

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Кубанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Сотниченко Александр Сергеевич

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРКАСА
ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СЕРДЦА И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С
МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ
СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Научный руководитель –
доктор биологических наук
профессор А.А. Славинский

Краснодар – 2016

Оглавление

Введение.....	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО СЕРДЦА (Обзор литературы).....	11
1.1 Ортотопическая трансплантация донорского сердца человеку: лимитирующие факторы.	11
1.2 Тканевая инженерия как перспективное направление по созданию искусственных органов	17
1.3 Свойства биологических каркасов, применяемых в тканевой инженерии.....	24
1.4 Стволовые клетки и возможности их использования в регенеративной медицине.	28
1.5 Современные подходы к созданию тканеинженерного сердца	34
Резюме.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1 Морфологический анализ	39
2.2 Иммуногистохимический анализ.	40
2.3 Количественное определение содержания ДНК.	45
2.4 Исследование проходимости для растворов сосудистого русла	46
2.5 Оценка механических свойств децеллюляризированного каркаса сердца крысы.	46
2.6 Выделение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток	48
2.7 Статичная рецеллюляризация образцов.	48
2.8 Оценка жизнеспособности стволовых клеток на децеллюляризированном каркасе сердца	48

2.9 Выявление локализации жизнеспособных клеток в рецеллюляризированном сердце	50
2.10 Статистический анализ.....	50
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО И РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО КАРКАСА СЕРДЦА КРЫСЫ	
3.1 Разработка протокола децеллюляризации сердца крысы.....	52
3.2 Свойства внеклеточного матрикса децеллюляризированного сердца крысы.....	56
3.3 Характеристика взаимодействия децеллюляризированного матрикса сердца крысы с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками.....	71
Резюме	85
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	88
ВЫВОДЫ.....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	101
ЛИТЕРАТУРА.....	102

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания – основная причина инвалидности и преждевременной смерти жителей экономически развитых стран. Рост заболеваемости, поражение людей всё более молодого возраста делают эти болезни важнейшей медико-социальной проблемой здравоохранения (Зайратьянц О.В. и соавт., 2010; Ситникова М. Ю. и соавт., 2012; Howard P. A. и соавт., 2015). Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) – одно из самых частых осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы (Крылова Н.С. и соавт., 2011; Фролова Э. Б. и соавт., 2013; Зайратьянц О.В. и соавт., 2014; Page K. et al., 2015). Количество больных, которые достигают терминальной стадии ХСН, постоянно растет.

Трансплантация сердца – хирургический способ лечения терминальной стадии ХСН (Барбухатти К.О. и соавт., 2012; Gass A. L. et al., 2015). Ежегодно в мире проводится более 2500 операций по пересадке сердца. Абсолютными показаниями к операции являются доброкачественные опухоли сердца, кардиомиопатии различного происхождения, неоперабельные врожденные пороки сердца (Хубутия М.Ш. и соавт., 2010; Кактурский Л. В., 2011; Пауков В.С. и соавт., 2014; Doenst T. и соавт., 2015). Отторжение аллотрансплантата сердца – серьезная проблема в течение первого года после трансплантации, долгосрочный прогноз в основном ограничен иммуносупрессией и, как следствие, возникновением инфекционных осложнений, гипертензии, почечной недостаточности, злокачественных опухолей и васкулопатии трансплантата (Островский Ю.П. и соавт., 2011; Барбухатти К.О. и соавт., 2013; Котина А. Д. и соавт., 2014; Allou N. et al., 2015; Ferrero P. et al., 2015). Процедура трансплантации сердца ограничена вследствие малого

числа доноров и растущего количества реципиентов (Kellar C. A., 2015) Организация донорства органов, сложность правового регулирования, острая нехватка донорских органов, сложность их доставки, необходимость консервация донорских сердец, трудностью поиска иммунологически совместимых органов, выбор реципиентов для трансплантации, пожизненное назначение иммуносупрессивной терапии, продолжают оставаться наиболее актуальными вопросами трансплантологии (Бокерия Л. А. и соавт., 2012; Минасян С. М. и соавт., 2013; Суджаева О. А. и соавт., 2014; Салютин Р. В. и соавт., 2014). Поэтому наиболее перспективным направлением патологии можно считать развитие тканевой инженерии (Atala A., 2005; Севастьянов В. И. и соавт., 2011; Scarritt M. E. et al., 2015).

В развитии современной тканевой инженерии приоритетным направлением является разработка биоинженерных каркасов и биоматериалов, применение которых позволило бы решать как этические, так и иммунологические проблемы трансплантологии (Ахмедов Ш. Д., и соавт., 2009; Lim M. L. et al., 2013; Севастьянов В. И. и соавт., 2014; Li Y. et al., 2015). Для создания органов и тканей будут использоваться аутологичные стволовые клетки реципиентов, что позволит избежать пожизненного назначения иммуносупрессивной терапии и существенно улучшит качество жизни пациентов. Неспособность природных материалов полностью воспроизводить сложную структуру межклеточного матрикса привела к необходимости использовать децеллюляризированные естественные межклеточные матриксы, полученные от доноров.

Децеллюляризация — это способ получения каркасов, который направлен на удаление клеток с сохранением внеклеточного матрикса и трехмерности структуры органа (Badylak S. F et al., 2011; Keane T. J., 2015; Wang H. et al., 2015; Momtahan N. et al., 2015). Методы оценки

эффективности децеллюляризации, поиск ее оптимального протокола требуют проведения патоморфологических исследований, направленных на всестороннее изучение структур получаемых каркасов. Перспективы применения децеллюляризованных естественных органов будут зависеть от выработки специфичных для каждой ткани методов ее получения и оценки (Chan V. et al., 2015; Kawasaki T. et al., 2015).

В мировой литературе имеются единичные морфологические оценочные данные, отсутствуют четкие критерии, характеризующие пригодность каркаса децеллюляризованного органа для использования в тканевой инженерии (Ott H.C. et al., 2008; Crapo P. M et al., 2011; Gilbert T.W. et al., 2011). Патоморфологическая оценка каркаса тканеинженерного сердца, необходимая для разработки способов его создания, представляется актуальной в связи с глобальной распространенностью сердечно-сосудистой патологии и перспективой развития регенеративной медицины.

Цель исследования: охарактеризовать морфологические изменения структур сердца после децеллюляризации и оценить его пригодность для последующей рецеллюляризации.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи:**

1) Модифицировать протокол децеллюляризации сердца крысы для уменьшения времени воздействия детергентов и минимизации структурных повреждений матрикса.

2) Доказать факт отсутствия сохранных клеток или отдельных внутриклеточных структур на каркасе децеллюляризованного сердца с помощью методов иммуногистохимии, световой и флуоресцентной микроскопии, оценить содержание белков внеклеточного матрикса и ДНК после проведения децеллюляризации.

3) На основе данных электронной микроскопии охарактеризовать ультраструктуру матрикса сердца до и после проведения децеллюляризации. Установить основные прочностные механические свойства нативных и ацеллюлярных образцов.

4) Разработать протокол рецеллюляризации сердца крысы мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками.

5) Определить выживаемость, способность к адгезии и направление дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, заселенных в ацеллюлярный матрикс сердца крысы.

Научная новизна исследования

Разработан модифицированный детергент-энзиматический протокол децеллюляризации сердца крысы, позволяющий максимально эффективно сохранить гистологическую структуру внеклеточного матрикса сердца, его структурные белки (коллаген I и IV типа, ламинин, фибронектин, эластин), факторы роста (VEGF), элиминировать внутриклеточные и мембранные молекулы-антигены (ДНК, МНС I типа, фактор Виллебранда, тропомиозин, десмин), обеспечить щадящий режим обработки биологического материала, снизить концентрацию и время экспозиции детергентов, а также вероятность бактериальной контаминации получаемого каркаса.

Предложен способ эффективной рецеллюляризации внеклеточного матрикса сердца, впервые дана оценка жизнеспособности, адгезии и направлению дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на децеллюляризованном каркасе сердца крысы после их интравазального введения в ацеллюлярный сердечный матрикс.

Теоретическая и практическая значимость. Данные проведенных экспериментальных исследований улучшили понимание процесса децеллюляризации сердца, расширили представления о процессе

рецеллюляризации внеклеточного матрикса, создали основу для дальнейших разработок в области тканевой инженерии сердца.

Методология и методы исследования заключалась в системном подходе и комплексном анализе результатов морфологических, молекулярных методов исследования децеллюляризованного сердечного матрикса и их обязательном сопоставлении с результатами исследования нативного органа. Был проведен критический анализ научных трудов отечественных и зарубежных ученых в области патоморфологии, молекулярной и клеточной биологии, гистологии, регенеративной медицины, которые занимались проблемой создания ацеллюлярных сердечных матриксов, изучением их основных свойств и взаимодействия со стволовыми клетками.

Методами исследования, использованными в работе были: гистологический, иммуногистохимический, молекулярно-биологический, физический, описательный и статистический. Использовался ряд традиционных эмпирическо-теоретических и экспериментальных методов научного познания.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В децеллюляризованном на основе модифицированного детергент-энзиматического протокола с применением дезоксихолата натрия и ДНКазы внеклеточном матриксе сердца крысы отсутствуют неповреждённые клетки, клеточные ядра, белки клеточных мембран (МНС I типа, фактор Виллебранда, десмин), внутриклеточные сократительные белки (тропомиозин), сохраняются белки (коллаген I и IV типа, ламинин, эластин, фибронектин, VEGF), происходит снижение количественного содержания ДНК до уровня не менее 20% и повышение основных прочностных механических характеристик не менее, чем в 1,8-1,9 раза в сравнении с исходным.

2. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, заселенные на децеллюляризированный матрикс сердца крысы, способны прикрепляться к нему, остаются жизнеспособными и сохраняют метаболическую активность, а также приобретают потенцию к дифференцировке в эндотелиальном и мышечном направлении без добавления факторов роста и дифференцировочных сред.

3. Ацеллюлярный сердечный внеклеточный матрикс, рецеллюляризированный стволовыми клетками, может быть потенциальной основой для создания тканеинженерного сердца.

Достоверность результатов исследования обеспечена обширной эмпирической базой, опирающейся на теоретический и практический материал, собранный автором, адекватной статистической обработкой материала. В процессе подготовки и проведения работы основные ее положения обсуждались на научных и научно-практических форумах с участием ведущих специалистов.

По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 5 в журналах, из перечня рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов кандидатских диссертаций. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Разработанная методика проведения децеллюляризации сердца крысы и его последующей рецеллюляризацией внедрена в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины, в центральной научно исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 им. С. В. Очаповского» МЗКК, в Центре научно-инновационного развития ГБОУ ВПО СтГМУ Минздрава России. Научные положения используются в лекционном курсе и при проведении практических занятий со студентами 3 курса лечебного и педиатрического

факультета по дисциплине «Иммунология» на кафедре клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, в лекционном курсе и при проведении практических занятий со студентами 3 курса лечебного и педиатрического факультетов, при проведении практических занятий с интернами по теме "Регенерация органов и тканей" на кафедре патологической анатомии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертации изложены на Второй всероссийской школе по регенеративной медицине для молодых ученых с международным участием «От трансплантации к регенеративной медицине» (Краснодар, 2012), Третьей всероссийской школе для молодых ученых с международным участием «Регенеративная медицина. Мировой опыт биоинженерии сердца и легких» (Краснодар, 2012), Международном симпозиуме и Четвертой всероссийской школе по регенеративной медицине для молодых ученых с международным участием «Регенерация органов и тканей» (Краснодар, 2013), Всемирной конференции по регенеративной медицине (Германия, Лейпциг, 2013), международной научной конференции «Наука будущего» (Санкт-Петербург, 2014), XIV всероссийской выставке научно-технического творчества молодёжи НТТМ-2014 (Москва, 2014), финале общероссийского научно-практического мероприятия «Эстафета вузовской науки – 2014» (Москва, 2014), Международном симпозиуме и Школе молодых ученых «Регенерация интраторакальных органов и тканей» (Краснодар, 2014), XIII ежегодном образовательном форуме «Создай себя сам – 2014» (Краснодар, 2014), научно-практической конференции «Сердечно-сосудистые заболевания: от профилактики до интервенции, объединяя усилия» (Уфа, 2015), Всемирной конференции по регенеративной медицине (Германия, Лейпциг, 2015).

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО СЕРДЦА (Обзор литературы)

1.1 Ортотопическая трансплантация донорского сердца человеку: лимитирующие факторы.

Сердечно-сосудистые заболевания – основная причина инвалидности и преждевременной смерти жителей экономически развитых стран. Рост заболеваемости, поражение людей всё более молодого возраста делают эти болезни важнейшей медико-социальной проблемой здравоохранения (Зайратьянц О.В. и соавт., 2010; Ситникова М. Ю. и соавт., 2012;).

