гостре чи хронічне запалення, алергічні або стрес-індуковані зміни), тоді як визначення рівня тромбоцитів є важливим для виявлення потенційних порушень коагуляційного балансу та реакцій, пов'язаних із тканинним ушкодженням. Отримані результати представлено у таблиці 3.4.

Аналіз результатів дослідження показав, що в усіх досліджуваних групах тварин загальна кількість лейкоцитів та співвідношення їх субпопуляцій перебували в межах референтних значень. Зокрема, показники нейтрофілів, лімфоцитів і моноцитів не виходили за межі фізіологічного діапазону, що свідчило про відсутність ознак гострого або хронічного системного запалення. Вміст еозинофілів і базофілів залишався мінімальним у всіх групах, що виключало розвиток алергічних або гіперчутливих реакцій на імплантований матеріал. Рівень тромбоцитів у більшості досліджуваних груп також перебував у межах референтних значень. Зокрема, у групі № 1 та № 2 цей показник був вищим порівняно з контролем, однак не виходив за фізіологічні межі. У групі № 3 та № 4 відзначалася значна індивідуальна варіабельність рівня тромбоцитів ($8,03 \pm 5,86\%$), проте середнє значення залишалось в межах норми. Отже, отримані дані не свідчили про розвиток системних порушень гемостазу.

Комплексна оцінка показників лейкоцитарної формули свідчила про відсутність вираженої системної запальної та імунної реакції на імплантацію досліджуваних кісткових скафолдів. Відсутність підвищення рівня

лейкоцитів та нейтрофілів вказувала на те, що імплантація не супроводжувалася розвитком гострого запального процесу, тоді як стабільні показники лімфоцитів та моноцитів свідчили про відсутність активації системної імунної відповіді.

Таблиця 3.4

Порівняльна характеристика показників лейкоцитарної формули та рівня тромбоцитів у периферичній крові експериментальних тварин (M ± SD; n = 4)

Показник	Контроль	№ 1 / № 2	№ 3 / № 4	Референтні значення
Лейкоцити, %	0,13 ± 0,08	0,19 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,03 – 0,37
Нейтрофіли, %	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 – 0,21
Еозинофіли, %	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 – 0,01
Базофіли, %	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,00 – 0,02
Моноцити, %	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,00–0,03
Лімфоцити, %	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,00 – 0,15
Тромбоцити, %	7,30 ± 4,62	12,00 ± 1,87	8,03 ± 5,86	1,65 – 14,76

* p < 0,05 різниця статистично значуща порівняно з контролем

З урахуванням отриманих даних, а також результатів макроскопічної оцінки, виявлені коливання окремих гематологічних показників, зокрема тромбоцитів, можуть бути пов'язані з фізіологічними процесами тканинної

регенерації, включаючи ангиогенез та ремоделювання, а не з розвитком патологічної реакції організму.

Таким чином, результати гематологічного аналізу не виявили ознак системних порушень гемопоезу або вираженої імунної відповіді у експериментальних тварин після імплантації кісткових скафолдів, що підтверджувало їх задовільну біосумісність на системному рівні.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження встановлено, що умови децелюляризації визначали ефективність видалення клітинних компонентів, ступінь збереження позаклітинного матриксу, мікроархітектурні характеристики кісткових скафолдів та їх біосумісність *in vivo*, що обумовлювало можливість цілеспрямованого вибору протоколу залежно від функціонального призначення біоматеріалу.

1. Отримано кісткові скафолди з губчастої кісткової тканини астрагалу великої рогатої худоби із застосуванням різних протоколів децелюляризації.

2. Встановлено, що вміст залишкової ДНК за умов застосування протоколів № 1 та № 2 був найнижчим (у 3,0 та 3,3 раза, відповідно, меншим порівняно з контролем), що могло свідчити про високу ефективність видалення клітинних компонентів. Водночас найбільше збереження білкового компоненту забезпечував протокол № 1, за якого концентрація білка перевищувала контроль у 3,2 раза. Комплексний аналіз із використанням індексу ефективності показав, що оптимальний баланс між очищенням і збереженням структури матриксу досягався за умов застосування протоколу № 1.

3. Встановлено залежність мікроархітектури скафолдів від протоколу децелюляризації: найбільш пористу структуру відмічено за умов застосування протоколу № 1; протоколи № 2 та № 3 характеризувалися помірною пористістю, тоді як протокол № 4 забезпечував формування щільної та структурно однорідної матриці.

4. Встановлено, що імплантація кісткових скафолдів не супроводжувалася суттєвими змінами маси тіла експериментальних тварин, маси внутрішніх органів або розвитком локальних патологічних змін, що свідчило про їх задовільну біосумісність *in vivo*.

5. Показано відсутність виражених змін лейкоцитарної формули та ознак системної запальної або імунної відповіді на імплантацію.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Yang, L., Li, W., Yu, Y., Wang, H. and Wang, X. (2026). Biomaterial-assisted gene therapy for bone repair. *Materials today. Bio*, 37, p. 102886.
2. Emma, S., Armaan, G. and Zhidao, X. (2022). Manufacturing artificial bone allografts: a perspective. *Biomater Translational*, 3(1), pp. 65–80.
3. Xu, P., Kankala, R., Wang, S. and Chen, A. (2024). Decellularized extracellular matrix-based composite scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Regenerative Biomaterials*, 11, pp. 1–20.
4. Shevchuk, O., Korcheva, V., Moskalenko, N., Kyryk, V., Kot, K. and Krasnienkov, D. (2025). Application of decellularization methods for scaffold production: advantages, disadvantages, biosafety and modifications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13, p. 1621641.
5. Crapo, P., Gilbert, T. and Badylak, S. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12), pp. 3233–3243.
6. Šromová, V., Sobola, D. and Kaspar, P. (2023). A brief review of bone cell function and importance. *Cells*, 12(21), p. 2576.
7. Lin, X., Patil, S., Gao, Y. and Qian, A. (2020). The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration. *Front Pharmacol*, 11, p. 757.
8. Karamanos, N., Theocharis, A., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S., Vynios, D., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V. and Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The FEBS Journal*, 288(24), pp. 6784–6823.
9. Giannitelli, S., Basoli, F., Mozetic, P., Piva, P., Bartuli, F., Luciani, F., Arcuri, C., Trombetta, M., Rainer, A. and Licoccia, S. (2015). Graded porous polyurethane foam: a potential scaffold for oro-maxillary bone regeneration. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 51, pp. 329–335.

10. Yan, Y., Chen, H., Zhang, H., Guo, C., Yang, K., Chen, K. and Deng, L. (2019). Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration. *Biomaterials*, 190, pp. 97–110.
11. Roach, H. (1994). Why does bone matrix contain non-collagenous proteins. The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int*, 18(6), pp. 617–628.
12. Niu, Y., Du, T. and Liu, Y. (2023). Biomechanical characteristics and analysis approaches of bone and bone substitute materials. *J Funct Biomater*, 14(4), p. 212.
13. Kanchanawong, P. and Calderwood, D. (2023). Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell–ECM adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 24, pp. 142–161.
14. Beederman, M., Lamplot, J., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S., Zhang, W., Zhang, J., Kong, Y., Denduluri, S., Rogers, M., Pratt, A., Haydon, R., Luu, H., Angeles, J., Shi, L. and He, T. (2013). BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng*, 6(8), pp. 32–52.
15. Wan, W., Cheng, B., Zhang, C., Ma, Y., Li, A., Xu, F. and Lin, M. (2019). Synergistic effect of matrix stiffness and inflammatory factors on osteogenic differentiation of MSC. *Biophys J*, 117(1), pp. 129–142.
16. Mathews, S., Bhonde, R., Gupta, P. and Totey, S. (2012). Extracellular matrix protein mediated regulation of the osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 84(2), pp. 185–192.
17. Gruskin, E., Doll, B., Futrell, F., Schmitz, J. and Hollinger, J. (2012). Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev*, 64(12), pp. 1063–1077.
18. Yu, Y., Hua, S., Yang, M., Fu, Z., Teng, S., Niu, K., Zhao, Q. and Yi, C. (2016). Fabrication and characterization of electrospinning/3D printing bone tissue engineering scaffold. *RSC Adv*, 6, pp. 110557–110565.