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) – одно из самых частых осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы. (Дядыг А.И. и соавт., 2008; Крылова Н.С. и соавт., 2011; Фролова Э. Б. и соавт., 2013; Зайратьянц О.В. и соавт., 2014; Page K. et al., 2015) Количество больных, которые достигают терминальной стадии ХСН, постоянно растет. Согласно определению Российского кардиологического общества, конечная стадия (III-я стадия по классификации Василенко-Стражеско) характеризуется выраженными изменениями гемодинамики и тяжелыми (необратимыми) структурными изменениями органов-мишеней: сердца, легких, сосудов, головного мозга, почек (Соломахина Н.И. и соавт., 2009; Киршина Н.С. и соавт., 2009; Козиолова Н.А. и соавт., 2010; Зубайдов Р.Н. и соавт., 2010; Резник Е.В. и соавт., 2010; Акаёмова О.Н. и соавт., 2010)

Ортотопическая трансплантация сердца – единственный радикальный хирургический метод лечения больных в терминальной стадии сердечной недостаточности (Барбухатти К.О. и соавт., 2012). Каждый год в мире, по данным ВОЗ, проводятся более 5400 операций по пересадке сердца. Абсолютными показаниями к операции являются: кардиогенный шок, при котором требуется длительное внутривенное введение препаратов с положительным инотропным действием или

применение внутриаортальной баллонной контрпульсации или механического устройства для вспомогательного кровообращения, стойко сохраняющаяся сердечная недостаточность, соответствующая IV ФК NYHA, при которой имеется устойчивость к лекарственной терапии, не поддающиеся лечению и тяжелые симптомы стенокардии у больных с ИБС при невозможности выполнения реваскуляризации миокарда с помощью чрескожного вмешательства на коронарных артериях или хирургического вмешательства применяемого в полном объеме, угрожающие жизни аритмии, не поддающиеся лечению, включающему лекарственную терапию, катетерную абляцию и/или имплантацию кардиовертера-дефибриллятора (Хубутя М.Ш. и соавт., 2010). В России в 2011 г. трансплантация сердца выполнялась в 9 центрах, всего было выполнено 107 трансплантаций (Готье С.В., 2013).

Организация донорства органов, сложность правового регулирования, острая нехватка донорских органов, сложность их доставки, необходимость консервации донорских сердец, трудностью поиска иммунологически совместимых органов, выбор реципиентов для трансплантации, пожизненное назначение иммуносупрессивной терапии, продолжают оставаться наиболее актуальными вопросами трансплантологии (Fuchs J.R. et al., 2001; Галеева Г.Р., 2009; Прилуков М.Д., 2012; Бокерия Л.А. и соавт., 2012; Минасян С.М. и соавт., 2013; Суджаева О.А. и соавт., 2014; Салютин Р.В. и соавт., 2014;).

Представление о числе пациентов, нуждающихся в трансплантации органов, можно получить по данным листов ожидания (Бокерия Л.А. и соавт., 2011) Очевидно, что потребность населения в медицинской помощи по трансплантации органов не может быть меньше числа пациентов в листе ожидания на трансплантацию трупных органов медицинских организаций. Вместе с тем, число пациентов в листе ожидания центров трансплантации в значительной степени лимитировано их

трансплантационной активностью и числом таких центров, а реальная потребность в трансплантации органов значительно выше. Это становится очевидным при сравнении числа пациентов в листе ожидания центров трансплантации в России и в национальных листах ожидания других стран и численности населения. Реальная потребность в трансплантации органов в России составляет в год 1100 сердца (включая комплекс «сердце–легкие») (Готье С.В. и соавт., 2013).

Отторжение аллотрансплантата сердца – серьезная проблема в течение первого года после трансплантации. Долгосрочный прогноз в основном ограничен иммуносупрессией и, как следствие, возникновением инфекционных осложнений, гипертензии, почечной недостаточности, злокачественных опухолей, сахарного диабета *de novo* и васкулопатии трансплантата (Hoppe U.C. et al., 2005; Swedberg K. et al., 2005; Hunt S.A. et al., 2005; Островский Ю.П. и соавт. 2011; Копылова Ю.В. и соавт. 2011; Барбухатти К.О. и соавт. 2013; Котина А. Д. и соавт., 2014).

По данным Космачевой Е.Д. и соавт. (2014) наиболее частыми осложнениями послеоперационного периода у 106 пациентов, перенесших ортотопическую трансплантацию сердца были пневмонии (28,3%), реакция отторжения трансплантата (11,3%), стероидный сахарный диабет (14,6%). Причинами смерти были гнойно-септические осложнения, тромбоэмболия легочной артерии, острый панкреатит, криз отторжения трансплантата, развившийся при нарушении режима иммуносупрессивной терапии, нарушение ритма сердца.

Являясь проявлением защитной реакции организма донора против чужеродных клеток, реакция отторжения включает механизмы врожденного, клеточного и антителоопосредованного гуморального иммунного ответа. Выделяют сверхострое отторжение, острое клеточное отторжение, острое гуморальное отторжение и хроническое отторжение, проявляющееся васкулопатией трансплантата или болезнью коронарных

артерий пересаженного сердца (Шемакин С.Ю. и соавт., 2010; Воронина Т.С. и соавт., 2014).

Острейшее отторжение – молниеносная реакция, протекающая в пределах нескольких минут после трансплантации и характеризующаяся тяжелым некротическим васкулитом, ишемическим повреждением пересаженного органа. Острейшее отторжение вызывается присутствием в сыворотке реципиента высоких уровней предрасполагающих антител против антигенов на пересаженных клетках. Реакция антител с антигенами вызывает иммунокомплексное (типа феномена Артюса) повреждение в сосудах трансплантата (Clemmensen T. S. et al., 2014; Frank R. et al., 2014; Sehgal S. et al., 2015).

Острое отторжение наблюдается довольно часто и может протекать от нескольких дней до месяцев после трансплантации. Оно характеризуется некрозом клеток и нарушением функций органа. При остром отторжении участвуют как гуморальные так и клеточные механизмы (Шемакин С.Ю. и соавт., 2010). Иммуные комплексы депонируются в мелких сосудах трансплантата и вызывают острый васкулит, ведущий к ишемическим изменениям. Клеточное иммунное отторжение характеризуется некрозом паренхиматозных клеток и лимфоцитарной инфильтрацией тканей. Шилов А.В. и соавт. (2013) описывают случай острого отторжения трансплантированного сердца, сопровождавшийся чередованием участков гипертрофии и бурой атрофии кардиомиоцитов, мелкоочаговым кардиосклерозом, отеком интерстиция, фокусами некрозов кардиомиоцитов, диффузной значительно выраженной инфильтрацией интерстиция мононуклеарами. По данным Patel J.K. и соавт. (2006) в течение первого года после трансплантации сердца острое клеточное отторжение развивается у 20-40% реципиентов.

По данным литературы, 40% взрослых пациентов с пересаженным сердцем имеют один или более эпизодов острого клеточного отторжения в

течение 1 месяца после трансплантации сердца. В течение первых 6 мес. соответственно 60% пациентов переносит один или более эпизодов острого отторжения (Шумаков В.И., 2006). Острое отторжение пересаженного сердца остается одним из факторов, лимитирующих выживаемость после трансплантаций сердца, несмотря на постоянный поиск новых лекарственных средств и совершенствование схем иммуносупрессивной терапии (Шумаков В.И. и соавт., 2005; Кормер А.Я., 2006; Кормер А.Я. и соавт., 2008; Шемакин С.Ю. и соавт., 2010).

Хроническое отторжение или васкулопатия трансплантата наблюдается в наибольшем количестве пересаженных тканей и вызывает прогрессирующее ухудшение функции органа в течение месяцев или лет (Schmauss D. et al., 2008; Захаревич В.М., 2009; Patel J. et al., 2015; Imamura T. et al., 2015). Это уникальная форма прогрессирующего коронарного синдрома, характеризующегося дисфункцией эндотелия и множественными очагами гиперплазии интимы сосудистой стенки, результатом чего является нарастающая обструкция коронарных артерий трансплантата и, как следствие – ишемическое повреждение миокарда (Hollenberg S. M. et al., 2001). В настоящее время васкулопатия трансплантата диагностируется у 30,4 % реципиентов, переживших 5 лет, и у 49,7 % – спустя 10 лет после операции (The Registry of The International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th annual report., 2012).

Шевченко О.П. и соавт. (2011) описали роль ассоциированного с беременностью протеина плазмы А (РАРР-А), цинксодержащей металлопротеиназы, активирующей инсулиноподобный фактор роста и участвующей в патогенезе атеросклероза и в повреждении сосудов пересаженного сердца. По данным авторов, было обследовано 37 реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации сердца. Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца была диагностирована у 23 реципиентов сердца. Результаты исследования показали, что уровень

РАРР-А выше у реципиентов с болезнью коронарных артерий пересаженного сердца и не коррелирует с продолжительностью времени, прошедшего после трансплантации сердца, но связан со степенью распространенности поражения коронарного русла трансплантата (Шевченко О.П. и соавт., 2011).

Годичная выживаемость после ортотопической трансплантации сердца по данным Островского Ю.П. и соавт. (2014) составляет 79,2%. Эпизоды острого отторжения трансплантата не ухудшали выживаемость в течение 12 месяцев после ортотопической трансплантации сердца и в 71,4% случаев выявлялись у пациентов моложе 30 лет. Развитие в посттрансплантационном периоде сахарного диабета, артериальной гипертензии и дисфункции синусного узла, требующей постоянной электрокардиостимуляции, также не идентифицированы как факторы риска снижения выживаемости в течение 1 года после пересадки сердца

Пятилетняя выживаемость у пациентов, перенесших трансплантацию сердца и получающих тройную иммуносупрессивную терапию, составляет 60-70% (Hosenpud J.D. et al., 1999; Готье С.В. и соавт., 2014; Vitinius F. et al., 2015). Побочные эффекты действия иммуносупрессивной терапии оказывают негативное влияние на прогноз и качество жизни. Наиболее значимыми побочными действиями являются развитие злокачественных новообразований, риск инфекционных осложнений, нефропатия, сахарный диабет, артериальная гипертензия, неврологические нарушения, остеопороз, влияние на репродуктивное здоровье и др. (Готье С.В. и соавт., 2014).

Больные, перенесшие трансплантацию сердца, нуждаются в психологической, физической и социальной реабилитации, направленной на лечение и профилактику депрессивных расстройств, социализацию, развитие дисциплинированности в соблюдении врачебных рекомендаций по приему лекарственных средств и образу жизни, а также

стимулировании самостоятельности и независимости (Климушева Н.Ф. и соавт., 2013).

Таким образом, одной из наиболее перспективных задач в области трансплантации сердца можно считать развитие тканевой инженерии. Являясь одним из направлений регенеративной медицины, тканевая инженерия может решить проблему поиска донорских органов, развития клеточных и гуморальных реакций отторжения и необходимости назначения иммуносупрессивной терапии (Taylor D.A., 2009; Murphy S.V. et al., 2012).

1.2 Тканевая инженерия как перспективное направление по созданию искусственных органов

Тканевая инженерия – это одно из направлений регенеративной медицины, которое может стать альтернативным способом лечения пациентов, нуждающихся в органной трансплантации. Суть тканевой инженерии заключается в восстановлении целостности и функции тканей и органов с помощью биоискусственных конструкций, включающих в себя следующие компоненты (Saxena A. K. et al., 2005; Atala A., 2005; Севастьянов В. И. и соавт., 2011):

- клетки, способные формировать функционирующий внеклеточный матрикс;
- подходящий биodeградируемый носитель (матрикс) для трансплантации клеток;
- биоактивные молекулы (цитокины, факторы роста), которые оказывают биостимулирующее действие на клетки поврежденной ткани.

В развитии современной тканевой инженерии приоритетным направлением является поиск биоинженерных каркасов и biomатериалов, применение которых позволило бы решать как этические, так и иммунологические проблемы трансплантологии.

Матрицы, используемые в тканевой инженерии, делятся на два вида (Севастьянов В. И. и соавт., 2014):

- импланты из «нежизнеспособных» биологических тканей, например, биоклапаны сердца;
- системы, состоящие из биостабильного или биodeградируемого матрикса, жизнедеятельных стволовых или тканеспецифичных аутологичных или аллогенных клеток и биоактивных молекул.

Каркасы как биологические, так и искусственные призваны воспроизводить структуру нативной ткани. Они должны обладать соответствующими физическими, химическими и механическими свойствами для обеспечения клеточной адгезии и формирования трехмерной структуры при засевании собственными клетками, которые могли бы прижиться при имплантации (Bonvillain R. W. et al., 2012; Lim M. L. et al., 2013; Gilpin S. E. et al., 2014; Lee K. M. et al., 2015).