19. Heath, D. (2019). A review of decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative. *Regen Med Transl Med*, 5, pp. 155–166.
20. Robb, K., Shridhar, A. and Flynn, L. (2018). Decellularized matrices as cell-instructive scaffolds to guide tissue-specific regeneration. *ACS Biomater Sci Eng*, 4, pp. 3627–3643.
21. Mendibil, U., Ruiz-Hernandez, R., Retegi-Carrion, S., Garcia-Urquia, N., Olalde-Graells, B. and Abarategi, A. (2020). Tissue-specific decellularization methods: rationale and strategies to achieve regenerative compounds. *Int J Mol Sci*, 21, p. 5447.
22. Gilbert, T., Sellaro, T. and Badylak, S. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), pp. 3675–3683.
23. Funamoto, S., Nam, K., Kimura, T., Murakoshi, A., Hashimoto, Y., Niwaya, K. and Kishida, A. (2010). The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*, 31(13), pp. 3590–3595.
24. Rajab, T., O'Malley, T. and Tchantchaleishvili, V. (2020). Decellularized scaffolds for tissue engineering: Current status and future perspective. *Artificial Organs*, 44(10), pp. 1031–1043.
25. Wang, C., Huang, W., Zhou, Y., He, L., He, Z., Chen, Z., He, X., Tian, S., Liao, J., Lu, B. and Wei, Y. (2020). 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials*, 5(1), pp. 82–91.
26. Sola, A., Bertacchini, J., D'Avella, D., Anselmi, L., Maraldi, T., Marmiroli, S. and Messori, M. (2019). Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 96, pp. 153–165.
27. Jin, C., Zhang, X., Jin, Y., Chien, P. and Heo, C. (2025). Acellular extracellular matrix scaffolds in regenerative medicine: Advances in decellularization and clinical applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 16(10), p. 383.

28. Amirazad, H., Dadashpour, M. and Zarghami, N. (2022). Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering. *J Biol Eng*, 16, p. 1.
29. Chan, B. and Leong, K. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*, 17(4), pp. 467–479.
30. Wang, F., Cai, X., Shen, Y. and Meng, L. (2022). Cell-scaffold interactions in tissue engineering for oral and craniofacial reconstruction. *Bioactive materials*, 23, pp. 16–44.
31. Meesuk, L., Suwanprateeb, J., Thammarakcharoen, F., Tantrawatpan, C., Kheolamai, P., Palang, I., Tantikanlayaporn, D. and Manochantr, S. (2022). Osteogenic differentiation and proliferation potentials of human bone marrow and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Scientific reports*, 12(1), p. 19509.
32. Shen, C., Yang, C., Xu, S. and Zhao, H. Comparison of osteogenic differentiation capacity in mesenchymal stem cells derived from human amniotic membrane (AM), umbilical cord (UC), chorionic membrane (CM), and decidua (DC). *Cell & bioscience*, 9, p. 17.
33. Zheng, W., Bai, Z., Huang, S., Jiang, K., Liu, L. and Wang X. (2022). The Effect of Angiogenesis-Based Scaffold of Mesoporous Bioactive Glass Nanofiber on Osteogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), p. 12670.
34. Kim, B., Das, S., Jang, J. and Cho, D. (2020). Decellularized Extracellular Matrix-based Bioinks for Engineering Tissue- and Organ-specific Microenvironments. *Chemical reviews*, 120(19), pp. 10608–10661.
35. Hussey, G., Dziki, J. and Badylak, S. (2018). Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nature Reviews Materials*, 3(10) p. 1038
36. Brown, M., Li, J., Moraes, C., Tabrizian, M. and Li-Jessen, N. (2022). Decellularized extracellular matrix: New promising and challenging biomaterials for regenerative medicine. *Biomaterials*, 289, pp. 121786.

37. Yang, Q., Tan, L., He, C., Liu, B., Xu, Y., Zhu, Z., Shao, Z., Gong, B. and Shen, Y. (2015). Redox-responsive micelles self-assembled from dynamic covalent block copolymers for intracellular drug delivery. *Acta biomaterialia*, 17, pp. 193–200.
38. Zhang, A., Zhu, S., Sun, B., Nan, C., Cong, L., Zhao, Z. and Liu, L. (2025). 3D cell-laden scaffold printed with brain acellular matrix bioink. *Journal of Nanobiotechnology*, 23, pp. 564.
39. Xu, P., Kankala, R., Wang, S. and Chen, A. (2023). Decellularized extracellular matrix-based composite scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Regenerative biomaterials*, 11, p. 107.
40. Zhang, Y., He, Y., Bharadwaj, S., Hammam, N., Carnagey, K., Myers, R., Atala, A. and Van Dyke, M. (2009). Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials*, 30(23-24), pp. 4021–4028.
41. Gilbert, T., Sellaro, T. and Badylak, S. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), pp. 3675–3683.
42. Fernandez, P., and Ahearne, M. (2019). The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. *Scientific reports*, 9(1), p. 14933.
43. Navindaran, K., Kang, J. and Moon, K. (2023). Techniques for characterizing mechanical properties of soft tissues. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 138, p. 105575.
44. Palmroth, A., Pitkänen, S., Hannula, M., Paakinaho, K., Hyttinen, J., Miettinen, S. and Kellomäki, M. (2020). Evaluation of scaffold microstructure and comparison of cell seeding methods using micro-computed tomography-based tools. *Journal of the Royal Society, Interface*, 17(165), p. 20200102.
45. Fragogeorgi, E., Rouchota, M., Georgiou, M., Velez, M., Bouziotis, P. and Loudos, G. (2019). *In vivo* imaging techniques for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering*, 10, p. 2041731419854586.
46. Farjaminejad, S., Farjaminejad, R., Sotoudehbagha, P. and Razavi, M. (2025). Non-Invasive Medical Imaging in the Evaluation of Composite Scaffolds in

Tissue Engineering: Methods, Challenges, and Future Directions. *J. Compos. Sci*, 9, p. 400.

47. Mendibil, U., Lópiz-Morales, Y., Arnaiz, B., Ruiz-Hernández, R., Martín, P., Di-Silvio, D., Garcia-Urquia, N., Elortza, F., Azkargorta, M., Olalde, B. and Abarrategi, A. (2024). Development of bioactive solid-foam scaffolds from decellularized cartilage with chondrogenic and osteogenic properties. *Materials today. Bio*, 28, p. 101228.

48. Hussein, K. H., Park, K., Kang, K. and Woo, H. (2016). Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 67, pp. 766–778.

49. Harmand, M., Bordenave, L., Bareille, R., Naji, A., Jeandot, R., Rouais, F. and Ducassou, D. (1991). In vitro evaluation of an epoxy resin's cytocompatibility using cell lines and human differentiated cells. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2(1), pp. 67–79.

50. Müller U. (2008). In vitro biocompatibility testing of biomaterials and medical devices. *Medical device technology*, 19(2), pp. 30–34.

51. Gupta, S., Dinda, A., Potdar, P. and Mishra, N. C. (2013). Fabrication and characterization of scaffold from cadaver goat-lung tissue for skin tissue engineering applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 33(7), pp. 4032–4038.

52. Onuki, Y., Bhardwaj, U., Papadimitrakopoulos, F. and Burgess, D. (2008). A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *Journal of diabetes science and technology*, 2(6), pp. 1003–1015.

53. Orlando, G., Farney, A., Iskandar, S., Mirmalek-Sani, S., Sullivan, D., Moran, E., De Coppi, P., Wood, K., Stratta, R., Atala, A., Yoo, J. and Soker, S. (2012). Production and implantation of renal extracellular matrix scaffolds from porcine kidneys as a platform for renal bioengineering investigations. *Annals of surgery*, 256(2), pp. 363–370.