Для создания биологических каркасов необходимо децеллюляризовать нативные органы, чтобы сделать их неиммуннокомпетентными. Процесс децеллюляризации должен быть нацелен на сохранение биохимического состава, тканевой структуры, а также механических свойств сохранившегося внеклеточного матрикса на оптимальном уровне (Badylak S. F., 2007; Wainwright J. M. et al., 2009; Hoshiba T. et al., 2010; Badylak S. F. et al., 2011; Gilbert T. W. 2012). В связи с этим требуется разработка и оптимизация процессов децеллюляризации.

В научных работах за последние годы описываются децеллюляризованные органы, такие как сердце, легкие, печень, почки и попытки их ортотопической трансплантации после рецеллюляризации (Macchiarini et al., 2008; Ott et al., 2008; Ott et al., 2010; Petersen et al., 2010; Nakayama et al., 2011; Soto-Gutierrez et al., 2011; Гулай Ю. С. и соавт., 2014).

Подход к децеллюляризации целых органов основывается на большом объеме работы, который был выполнен при разработке клинических продуктов, таких как деминерализованная костная матрица, искусственная кожа, биопротезы клапанов сердца, а в последнее время бесклеточные биологические хирургические сетки (Винник Ю. С. и соавт., 2011; Курапеев Д. И. и соавт., 2012; Сергеевичев Д. С. и соавт., 2012; Насредин А. С. и соавт., 2014). Эти продукты были использованы у миллионов пациентов, многое известно о тонкостях обработки тканей, биологических свойствах каркасов после обработки, системном ответе организма на введение подобных каркасов. Несмотря на это богатство знаний, в настоящее время есть трудности в осуществлении децеллюляризации цельных органов, которые делают сложным прямую трансляцию этих знаний.

Децеллюляризация - это способ получения биологических каркасов, который направлен на удаление клеток с сохранением внеклеточного матрикса и трехмерности структуры органа (Badylak S.F et al., 2011; Wang B. et al., 2012; Hrebikova H. et al., 2013).

Цель децеллюляризации – изоляция компонентов внеклеточного матрикса ткани без каких либо потерь, повреждения или разрушений, полное удаление клеточного материала (Gilbert et al., 2006; Crapo et al., 2011). В настоящее время это представляется маловозможным, так как любой процесс, который разрушает клетки, обязательно изменяет ВКМ.

Практической целью является максимальное удаление клеточного материала, сведение к минимуму потерь и ущерба для ВКМ. Недавно были предложены объективные критерии децеллюляризации тканей:

1. отсутствие ядер при окрашивании гематоксилином и эозином, флуорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI;
2. количественное содержание ДНК менее 50 нг/мг в сухой ткани;

3. содержание фрагментов ДНК размером не более 200 п.н. (Crapo et al., 2011).

Эти критерии носят феноменологический характер, они были определены на основе многолетнего опыта изучения каркасов тонкого кишечника и мочевого пузыря, которые способствовали тканеспецифичному ремоделированию тканей после имплантации. Более поздние работы поставили эти критерии под сомнение, так как менее эффективно децеллюляризированные ткани показывали аналогичные результаты после имплантации при сравнении с эффективно децеллюляризированными тканями (Keane et al., 2012). Хотя данные критерии дают много полезной информации, можно утверждать, что они определяют лишь денуклеаризацию тканей, а не децеллюляризацию. Эти критерии используют ДНК в качестве ориентира концентрации других внутриклеточных или мембранных молекул, предполагая, что они удалены с той же эффективностью (Gilbert T.W. et al., 2012).

Наличию ДНК уделено большое внимание, поскольку многие децеллюляризированные ткани получены из ксеногенных источников, и есть опасения, что эта ДНК может быть включена в клетки-реципиенты (Zheng et al., 2005). Тем не менее, внутриклеточные и мембранные компоненты являются антигенами, которые, как было показано, обладают возможностью инициировать иммунное отторжение при трансплантации (Cooper et al., 1993; Galili et al., 2001). За исключением Gal-эпитопов, сохранение клеточных антигенов в значительной степени является не исследованным.

Межклеточное вещество рыхлой волокнистой соединительной ткани состоит из волокон и аморфного вещества. Оно является продуктом деятельности клеток этой ткани, в первую очередь фибробластов. Архитектоника и состав внеклеточного матрикса в каждой ткани являются уникальными, определяют функциональность этой ткани. Тем не менее,

структура и состав каждого конкретного белка внеклеточного матрикса остаются неизменными у различных видов (Bernard M.P et al., 1983; Exposito J.Y. et al., 1992). Это способствует тому, что внеклеточный матрикс одних видов животных не вызывает иммунного отторжения у других. При правильном удалении клеточных антигенов, которые вызывают иммунное отторжение без повреждения внеклеточного матрикса, полученный каркас может служить мощным источником сигналов и содействовать конструктивному ремоделированию тканей после повреждения. "Конструктивное ремоделирование" означает, что каркас из внеклеточного матрикса содействует формированию участка соответствующей ткани в месте имплантации, вместо образования рубцовой ткани (Badylak S.F., 2007).

Наиболее изучены внеклеточные матриксы тонкого кишечника, мочевого пузыря, кожи (Wainwright D.J., 1995; Dejardin L.M. et al., 2001; MacLeod T.M. et al., 2004; Gilbert T.W. et al., 2007; Gilbert T.W et al., 2008). Термин "конструктивное ремоделирование" был введен благодаря матриксам, полученным из подслизистой оболочки тонкого кишечника свиньи и матрикса мочевого пузыря. Эти каркасы являются довольно уникальными среди большого количества каркасов из внеклеточного матрикса по некоторому числу причин. Во-первых, они близки по строению к тонким мембранам, которые могут быть легко децеллюляризованы с использованием только лишь слабой кислоты в течение нескольких часов (Gilbert T.W. et al., 2006). Известно, что в результате этого процесса остаются коллаген, эластин, гликозаминогликаны и большое количество факторов роста. Будучи однажды изготовленными и имплантированными, каркасы быстро деградируют, а продукты их биodeградации обладают биологической активностью, включающей бактериостатическую, способствуют хемотаксису и обладают митогенными свойствами (Badylak S. et al., 2009).

Для децеллюляризации большинства комплексных тканей и органов необходимы гораздо более сложные протоколы, биологическая активность и иммунный ответ на имплантацию полученных матриксов еще требуют подробного изучения.

В докладе Daly и соавт. (2012) о децеллюляризации легких было показано, что некоторые клеточно-ассоциированные белки, сохраняются и во внеклеточном матриксе, в том числе такие как актин, тубулин и миозин. Будущие исследования должны расширить знания в этой области, чтобы показать, насколько эффективно клеточно-ассоциированные белки удаляются, и какие последствия эти белки оказывают при ответе на имплантацию для расширения нашего понимания адекватности децеллюляризации тканей.

Различные химические вещества были исследованы для изучения их способности децеллюляризовать ткани (Dong J. et al., 2013; Syed O. et al., 2014). Эти вещества обычно выбирают по способности солюбилизировать мембраны клеток и удалять клеточные компоненты из ткани при перемешивании или перфузии этих веществ.

Выделяют несколько основных категорий, а именно, детергенты, растворители, кислые и щелочные растворы и ионные растворы (Gilbert T.W. et al., 2006). Крайне редко протоколы децеллюляризации включают только на один химический агент, и эти протоколы обычно используются для тонко-мембранных внеклеточных матриксов, таких как матрикс тонкого кишечника или мочевого пузыря. Для более сложных тканей, как правило, более предпочтительной является комбинация различных химических веществ путем коротких циклов промывки в целях повышения эффективности каждого химического вещества и уменьшения общего времени, в течение которого ткань подвергается действию химических веществ (Ott et al., 2008).

Важным аспектом при использовании всех этих химических веществ во время децеллюляризации ткани является определение их остаточного количества после процедуры. Додецилсульфат натрия, в частности, имеет высокое сродство к белкам, даже при низких концентрациях (Grefrath and Reynolds, 1974; Krejci, 2007). Таким образом, весьма сомнительно его полное удаление. Хотя было высказано предположение, что последующие промывания с использованием Тритона X-100 уменьшают содержание додецилсульфата натрия в децеллюляризированной ткани сердца (Ott et al., 2008).

Если химические вещества будут оставаться в тканях, то они, а не внеклеточный матрикс, будут определять ответные реакции клеток после рецеллюляризации и последующей имплантации. Таким образом, существует необходимость проведения анализов, которые бы могли точно обнаружить присутствие химических веществ, используемых в любом протоколе, предпочтительно в количественной форме. В конечном счете, методы децеллюляризации любой интересующей ткани должны быть разработаны на основе систематических, контролируемых экспериментов с широким спектром оценок.

На сегодняшний день в большинстве протоколов децеллюляризации необходимо определение эффективности удаления клеток, эффектов воздействия детергентов на матричные белки и клеточного ответа на пересаженный матрикс. Имеется очень мало статей, в которых сравнивались бы несколько протоколов децеллюляризации. Эти процессы включают большое количество различных реагентов, часто невозможно определить влияние каждого из них. Контролируемые исследования для различных типов тканей значительно улучшат наше понимание децеллюляризации органов и тканей (Gilbert T.W., 2012).

1.3 Свойства биологических каркасов, применяемых в тканевой инженерии

Используемый в клеточной и тканевой инженерии междисциплинарный подход направлен в первую очередь на создание новых биоконпозиционных материалов для восстановления утраченных функций отдельных тканей или органов в целом. В поврежденный орган или ткань имплантируют носители из биodeградирующих материалов, которые используются в сочетании с биоактивными веществами. Тканезамещающие имплантаты должны иметь пролонгированный срок биodeградации и обладать спектром специальных свойств. Прежде всего, продукты деградации материала не должны быть токсичными, конструкция должна сохранять форму и достаточную прочность до тех пор, пока новая ткань организма-хозяина в месте имплантации полностью не восстановится. Кроме того, материал, применяемый для изготовления конструкции, не должен быть иммуногенным, он должен поддерживать рост клеток и организацию их в ткань, а имплантат — беспрепятственно выводить из зоны воздействия продукты обмена клеток (Ofenbauer A. et al., 2012; Vinci M. C. et al., 2013).

Матрицы для биоискусственных тканей характеризуются многофункциональностью, механической прочностью и эластичностью, достаточной для хирургических манипуляций; биосовместимостью на белковом и клеточном уровнях; способностью стимулировать пролиферацию и дифференциацию клеток; пористостью, обеспечивая процессы неоваскуляризации; возможностью стерилизации стандартными способами без изменения медико-технических свойств.

Через некоторое время после имплантации в организм хозяина матрицы полностью исчезают (в зависимости от скорости роста ткани), а в месте дефекта останется только новая ткань. Также возможно внедрение матрикса с уже частично сформированной новой тканью («биоконпозит»).

Безусловно, после имплантации тканеинженерная конструкция должна сохранить свои структуру и функции в течение периода времени, достаточного для восстановления нормально функционирующей ткани в месте дефекта, и интегрироваться с окружающими тканями. Но, к сожалению, идеальные матриксы, удовлетворяющие всем необходимым условиям, пока не созданы.

Внеклеточный матрикс в любом органе является продуктом секреции клеток входящих в состав стромы той или иной ткани либо органа (Hurd S. A. et al., 2015). Комплексная трехмерная организация каркаса внеклеточного матрикса и его компонентов зависит от ткани из которой каркас был получен и является органоспецифичной (Sacks M.S. et al., 1999; Brown B., et al., 2006; Gilbert T.W. et al., 2008). В то же время структурные компоненты, такие как коллагены различных типов, ламинин, фибронектин, эластин, гиалуроновая кислота, а также ростовые факторы являются общими у большинства тканей.

Многочисленные исследования показали потенциальное значение органной специфичности в отношении источника внеклеточного матрикса, который используется в качестве каркаса для восстановления органов. Например, внеклеточный матрикс, полученный из ткани печени, может быть предпочтительным субстратом для не только для гепатоцитов, но и стромальных клеток печени (Lin P. et al., 2004; Sellaro T.L. et al., 2007; Sellaro T.L. et al., 2010). Внеклеточный матрикс из легких является предпочтительным и даже необходимым субстратом для респираторного эпителия (Lin Y.M., 2010) и так далее. Нативный состав, ультраструктура, трехмерная организация в значительной степени сохраняются при надлежащей децеллюляризации тканей, особенно если представляется возможным избежать применения повреждающих каркас веществ (Sacks M.S. et al., 1999; Brown B. et al., 2006).

Структурные и функциональные молекулы внеклеточного матрикса находятся в состоянии динамического равновесия со своим микроокружением, а также обеспечивают взаимодействие клеток друг с другом и внешней средой (Kleinman H.K. et al., 2003; Rosso F. et al., 2004). По определению, внеклеточный матрикс обладает идеальными характеристиками для нужд тканевой инженерии: будучи биологически совместимым, обладая благоприятной средой для роста кровеносных сосудов, нервов, лимфатических сосудов, для распространения питательных веществ из крови, он в состоянии пройти "конструктивное ремоделирование" и деградацию после имплантации в тело пациента (Badylak S. et al., 2000; Ritchey M.L. et al., 2003; Gilbert T.W., et al., 2007;).

Способность внеклеточного матрикса облегчать и интегрировать внутри- и внеклеточные средовые сигналы является следствием его биологических свойств, что позволяет осуществлять "конструктивное ремоделирование" тканей после имплантации внеклеточного матрикса *in vivo* (Badylak S.F. et al., 1995; Boruch A.V. et al., 2010; Badylak S.F. et al., 2011). Эта реконструкция не может быть исключительно связана с эластическими, биомеханическими свойствами, прикреплением клеток организма-хозяина к коллагену, фибронектину и ламинину, входящим в состав каркаса.

Такие факторы роста, находящиеся в децеллюляризованном матриксе, как фактор роста эндотелия сосудов - VEGF (Hodde J.P. et al., 2001), фактор роста фибробластов (Hodde J.P. et al., 2005; Voytik-Harbin S.L. et al., 2005) и трансформирующий фактор роста TGF- β (Hodde J.P. et al., 2002) ответственны за ангиогенез, обильную клеточную инфильтрацию, деление клеток и организацию внеклеточного матрикса после имплантации. Указанные факторы сохраняются в тканях после децеллюляризации и стерилизации каркасов (McDevitt C.A. et al., 2003; Hodde J.P. et al., 2002; Hodde J.P. et al., 2005), оказывают влияние на

последующее ремоделирование тканей и высвобождаются во время деградация децеллюляризованного матрикса (Voytik-Harbin, S.L., et al., 1997; Hodde J.P. et al., 2001; Hodde J. et al., 2002; McDevitt C.A. et al., 2003; Hodde J.P. et al., 2005;).

Процесс деградации каркаса можно рассматривать в качестве механизма контроля высвобождения молекул, составляющих внеклеточный матрикс. Деградация и высвобождение факторов роста продолжается до тех пор, пока матрикс не будет полностью разрушен. Продукты распада этих молекул могут иметь значение в последующих событиях, происходящих при ремоделировании каркаса (Badylak S.F., et al., 2001; Zantop T., et al., 2006).

Биологические свойства внеклеточного матрикса зависят главным образом от эффективности деградации материала каркаса, которая облегчает конструктивное ремоделирование поврежденной ткани. В зависимости от органа и вида ткани, используемой для получения внеклеточного матрикса, а также от способа его получения такие аспекты децеллюляризации, как использование определенных химических агентов, методик стерилизации могут оказывать влияние на способность организма реципиента регулировать происходящий иммунный ответ и воздействовать на биодеградацию материала каркаса (Badylak S.F. et al., 2009).

Количественные исследования ^{14}C – меченых внеклеточных матриксов тонкого кишечника, использованных для увеличения мочевого пузыря (Record R.D., et al., 2001) и в реконструктивных операциях на ахилловом сухожилии (Gilbert T.W. et al., 2007), показали, что 50% или более от трансплантированных внеклеточных матриксов деградирует либо удаляется из места имплантации в течение 28 дней. Продукты деградации выделялись из организма с мочой и не включались в обмен в других тканях. Факторы микроокружения также играют важную роль в *in situ* регенерации и трансформации имплантированных тканей, что было

показано на примере применения аортального аллотрансплантата при замене трахеи (Martinod E., et al. 2005, Makris D., et al. 2010). Таким образом, понимание дополнительных факторов, которые способствуют ремоделированию очень важно для эффективного использования внеклеточных матриксов.

Механические свойства внеклеточного матрикса зависят от архитектоники и кинематики коллагеновых волокон составляющих его (Zou Y., et al., 2012). Нативная ткань, используемая для получения децеллюляризированного каркаса, во многом определяет его структурные характеристики такие как размер волокон, их ориентация и взаиморасположение, а также механические свойства. Например, волокна децеллюляризированного каркаса подслизистой основы тонкого кишечника имеют предпочтительно продольную спиральную ориентацию вдоль продольной оси тонкой кишки (Orberg J.W. et al., 1982; Orberg J. W., et al. 1983). Вполне вероятно, что это структурное расположение облегчает расширение и сужение тонкого кишечника во время перистальтики и транспортировки химуса.

1.4 Стволовые клетки и возможности их использования в регенеративной медицине.

Клетка может находиться в нескольких состояниях: пролиферировать, переходить в состояние покоя, дифференцироваться и становиться стволовой. Основные свойства стволовых клеток: способность к самоподдержанию, продукции дифференцированных дочерних клеток и образованию клонов. Стволовые клетки необходимы для обеспечения гомеостаза быстро обновляющихся тканей и являются пролиферативным резервом. Стволовые клетки составляют малую часть клеточной популяции организма, но обеспечивают продукцию большого количества

дифференцированных клеток. В организме стволовые клетки находятся в определенном микроокружении.

А.А. Максимов (1909) постулировал существование стволовой клетки в докладе «Лимфоцит как общая стволовая клетка различных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих».

Вейгерс и Вейсман (2004) классифицировали стволовые клетки по способности продуцировать клеточные линии на следующие виды: тотипотентные – клетки, способные дать начало всему эмбриону и экстраэмбриональным тканям, плюрипотентные – клетки, продуцирующие все клетки эмбриона, но не способные дать начало развитию целостного организма, мультипотентные – клетки, дающие начало нескольким клеточным линиям, олигопотентные – клетки, дающие начало более ограниченному числу клеточных линий, чем мультипотентные, и унипотентные – клетки, развивающиеся только в один тип зрелых клеток.

Rao (2004) предложил механистическую систему классификации стволовых клеток, подразделяя их по происхождению на: эмбриональные, фетальные, взрослые, специфические для разных тканей.

Биологическая значимость стволовых клеток заключается в том, что они играют центральную роль в организации многоклеточных организмов. Стволовые клетки являются центральным элементом многократно повторяющихся структурно-функциональных единиц, из которых построены органы и ткани, они обеспечивают клеточный гомеостаз и являются пролиферативным резервом органов и тканей (Терских и др. 2003).

Стволовые клетки или клетки-предшественники взрослого организма получают из любой ткани организма после рождения (в том числе костного мозга, крови и пуповины) и отличаются от эмбриональных стволовых клеток тем, что они имеют более ограниченный

пролиферативный и дифференцировочный потенциал и не способны к образованию сложных тканей *in vitro*, однако обладают рядом достоинств:

- имеются в достаточном количестве;
- относительно высокая потентность;
- хорошо исследованы, накоплен некоторый опыт клинического применения;
- не вызывают отторжения;
- не вызывают вопросов этического характера.

Органные стволовые или клетки-предшественники являются источниками аутологичных клеток, которые могут быть использованы для органогенеза *in vitro*. В области регенеративной медицины эти клетки, как правило, получают из биопсийного материала целого ряда тканей, включая костный мозг (Petersen B.E. et al., 1999; Grompe M., 2005; Sawada R. et al., 2007; Peppo G.M., et al., 2010; Chanda D. et al., 2010; Caimi P.F. et al., 2010), сердце (Parmacek M.S., 2006; Ott H.C. et al., 2007), периферическую кровь, печень (Alison M.R., 2005.), легкие (Krause D.S., 2008., Jezierska-Wozniak K. et al., 2010), скелетные мышцы (Li Y. et al., 2010.), поджелудочную железу (Bonner-Weir S. 2002), жировую ткань (Jezierska-Wozniak K. et al., 2010; Quirici N. et al., 2010; Obokata H. et al., 2011), надкостницу (Ringe J. et al., 2008.) и эмбриональные стволовые клетки (Grompe M., 2005; Evseenko D. et al., 2010).

В области тканевой инженерии красный костный мозг используется, прежде всего, в качестве источника мультипотентных стромальных клеток (Weissman I. L., 2000; Sawada R. et al., 2007), которые являются мезодермальными по происхождению и могут послужить источником для большинства мезодермальных тканей, в том числе костной (Petersen B.E. et al., 1999; Chanda D. et al., 2010), мышечной (Caimi P.F. et al., 2010), в качестве источника эндотелиальных предшественников зрелых

эндотелиальных клеток, клеток гладкой мышечной ткани для создания тканеинженерных сосудов.

В работе Бухаровой Т.В. и соавт (2014) показана эффективность применения тканеинженерной конструкции для восстановления костной ткани, полученной на основе мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток жировой ткани, преддифференцированных в остеогенном направлении, полилактидных носителей, полученных методом поверхностно-селективного лазерного спекания, и тромбоцитарного геля, на модели гетеротопического остеогенеза у крыс.

Аскарлов М.Б. и соавт (2009) предложили использовать мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки для регенерационной терапии после предварительного культивирования их *in vitro* с целью восстановления исходного уровня биорегуляторной активности, изучили влияние культивированных данных клеток для целей стимуляции регенерации и заживления длительно незаживающих аутоиммунных язв желудка

Álvarez D. и соавт (2015) приводят данные об использовании мультипотентных мезенхимальных клеток для лечения идиопатического фиброза легких. Модели на животных показали, успех клеточной терапии в смягчении последствий блеомицин-индуцированного легочного фиброза, было продемонстрировано, что максимальный положительный эффект мультипотентных мезенхимальных клеток наблюдается во время ранней воспалительной фазы заболевания.

Ryan W. Bonvillain и соавт. (2012) использовали мультипотентных мезенхимальных клеток для рецеллюляризации ацеллюлярного матрикса легкого нечеловекообразного примата. Клетки адгезировали к матриксу, обладали пролиферативной активностью и были жизнеспособны на полученном каркасе, что доказало возможность их использования для заселения децеллюляризованных матриксов.

Байкова Ю.П. и соавт. (2011) изучали хоминг и направление дифференцировки трансплантированных моноклеарных клеток красного КМ при неселективном интракоронарном введении через 30 сут после острого инфаркта миокарда у крыс. Моноклеарные клетки мигрировали в область рубца, где дифференцировались в фибробласты и миофибробласты. Моноклеарные клетки не дифференцировались в кардиомиоциты, в эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки средней стенки кровеносных сосудов. При этом наблюдались стимуляция ангиогенеза и репарация миокарда.

Кардиомиогенная дифференцировка стволовых клеток костного мозга достигается путем культивирования клеток *in vitro* в культуральной среде с добавлением ретиноевой кислоты, диметилсульфоксида, и 5-азациитидина (Heng B. C. et al., 2004). Пересаженные стволовые клетки костного мозга могут интегрироваться в ткани с последующим формированием эндотелия (Reyes M. et al., 2001; Shi Q. et al., 1998), скелетной и сердечной мышцы (Bittner R. E. et al., 1999).

Применение гематopoэтических стволовых клеток на животной модели инфаркта миокарда показало, что данный вид клеток может интегрировать в поврежденную область, занимая до 68% ее площади. Трансплантированные гематopoэтические стволовые клетки экспрессируют на поверхности своих мембран маркер коннексина-43, что указывает на образование щелевых контактов в миокарде, которые не обнаруживаются в случае применения скелетных миобластов (Orlic D. et al., 2001).

Эндотелиальные стволовые клетки-предшественники успешно применялись для реваскуляризации в очаге инфаркта миокарда (Assmus B. et al., 2002; Losordo D. W., 2004). Тем не менее, их будущее терапевтическое применение может быть ограничено потому что количество вновь образованных кровеносных сосудов не всегда является

достаточным для адекватной реваскуляризации (Hill J. M. et al., 2003; Vasa M. et al., 2001).

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки становятся весьма желательным клеточным ресурсом для регенерации миокарда благодаря их способности дифференцироваться в кардиомиоциты как клетки в естественных условиях так и *in vitro* (Makino S. et al., 1999; Toma C. et al., 2002). Кроме того, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки обладают местными иммуносупрессивными свойствами, обеспечивающими возможность их аллогенного применения (Wang J. S. et al., 2000; Mangi A. A. et al., 2003).

Проведенные исследования показали, что введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в зону инфаркта миокарда приводило к улучшению сердечной функции в результате трансдифференцировки клеток в кардиомиоциты и эндотелиоциты. Исследования на животных показали, что 4 недели после введения в миокард мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки экспрессировали маркеры кардиомиоцитарной дифференцировки и соединялись с зоной нативного миокарда посредством интеркалированных дисков (Toma C. et al., 2002; Gojo S. et al., 2003; Davani S. et al., 2003; Pittenger M. F., et al., 2005; Murry C. E., et al., 2005; Balsam L., et al., 2005).