54. Park, K., Park, S., Yang, S., Hong, S. H. and Woo, H. (2013). Preparation of immunogen-reduced and biocompatible extracellular matrices from porcine liver. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(2), pp. 207–215.
55. Sun, X., Liu, C., Shi, Y., Li, C., Sun, L., Hou, L. and Wang, X. (2019). The assessment of xenogeneic bone immunotoxicity and risk management study. *Biomedical engineering online*, 18(1), p. 108.
56. Elder, S., Chenault, H., Gloth, P., Webb, K., Recinos, R., Wright, E., Moran, D., Butler, J., Borazjani, A. and Cooley, A. (2018). Effects of antigen removal on a porcine osteochondral xenograft for articular cartilage repair. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 106(8), pp. 2251–2260.
57. Scarano, A., Khater, A., Gehrke, S., Inchingolo, F. and Tari, S. (2024). Animal Models for Investigating Osseointegration: An Overview of Implant Research over the Last Three Decades. *Journal of functional biomaterials*, 15(4), p. 83.
58. Sehic, E. and de Miguel-Gómez, L. (2024). Standardizing decellularization protocols for optimized uterine tissue bioengineering. *Regenerative therapy*, 28, pp. 183–190.
59. Yazdanpanah, Z., Johnston, J., Cooper, D. and Chen, X. (2022). 3D Bioprinted Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State-Of-The-Art and Emerging Technologies. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, p. 824156.
60. Kasravi, M., Ahmadi, A., Babajani, A., Mazloomnejad, R., Hatamnejad, M., Shariatzadeh, S., Bahrami, S. and Niknejad, H. (2023). Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials research*, 27(1), p. 10.
61. Jiang, B., Akgun, B., Lam, R., Ameer, G. and Wertheim, J. (2015). A polymer-extracellular matrix composite with improved thromboresistance and recellularization properties. *Acta biomaterialia*, 18, pp. 50–58.
62. Murray, P., García Godoy, C. and García Godoy, F. (2007). How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*, 12(3), pp. 258–266.

63. Macchiarini, P., Jungebluth, P., Asnaghi, M., Rees, L., Cogan, T., Dodson, A., Martorell, J., Bellini, S., Parnigotto, P., Dickinson, S., Hollander, A., Mantero, S., Conconi, M. and Birchall, M. (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, 372(9655), pp. 2023–2030.
64. Ren, J., Li, Z., Liu, W., Fan, Y., Qi, L., Li, S., Kong, C., Zou, H. and Liu, Z. (2024). Demineralized bone matrix for repair and regeneration of maxillofacial defects: A narrative review. *Journal of dentistry*, 143, p. 104899.
65. Peiyao X., Ranjith Kumar K., Shibin W. and Aizheng Ch. (2024). Decellularized extracellular matrix-based composite scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine, *Regenerative Biomaterials*, 11, p. 107.
66. Schmitz, T., Dede E., Spierings, J., de Boer, J., Ito, K. and Foolen, J. (2021). Solid-phase silica-based extraction leads to underestimation of residual DNA in decellularized tissues. *Xenotransplantation*, 28(1), p. 12643.
67. Palaz, F., Kalkan, A., Tozluyurt, A. and Ozsoz, M. (2021). CRISPR-based tools: Alternative methods for the diagnosis of COVID-19. *Clinical biochemistry*, 89, pp.1-13.
68. Kielkopf, C., Bauer, W. and Urbatsch, I. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4, pp.102269.
69. Vavken, P., Joshi, S. and Murray, M. (2009). TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 27(12), pp. 1612–1618.
70. Keane, T., Swinehart, I. and Badylak, S. (2015). Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods (San Diego, Calif.)*, 84, pp. 25–34.
71. Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A., Bozec, L. and Mudera, V. (2016). Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *International journal of nanomedicine*, 11, pp. 4743–4763.

72. Bertassoni, L. and Swain, M. (2017). Removal of dentin non-collagenous structures results in the unraveling of microfibril bundles in collagen type I. *Connective tissue research*, 58(5), pp. 414–423.