В работе Shim S.N. и соавт. (2004) показано, что мезенхимальных стволовые клетки способны к дифференцировке в кардиомиоцитоподобные клетки в дифференцировочной среде, содержащей инсулин, дексаметазон, и аскорбиновую кислоту, без добавления 5-азациитидина и совместного культивирования с нативными кардиомиоцитами. Дифференцировку определяли путем выявления экспрессии кардиомиоцито-специфических белков. Полученные кардиомиоцитоподобные клетки имели многочисленные структурные и

сократительные белки, свойственные кардиомиоцитам (сердечный тропонин I, тропомиозин и др.).

1.5 Современные подходы к созданию тканеинженерного сердца

Известны различные подходы для получения кардиомиоцитов, организованных в функционирующую структуру (Ng S. L. J. et al., 2011). Для клинического использования подобная структура должна иметь морфологические и функциональные характеристики аналогичные таковым в нативном сердце и оставаться жизнеспособной после имплантации в миокард. Одна из основных проблем, выявленных в ходе экспериментов *in vitro*, состояла в высокой потребности клеток в кислороде, диффузия которого к кардиомиоцитам ограничивается толщиной жизнеспособной тканеинженерной конструкции равной 200 мкм (Radisic M. et al., 2006). Для обеспечения достаточной подачи кислорода, биореакторы, доставляющие культуральную среду к кардиомиоцитам, использовались в сочетании с тонкими полимерными каркасами (Radisic M. et al., 2006; Radisic M. et al., 2007). Перфузионные биореакторы второго поколения представляли собой комплексную систему, оборудовались приборами для электрической (Barash Y. et al., 2010) или механической (Brown M.A. et al., 2008) стимуляции.

Инновационный подход Eschenhagen и Циммерман в инженерии сердечной ткани заключался в посеве на сочетание коллагена I и белков внеклеточного матрикса (Matrigel) и неонатальных крысиных кардиомиоцитов в решетчатые или круговые формы. В итоге после спонтанного ремоделирования данной смеси и циклической механической стимуляции, была получена тканеинженерная сердечная ткань способная к спонтанному и синхронному сокращению (Zimmermann W.H. et al., 2006).

Использование тканеспецифичных каркасов для создания тканеинженерных конструкций является наиболее предпочтительным

(Ozeki M. et al. 2006; Sellaro T.L. et al. 2007; Ott. et al. 2008; Macchiarini P. et al. 2008; Montoya C.V. et al. 2009; Omae H. et al. 2009).

Н.С. Ott и соавт. (2008) опубликовали перфузионный метод децеллюляризации сердца. Результаты иммуногистохимического исследования показали, что в децеллюляризованном матриксе сердца были сохранены коллагены I и III типов, ламинин и фибронектин. В ходе децеллюляризации образовалась сжатая конструкция, не содержащая клеток, но сохранившая состав и ориентацию волокон внеклеточного матрикса сердца, в ней также обнаруживались базальные мембраны коронарных сосудов, не содержащие гладкомышечных и эндотелиальных клеток. Н.С. Ott и соавт. использовали неонатальные кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, фиброциты и гладкомышечные клетки, получив при постоянной физиологической нагрузке и электрической стимуляции работающую сердечную конструкцию, эквивалентную по функции примерно 2% взрослого сердца или 25% 16-недельного плода. (Ott H.C. et al., 2008).

J.M. Wainwright и соавт. (2010) использовали метод ретроградной перфузии аорты для децеллюляризации сердца свиньи и описали, что природный биологический каркас сохраняет свою сложную структуру, белковый состав и механическую целостность. J.M. Wainwright и соавт. (2010) использовали куриные эмбриональные кардиомиоциты для проведения рецеллюляризации каркаса сердца свиньи (Wainwright J.M. et al., 2010).

S. Higuchi и соавт. (2012) изучили эффект воздействия внеклеточного матрикса сердца на кардиальную дифференцировку мышечных эмбриональных стволовых клеток и показали его основополагающую роль в этом процессе. Был изучен качественный состав внеклеточного матрикса сердца и печени при помощи количественного белкового анализа. В дальнейшем оба децеллюляризованных матрикса засеивались

эмбриональными стволовыми клетками. Уже в течение двух недель в клетках, засеянных на сердечный внеклеточный матрикс, была обнаружена экспрессия тяжелых цепей миозина и тропонина I – сердечных сократительных белков в отличие от клеток, засеянных на печеночный внеклеточный матрикс.

Tung-Ying Lu и соавт. (2013) создали сердечную конструкцию путем засеивания децеллюляризированного сердца мыши индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками человека. Было показано, что мультипотентные сердечные прогениторные клетки способны мигрировать, пролиферировать и дифференцироваться *in situ* в кардиомиоциты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки. После 20 дней культивирования клеток на каркасе были выявлены спонтанные сокращения, генерация механического усилия и ответа на лекарственные воздействия. Более того, было установлено, что сердечный внеклеточный матрикс способствует пролиферации кардиомиоцитов, их дифференцировке и формированию миофиламентов в засеянных на него человеческих мультипотентных кардиоваскулярных клеток-предшественников.

Эти исследования наглядно продемонстрировали важность физических раздражителей в улучшении морфологических, функциональных и механических свойств тканеинженерной сердечной ткани.

Резюме

Анализ современной научной литературы показал, что для лечения терминальной стадии хронической сердечной недостаточности одной из основных методик является трансплантация сердца. Однако, органная трансплантация, достоинством которой является отработанность методики и ее широкое внедрение в клиническую практику, имеет ряд недостатков,

таких как: острая нехватка донорских органов, сложность доставки органов, сложность и экстренный характер подобных операций, развитие реакций отторжения, болезни «трансплантат против хозяина», возможность развития инфекционных осложнений, а также необходимость приема пожизненной иммуносупрессивной терапии. Выход из сложившейся ситуации представляется в создании искусственного сердца методами тканевой инженерии.

Тканевая инженерия – молодая отрасль медицинских наук, разрабатывающая проблему создания биоинженерных органов. На сегодняшний день одна из стратегий тканевой инженерии такова: 1) отбор и культивирование собственных или донорских стволовых клеток; 2) разработка специального носителя для клеток (матрицы) на основе биосовместимых материалов; 3) нанесение культуры клеток на матрицу и размножение клеток в биореакторе со специальными условиями культивирования; 4) непосредственное внедрение тканеинженерной конструкции в область пораженного органа или предварительное размещение в области, хорошо снабжаемой кровью, для созревания и формирования микроциркуляции внутри конструкции (префабрикация).

Для создания подходящего каркаса биоинженерного сердца требуются: воссоздание структуры, сходной с нативной, с развитой сосудистой сетью, способной обеспечить адекватную перфузию тканей; способность клеток, используемых при рецеллюляризации каркаса дифференцироваться во все паренхиматозные и сосудистые структуры органа; наличие возможности управления микроокружением клеток для воздействия на их физиологию и функции; а также – возможность управления дифференцировкой и созреванием клеток *in vitro*.

В современной научной литературе не достаточно исследованы морфологические свойства децеллюляризованных сердечных матриксов, механизмы их взаимодействия со стволовыми клетками. Всесторонняя

морфологическая оценка получаемых биоинженерных конструкций позволит расширить наши знания о составе, строении децеллюляризированных матриц, механизмах взаимодействия стволовых клеток и тканеинженерных каркасов, дифференцировки стволовых клеток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты проводили после одобрения протокола исследования локальными этическими комитетами (Кубанского государственного медицинского университет, Россия; Каролинского института, Швеция) на оборудовании Ведущего центра трансляционной регенеративной медицины (ACTREM) Каролинского Института (Швеция), в лаборатории международного научно-исследовательского клинико-образовательного центра регенеративной медицины и на кафедре патологической анатомии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России. В работе использовали 60 взрослых крыс-самцов линии Lewis весом 180 ± 16 г. Децеллюляризация была отработана на 20 сердцах, для экспериментов по рецеллюляризации использовали сердца 20 крыс. 20 крыс составили группу нативного контроля. Животных выводили из эксперимента соблюдая правила проведения работ с использованием экспериментальных животных в соответствии с «Принципами ухода за лабораторными животными» (Рекомендации Национального общества по медицинским исследованиям, 2001, США; Руководство по уходу и использованию лабораторных животных, National Academy Press, пересмотр 1996 г., США).

2.1 Морфологический анализ

Полученные образцы децеллюляризованных, нативных и рецеллюляризованных сердец фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, дегидратировали и заключали в парафин автоматическим методом при помощи гистопроцессора Leica TP1020 (Германия) по стандартной методике. Далее осуществляли заливку образцов в парафин с получением парафиновых блоков на модульной установке Leica EG1150H (Германия).

Парафиновые срезы толщиной 5 мкм получали при помощи ротационного микротомы Leica RM2235 (Германия) и наносили на стекла с адгезивным покрытием (поли-L-лизин).

Для общегистологической оценки препараты депарафинизировали и гидратировали. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизон. Изучение микропрепаратов проводили на микроскопе Olympus IX51 (Япония).

Для оценки структуры децеллюляризованных и рецеллюляризованных сердечных матриксов применяли метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы ткани фиксировали в 2,5% растворе глутеральдегида (Merk, Германия) в 0,1 М какодилатном буфере (Prolabo, Франция) в течение 2 часов. После промывания образцы были обезвожены в спиртах возрастающей концентрации, высушены в течение ночи в термостате при 37°C и подвергнуты напылению золотом. Исследование проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM6490, JEOL (Япония)

2.2 Иммуногистохимический анализ.

Иммуногистохимический анализ проводили для изучения качественного состава образцов по следующей методике:

1. срезы депарафинизировали и гидратировали по стандартной методике.
2. блокировали эндогенную пероксидазную активность 3% раствором пероксида водорода.
3. демаскировали антигены в растворе Access Rodent (Menarino diagnostics, Италия) на водяной бане в течение 40 минут.
4. блокировали неспецифическое связывание антител раствором Rat Background Block (Menarino diagnostics, Италия) в течение 30 минут.

5. инкубировали с первичными антителами в течение 16 часов при температуре 4°C.

6. промывали раствором фосфатного буфера.

Для антител, указанных в таблице 2.1 была выбрана система детекции ABC, которая включала в себя следующие этапы:

1. инкубация с биотинилированными козьими антителами антиполивалентными в течение 10 минут при комнатной температуре.

2. четырехкратная отмычка фосфатным буферным раствором.

3. инкубация со стрептавидин пероксидазой в течение 10 минут при комнатной температуре.

4. четырехкратная отмычка фосфатным буферным раствором.

5. инкубация с DAB хромогеном в течение 3-5 минут.

6. четырехкратная отмычка фосфатным буферным раствором.

7. докрашивание срезов гематоксилином Майера в течение 1 минуты.

8. дегидратация срезов и заключение в монтирующую среду Consul-Mount (Thermo Fisher Scientific).

Таблица 2.1

Антитело	Разведение	Производитель
anti-Collagen I antibody	1:100	ab34710 Abcam, Англия
anti-Collagen IV antibody	1:100	ab6586 Abcam, Англия
anti-Fibronectin antibody	1:100	ab6328 Abcam, Англия
anti-Laminin antibody	1:100	ab11575 Abcam, Англия
anti-Tropomyosin 1(alpha) antibody	1:200	ab133292 Abcam, Англия
anti-Elastin antibody	1:50	ab21610 Abcam, Англия

Для антител указанных в таблице 2.2 была выбрана система детекции с флуоресцентными вторичными антителами, которая включала в себя следующие этапы:

1. добавление вторичного антитела Goat polyclonal Secondary Antybody to Mouse IgG-H&L (Alexa Fluor® 555), preadsorbed (ab 150118, Abcam, Англия)/ Goat polyclonal Secondary Antybody to Rabbit IgG-H&L (Alexa Fluor® 488), preadsorbed (ab 150081, Abcam, Англия) в концентрации 1:500.

2. четырехкратная отмывка фосфатным буферным раствором.

3. докрашивание срезов флуорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI (Sigma-Aldrich, USA).

Таблица 2.2

Антитело	Разведение	Производитель
anti-Desmin antibody	1:200	ab15200 Abcam, Англия
anti-Actin antibody	1:200	ab3280 Abcam, Англия
anti-VEGF antibody	1:100	ab46154 Abcam, Англия
anti-Ki67 antibody	1:100	ab16667 Abcam, Англия
anti Connexin 43	1:1000	ab11370 Abcam, Англия

Для антител указанных в таблице № 2.3 производили только сокращивание срезов флуорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI (Sigma-Aldrich, USA).

Таблица 2.3

Антитело	Разведение	Производитель
anti-Von Willebrand factor antibody (FITC)	1:100	ab46154 Abcam, Англия
anti-MHC Class I antibody(FITC)	1:20	ab22367 Abcam, Англия

Для количественного анализа результатов иммуногистохимического окрашивания был применен метод оценки площади позитивно окрашенных участков исследуемых образцов в узкой спектральной области с оптической плотностью выше пороговой. Было получено по 5

срезов, окрашенных для выявления специфического антигена, для децеллюляризированного и нативного органа соответственно. Срезы фотографировали с помощью микроскопа Olympus IX51 (Япония) и сохраняли в виде отдельных файлов изображений в формате tiff, который обеспечивал сжатие без потери информации. Далее с помощью открытого программного обеспечения — Rawtherapee [RawTherapee Features][□], производили нормализацию изображений по экспозиции и балансу белого. Все изображения имели одинаковое разрешение и степень увеличения (x200).

Так как образцы были докрашены гематоксилином Майера, на первом этапе была произведена предварительная обработка изображений с математической сегментацией исходного образца на два независимо окрашенных среза (гематоксин Майера + DAP хромоген). В основе данной методики лежит принцип цветовой деконволюции (Ruifrok A.C. et al., 2001). Данный метод основан на физических свойствах красителей, в частности их свойство вносить определенный вклад в итоговые цветовые координаты пикселя в пространстве RGB (Tkalcic M., et al., 2003), вследствие специфического для каждого из них спектра поглощения. Интенсивность отраженного света I_λ на длине волны λ описывается формулой: $I_\lambda = c_1\beta_\lambda^1 + c_2\beta_\lambda^2$, где c_i — концентрация красителя, а β^λ — коэффициент пропорциональности для соответствующей длины волны, зависящий от физических свойств красителя. В качестве модели формирования цветовых координат была взята система из I_R , I_G , I_B для красного, зеленого и синего каналов соответственно. Для определения вклада конкретного вещества в цветовые координаты выбранного пикселя необходимо получить его коэффициенты пропорциональности — β^λ . Чистые векторы красителей были получены из моноокрашенных позитивных и негативных контролей, сделанных в тех же условиях одинаковой экспозиции и баланса белого. После определения параметров

поглощения для DAP хромогена и гематоксилина, был написан скрипт для пакетной сегментации изображений для открытого программного обеспечения ImageJ (Abramoff, et al., 2004) с использованием плагина для цветовой деконволюции на основе алгоритма A.C. Ruifrok и соавт. в модификации G. Landini (Landini G., et al., 2003).

В результате пакетной обработки образцов была получена серия изображений, представляющих собой карту интенсивности распределения DAP хромогена. Для оценки был выбран метод оценки площади структур с интенсивностью окрашивания выше пороговой.

Для пакетного анализа изображений мы выбрали программное обеспечение с открытым исходным кодом — CellProfiler (Lamprecht M.R., et al., 2007). Основной принцип его работы заключается в написании алгоритмов обработки изображения для решения конкретной задачи. Серия последовательных преобразований исходного изображения и его статистического анализа формирует так называемый pipeline — конвейер, задачей которого был подсчет площади структур с надпороговой оптической плотностью для цветового тона, характерного для использованной системы детекции (DAP хромогена, Alexa Fluor® 488). Сущность алгоритма заключалась в следующем:

1. Полученная в результате цветовой деконволюции сегментированная карта распределения DAP хромогена преобразовывалась в черно-белое 8-битное изображение, где 0 — минимальное значение интенсивности окраски, а 256 — максимальное.
2. Далее был определен оптимальный порог, при котором ниже его оказывалось значение тех пикселей, относящихся к структурам с отрицательной реакцией антиген-антитело. Согласно данному порогу, изображение преобразовывалось в 2-битное, где 0 — отрицательная реакция, а 1 — положительная.

3. Вычислялась площадь положительных пикселей, их общее количество и их отношение.

Данный конвейерный алгоритм применяли для всей серии изображений, результаты каждого измерения заносили в отдельный файл электронной таблицы для последующего анализа и интерпретации. Был вычислен коэффициент пропорциональности $\text{мкм}^2/\text{пиксель}$, который составил 0.03. Это позволило вычислить площади структур с привязкой к абсолютным значениям.

Аналогично проводился графический анализ для иммунофлюоресцентной микроскопии. Отличия состояли в методе выделения красителя. Так как флюоресцентный метод изначально предполагает использование цветных светофильтров, то в случае использования зеленого флюорохрома Alexa Fluor® 488 для получения карты распределения красителя было достаточно разложить изображение на RGB каналы (красный, зеленый и синий соответственно) и использовать для дальнейших преобразований только зеленый. Предварительная сегментация методом цветовой деконволюции не требовалась. Последующие преобразования карты распределения флюорохрома и анализ полученных данных аналогичны описанной выше методике.

2.3 Количественное определение содержания ДНК.

Для количественной оценки содержания ДНК в нативных и децеллюляризированных органах на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) были использованы стандартные наборы реактивов (DneasyBlood and Tissue Kit, Qiagen, Sweden) по стандартным протоколам:

В стерильных условиях в микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф помещались образцы ткани из одних и тех же участков, массой не более 25 мг, которые предварительно были пропитаны в 30% этаноле в

течение 10 с. Затем последовательно добавляли 180 мкл лизирующего ALТ буфера и 20 мкл протеиназы К. Далее после перемешивания на вортекс-миксере в течение 15 с пробирки с образцами были помещены в термостат при +57°C на ночь. Для обеспечения полного лизиса тканей перемешивание на вортекс-миксере повторялось несколько раз. Затем по очереди были добавлены 200 мкл AL буфера и 200 мкл 100% этанола. Полученный раствор был перемешан на мини-вортексе в течение 15 с, далее микроцентрифужные пробирки с образцами центрифугировали в течение 1 мин при 8000 rpm. Далее последовательно добавляли 500 мкл AW1 буфера, центрифугировали в течение 1 мин при 8000 rpm, далее 500 мкл AW2 буфера и центрифугировали в течение 3 мин при 14000 rpm. В заключении добавляли 200 мкл AE буфера и центрифугировали в течение 1 мин при 8000 rpm, эту процедуру повторяли дважды. Исследование материала осуществлялось на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

2.4 Исследование проходимости для растворов сосудистого русла

Исследование проходимости для растворов сосудистого русла проводили следующим образом:

1. децеллюляризированное сердце крысы канюлировали и подвешивали в биореакторе;
2. в аорту путем ретроградной перфузии нагнетали 0,4% раствор трипанового синего (Gibco, Англия);
3. с равными интервалами времени орган фотографировали.

2.5 Оценка механических свойств децеллюляризированного каркаса сердца крысы.

Для проведения механических испытаний из левого желудочка и перегородки сердца децеллюляризированных и нативных сердец получали

фрагменты размером $8 \pm 1 \times 20 \pm 2$ мм, ориентированные поперечно относительно продольной оси сердца (рис.2.1 А).

Сравнительные биомеханические тесты образцов проводили на универсальных испытательных машинах фирмы Инстрон модель 5965 (датчик 50 Н) и на Lloyd LRX (100 N load cell).

Условия испытаний:

Одноосное растяжение с постоянной скоростью движения зажимов. Скорость 1 и 10 мм/мин, расстояние между зажимами 10 мм. Испытания проводили на воздухе. По результатам испытаний были определены предельная прочность, деформация при предельной прочности и модуль Юнга. Статистическая выборка при скорости 1 мм/мин по 5 образцам, при скорости 10 мм/мин по 3 образцам. Все испытания проводили при температуре 23°C, до момента испытания образцы хранили в среде фосфатного буфера при 4°C, перед испытанием кондиционировали в среде фосфатного буфера 5 часов при температуре 23°C (рис.2.1 Б).



А



Б

Рис. 2.1 Механические испытания сердца крысы. Образец децеллюляризированного сердца до (А) и во время (Б) процедуры.

2.6 Выделение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Материалом для выделения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) служил красный костный мозг крыс. GFP позитивные ММСК 5 пассажа были получены, типированы и трансфецированы в лаборатории Ведущего центра трансляционной регенеративной медицины (ACTREM) Каролинского Института (Швеция) по стандартным протоколам (Gustafsson Y. et al., 2012; Jungebluth P. et al., 2013) и предоставлены для проведения дальнейших экспериментов по рецеллюляризации ацеллюлярного сердечного матрикса.

2.7 Статичная рецеллюляризация образцов.

Статичную рецеллюляризацию образцов выполняли для проведения МТТ-теста, антиоксидантного теста. Из децеллюляризованного матрикса сердца в стерильных условиях получали образцы диаметром 6 миллиметров, которые далее были стерилизованы 10% раствором этанола в течение 15 минут и дважды отмыты раствором PBS +/- (Gibco, Англия) с антибиотиком-антимикотиком по 15 минут. Рецеллюляризацию полученных образцов ММСК производили в 96-луночном планшете путем помещения клеток в количестве 20000 на каркас при помощи пипеттора.

2.8 Оценка жизнеспособности стволовых клеток на децеллюляризованном каркасе сердца

Колориметрический анализ с 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолом (МТТ)-тест (Cell Proliferation Kit I, Roche, Австралия) был использован для определения жизнеспособности клеток, заселенных на децеллюляризованный каркас сердца крысы.

После 50 ч инкубации ММСК в случае статичной рецеллюляризации на каркасе сердца (n=5) или после 1 недели (168 ч) рецеллюляризации в биореакторе (n=5; в последнем случае образцы также нарезали на кусочки диаметром 6 мм и переносили в 96-луночный планшет) каждую лунку

планшета добавляли по 50 мкл субстрата МТТ и инкубировали в течение 4 ч при 37°C, затем по 500 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия (SDS) в 0,01М HCl и инкубировали в течение ночи при 37°C. Образцы переносили в другой 96-луночный планшет и производили колориметрический анализ с помощью спектрофотометра (SpectraMax 250, Molecular Devices, США).

Для оценки содержания антиоксидантов в исследуемых децеллюляризированных, рецеллюляризированных и нативных образцах (n=5) был использован антиоксидантный тест ABEL[®] с фолазином (Pholasin[®]) и пероксинитритом (Microplate Test Kit ABEL-41M2, Knight Scientific Ltd, Англия).

Для выполнения теста в каждую лунку 96-луночного планшета добавили по 100 мкл буфера для анализа (контроль) или 95 мкл аналитического буфера + 5 мкл образца, затем еще по 50 мкл Pholasin[®]. Также мы включили в эксперимент различные концентрации стандартного раствора витамина Е в качестве позитивного контроля. Непосредственно перед началом эксперимента в каждую лунку вводили по 50 мкл 2 мг/л Sin-1 (3-морфолин-сидномин HCl, C₆H₁₀N₄O₂·HCL). Для измерения возникающей флюоресценции использовали Fluostar OPTIMA (BMGLABTECH, Германия).

Дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток на рецеллюляризированном каркасе после культивирования ММСК в 96-луночном планшете на каркасе сердца (n=5) производилось с использованием набора LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США):

1. 1 мкл кальцеина АМ и 2,5 мкл гомодимера этидия растворяли в 1 мл фосфатного буфера.

2. в полученный раствор помещали рецеллюляризированные образцы сердца крысы и инкубировали в течение 20 минут в темном месте при комнатной температуре.

3. образцы отмывали фосфатным буфером в течение 30 секунд.

4. результаты оценивались на флуоресцентном микроскопе Olympus IX51 (Япония).

2.9 Выявление локализации жизнеспособных клеток в рецеллюляризированном сердце

Для выявления локализации жизнеспособных клеток в рецеллюляризированном сердце был применен метод оценки *in vivo* биолюминесценции клеток с использованием IVIS spectrum Imaging System (Perkin-Elmer, США).

По окончании рецеллюляризации в аорту было введено 0,5 мл D-люциферина в концентрации 9 мг/мл в стерильном фосфатном буфере. Изображения получали каждые 30 секунд. Анализ был проведен с использованием Living Image Software (Perkin-Elmer, США).

2.10 Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Полученные результаты выражали в виде средних значений (M) и ошибки среднего (m). При сравнении средних значений изучаемых групп процент возможной ошибки находили по таблице t -критерия Стьюдента для парных сравнений, выражаемый в виде значений достоверности различия – « p », где $p < 0,05$ считалось статистически достоверным. В случае наличия выборок, неодинаковых по количеству компонентов, но предполагающих наличие Гауссовского распределения, был использован параметрический критерий Стьюдента для непарного t -теста. Анализ выборок производили с использованием программы GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, США).

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО И РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО КАРКАСА СЕРДЦА КРЫСЫ

Анализ современной научной литературы показал, что, несмотря на развитие и успехи трансплантологии, назрела необходимость создания *in vitro* искусственных органов, которые смогли бы стать альтернативой донорским органам. Для лечения терминальной стадии хронической сердечной недостаточности можно было бы использовать тканеинженерное сердце в качестве трансплантата, что позволило бы избежать назначения иммуносупрессивной терапии и существенно ускорить время ожидания донорского сердца.

Разработка методик создания подобных органов – довольно длительный процесс, требующий всестороннего изучения и выборов способов получения тканеинженерных каркасов, их морфологических, механических свойств, возможности их последующей рецеллюляризации и влияния, которое данные матриксы будут оказывать на стволовые клетки. Каркас тканеинженерного органа не должен вызывать иммунного отторжения при трансплантации, а также обладать токсичностью по отношению к заселенным на него клеткам и организму-реципиенту.

Один из наиболее разработанных способов получения каркасов для тканеинженерных органов – децеллюляризация, то есть удаление клеток из нативных органов, в результате чего получают близкие к нативным органам по составу и свойствам матриксы. Далее вновь образованные конструкции рецеллюляризируют аутологичными стволовыми клетками. Таким образом, получают тканеинженерные органы, состоящие, как и нативные, из стромы (донорской) и паренхимы, образованной из клеток самого пациента. В дальнейшем донорский децеллюляризированный каркас может подвергаться биodeградации, замещаясь вновь образованным стволовыми клетками внеклеточным матриксом.

В данной главе описано применение модифицированного протокола получения децеллюляризированных сердечных матриксов крыс, дана их морфологическая характеристика, описан состав и механические свойства, определено содержание ДНК, элементов антиоксидантной системы. Также дана оценка взаимодействия децеллюляризированного матрикса и заселенных на него мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток как при статичной рецеллюляризации кусочков каркаса культуральном планшете, так и при рецеллюляризации целого органа в биореакторе перфузионным методом, описана способность к адгезии, жизнеспособность, метаболическая активность, а также преимущественная локализация клеток на каркасе. Морфологические свойства клеток оценивали при помощи световой, флуоресцентной и электронной микроскопии. Потенцию к дифференцировке мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток определяли с применением иммуногистохимического анализа.

3.1 Разработка протокола децеллюляризации сердца крысы

Для проведения децеллюляризации сердца нами был выбран детергент-энзиматический метод, который позволяет наиболее полным образом удалять клетки из тканей, но в то же время щадящий по отношению к белкам волокон внеклеточного матрикса сердца.

Основным недостатками ранее применявшихся способов децеллюляризации сердца (Ott H.C. et al., 2008; Wainwright J.M., et al, 2010) являются значительная длительность проведения децеллюляризации (137 часов), создающая угрозу бактериальной контаминации каркаса, нарушения его в связи с длительностью воздействия детергентов и их высокой концентрацией, использование больших объемов дорогостоящих реагентов, а также необходимость длительного размораживания нативного

сердца после извлечения из морозильной камеры, повышающая риск бактериальной контаминации.

При создании авторского протокола децеллюляризации мы поставили перед собой следующие задачи: максимальное сохранение гистологической структуры внеклеточного матрикса сердца, обеспечение щадящего режима обработки биологического материала, снижение концентрации детергентов, времени экспозиции растворов и вероятности бактериальной контаминации получаемого каркаса, т.е. повышение качества получаемого биоинженерного материала и обеспечение контроля его качества.

Перед выделением органокомплекса сердце-легкие крысам вводили гепарин в дозе 100 ЕД для предотвращения образования тромбов коронарных сосудах, спустя 1 ч животным интраперитонеально вводили летальную дозу барбитуратов (150 мг/кг) и проводили диссекцию органов. После стернотомии выделяли органокомплекс сердце-легкие. Органокомплекс очищали от окружающей жировой ткани, отсекали переднюю и заднюю полые вены, устья полых вен лигировали, аорту канюлировали на расстоянии 2–2,5 см от сердца, плечеголовной ствол, левую общую сонную артерию, левую подключичную артерию лигировали, затем отсекали легкие, после чего механически удаляли сгустки крови из камер сердца и фиксировали его в биореакторе. Начинали децеллюляризацию путем перфузии сердца через аорту децеллюляризирующими растворами:

- 1) фосфатным буфером с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина в течение 1,5 часов
- 2) деионизированной водой – 1,5 часа
- 3) 4% водным раствором дезоксихолата натрия в комбинации с 0,002M Na₂-ЭДТА 3,5 часа

4) фосфатным буфером с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина в течение 1 часа

5) свиной панкреатической ДНКазой I (2000 ЕД растворили в 200 мл фосфатного буфера с кальцием и магнием – 2,5 часа

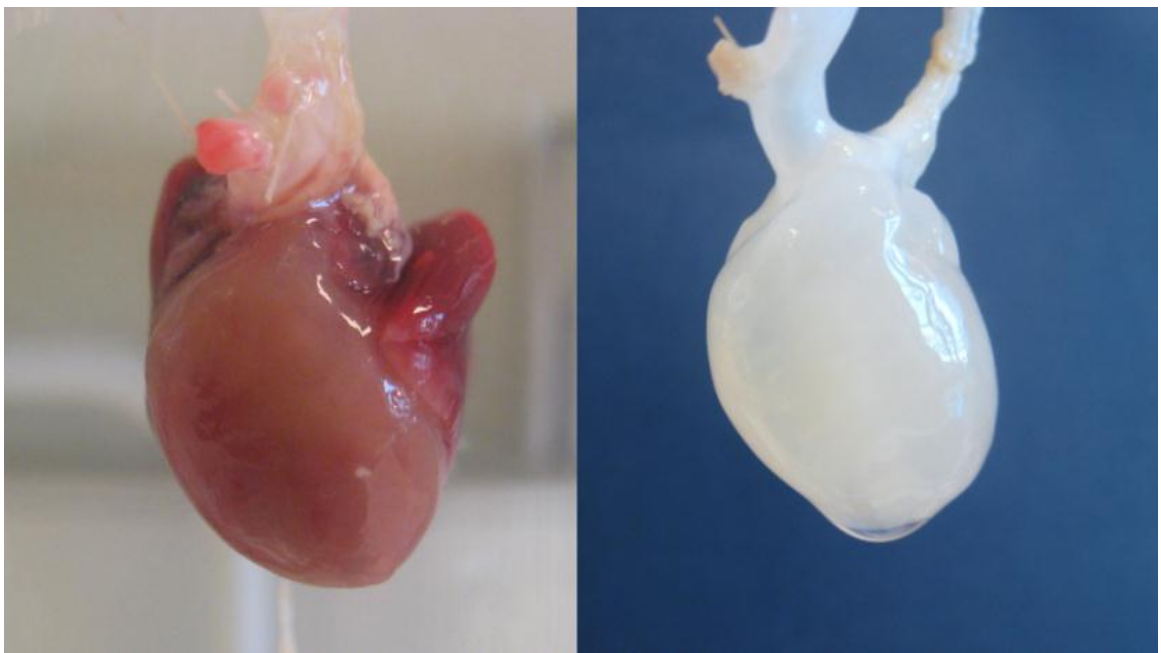
6) фосфатным буфером с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина в течение 18 часов со сменой раствора каждые 6 часов.

Методика ретроградной перфузии органа через аорту и коронарные артерии действующими веществами позволяла доставить их во все без исключения отделы органа. Скорость тока жидкости не устанавливали выше физиологических значений, чтобы не произошло разрыва сосудов или пролапса аортальных клапанов и, как следствие, это не препятствовало проведению полной децеллюляризации и последующей интравазальной рецеллюляризации. При проведении перфузии сердца не допускали попадания пузырьков воздуха в трубки с децеллюляризирующими растворами, которые могли бы обтурировать сосуды.

Нами было отмечено, что наилучшим образом децеллюляризация проходит при использовании органов, взятых накануне процедуры и предварительно помещенных в холодильник при +4°C. Возможно, это связано с полным прекращением всех процессов жизнедеятельности в клетках миокарда и, как следствие, уменьшением резистентности к децеллюляризирующим агентам. Также важным условием был предварительный массаж сердца перед процедурой децеллюляризации на этапе канюлирования. Он позволял механически удалить тромбы и сгустки крови из камер сердца и коронарных сосудов, что также ускоряло проведение децеллюляризации и помогало избежать наличия непродецеллюляризованных областей в сердце, в частности в его верхушке и перегородке.

В начале децеллюляризация происходила в правом желудочке, как в имеющем наименьшую толщину миокарда (как правило, в течение 1 часа

после начала перфузии раствором дезоксихолата натрия), затем в левом и, наконец, в верхушке и перегородке сердца, расположенных дистальнее всего по отношению к устью коронарных сосудов. В результате ткани после удаления клеток теряли характерный для нативного органа темно-красный цвет и становились прозрачными, приобретая молочно-белую окраску (рис. 3.1.1).



А

Б

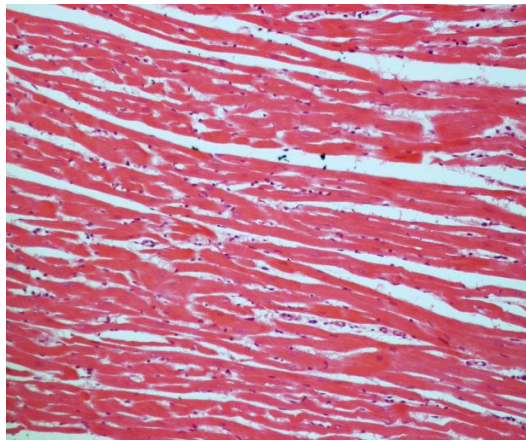
Рис 3.1.1 Сердце крысы (А) до и (Б) после децеллюляризации.

3.2 Свойства внеклеточного матрикса децеллюляризированного сердца крысы

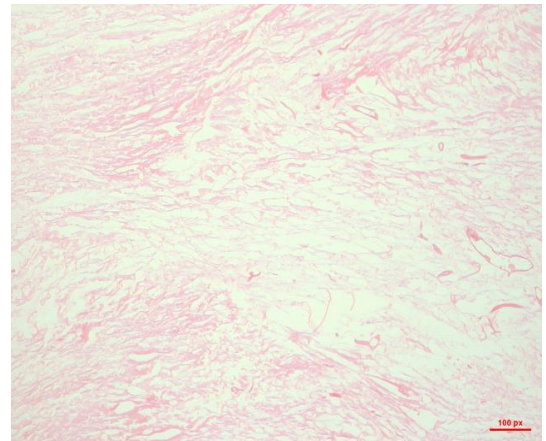
Окраска гематоксилином и эозином препаратов нативного сердца выявила продольно расположенные клетки поперечнополосатой сердечной мышечной ткани с периферически расположенными клеточными ядрами, межмышечную рыхлую соединительную ткань, многочисленные сосуды и капилляры (рис. 3.2.1. А, В).

В препаратах децеллюляризированных сердец интактные мышечные клетки и клеточные ядра не выявляли, однако визуализировали тончайшие, рыхло расположенные эозинофильные волокна внеклеточного матрикса сердца, которые в нативном органе окружают кардиомиоциты со всех сторон, формируя строму органа (рис. 3.2.1 Б, Г).

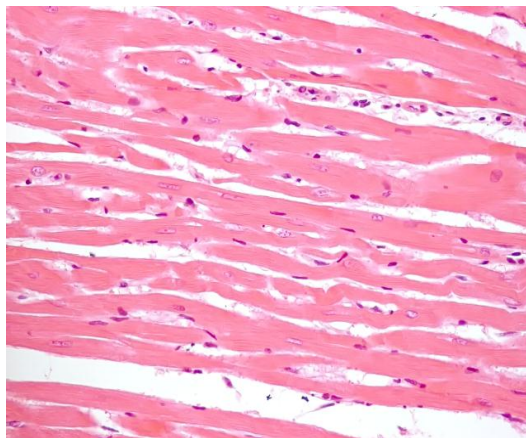
Окраска ядерного материала препаратов с помощью флуорофора DAPI подтвердила указанную тенденцию. В нативном сердце клеточные ядра активно флуоресцировали и были выявлены в большом количестве (рис. 3.2.2 А, В). В децеллюляризированных образцах обнаружили лишь незначительную аутофлуоресценцию волокон внеклеточного матрикса (рис. 3.2.2 Б, Г).



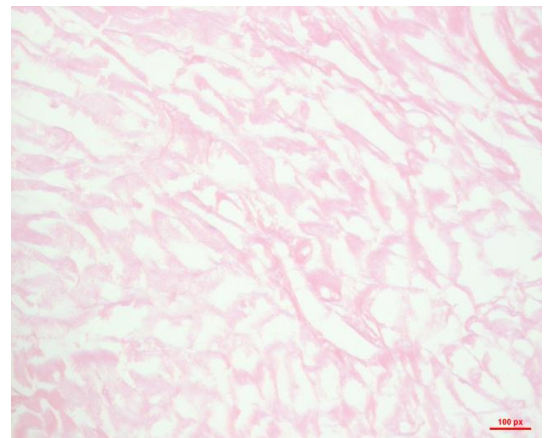
А



Б



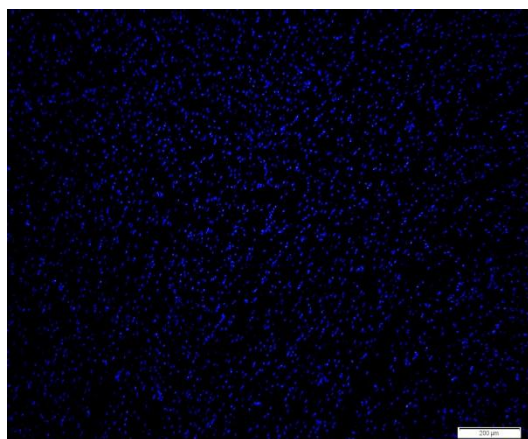
В



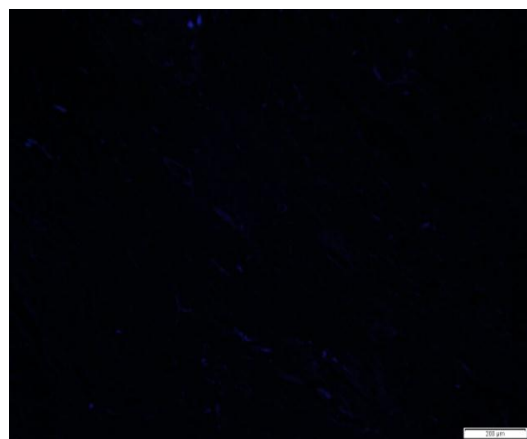
Г

Рис. 3.2.1 Нативное (А, В) и децеллюляризированное (Б, Г) сердце крысы.

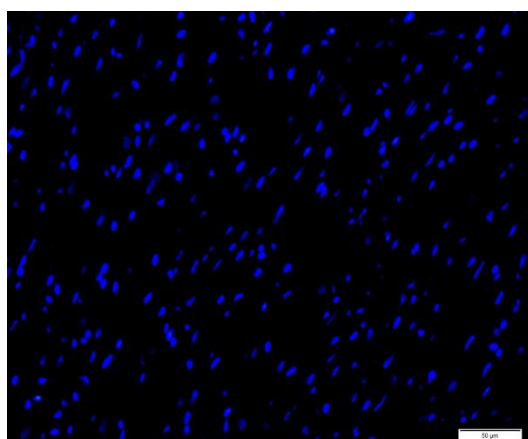
Гематоксилин и эозин. Увеличение: А, Б - об. x10, ок. x10; В, Г - об. x40, ок x10.



А



Б



В



Г

Рис. 3.2.2 Нативное (А, В) и децеллюляризированное (Б, Г) сердце крысы.
Флуоресценция DAPI. Увеличение: А, Б - об. x10, ок. x10; В, Г - об. x40, ок x10

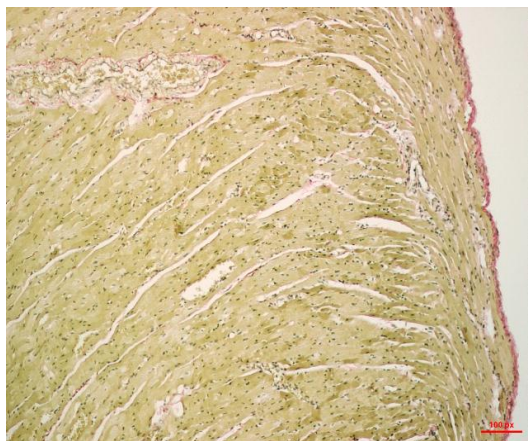
Окраска пикрофуксином по Ван Гизон, тропная к соединительнотканым волокнам в нативной ткани позволила подробнее визуализировать волокна внеклеточного матрикса, их гистоархитектонику и локализацию в миокарде. Основная часть волокон окружала несколько мышечных пучков одновременно, а также была расположена в области базальных мембран и адвентиции коронарных сосудов (рис. 3.2.3 А, В).

В децеллюляризированной ткани внеклеточный матрикс, состоящий преимущественно из коллагена, оставался неизмененным. Оставались сохраненными упорядоченная структура и преимущественно параллельное расположение коллагеновых волокон в матриксе. Отчетливо визуализировались неизмененные базальные мембраны сосудов, как мелкого, так и крупного калибра. Набухания либо иных патологических изменений структуры, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было (рис. 3.2.3 Б, Г).

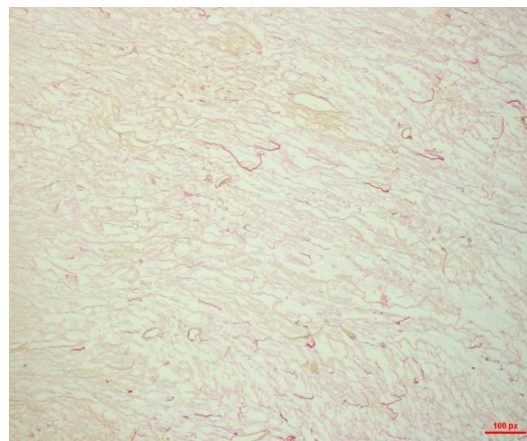
Оценка состояния внеклеточного матрикса нативного сердца крысы на ультраструктурном уровне, а также его сохранность после проведения децеллюляризации проводилась при помощи сканирующей электронной микроскопии, позволившей визуализировать на увеличении в 5000 раз мышечные клетки, на увеличении в 15000 раз – тончайшие волокна внеклеточного матрикса сердца их ход, структуру и диаметр.

В образцах нативных тканей при помощи сканирующей электронной микроскопии визуализировали структуру миокарда, отмечали наличие продольно ориентированных мышечных клеток и межклеточного вещества (рис 3.2.4. А, В).

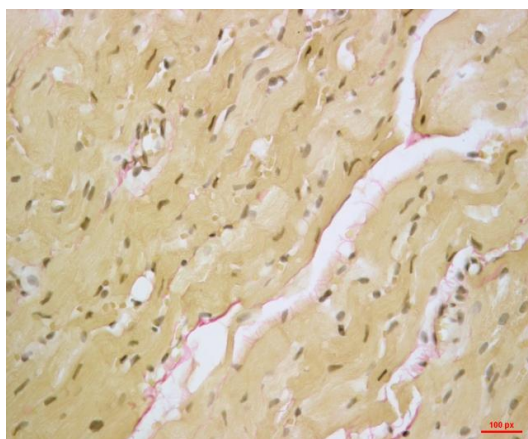
В децеллюляризированных органах при сохранности пористой структуры внеклеточного матрикса клетки не обнаруживали. Выявляли взаимопереплетенные, ветвящиеся сети волокон внеклеточного матрикса диаметром до 60 - 100 нм. Расстояние между отдельными волокнами достигало 300 - 400 нм (рис. 3.2.4 Б, Г).



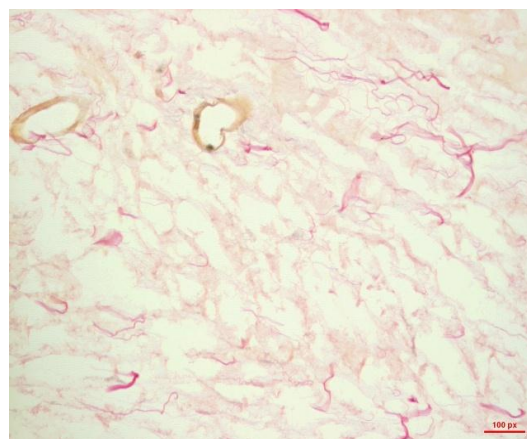
А



Б

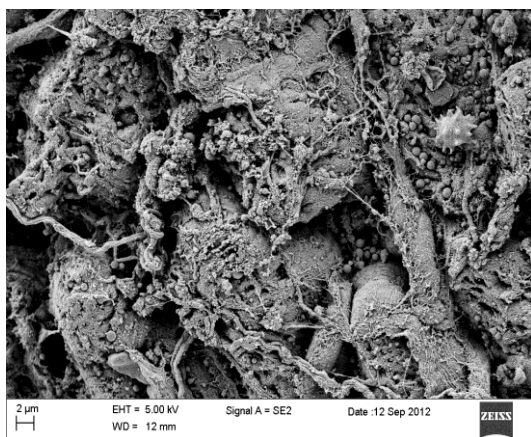


В

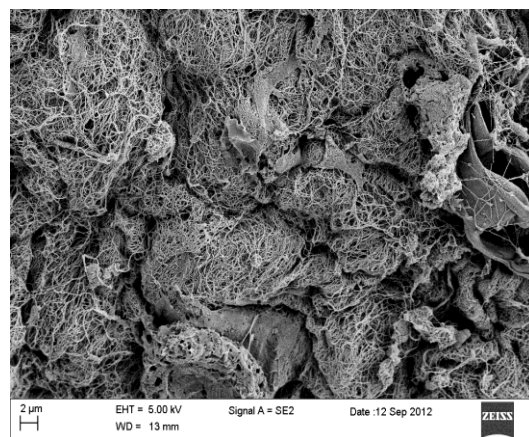


Г

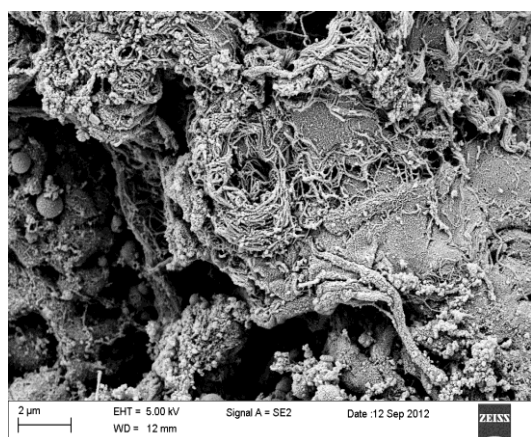
Рис. 3.2.3 Нативное (А, В) и децеллюляризированное (Б, Г) сердце крысы. Пикрофуксин по Ван Гизон. Увеличение: А, Б - об. x10, ок. x10; В, Г - об. x40, ок x10



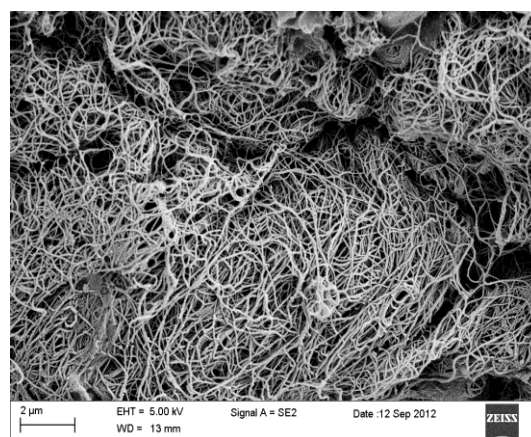
А



Б



В



Г

Рис. 3.2.4 Нативное (А, В) и децеллюляризированное (Б, Г) сердце крысы. Сканирующая электронная микроскопия. Увеличение: А, Б – х5000, В, Г- х15000.

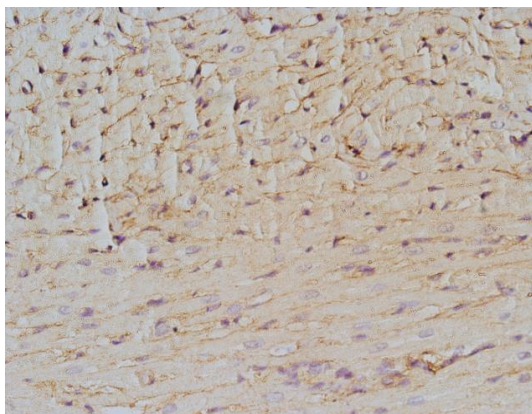
Так как свето- и электронномикроскопически внеклеточный матрикс сердца оставался без изменений, мы приступили изучению его белкового состава. Иммуногистохимическая реакция с антителами к белкам внеклеточного матрикса проходила как в испытуемых образцах, так и в контролях.

В нативных сердцах крысы были определены белки внеклеточного матрикса коллаген I типа, коллаген IV типа, ламинин, эластин, фибронектин. Указанные белки в нативной ткани преимущественно локализовались вдоль кардиомиоцитов в составе эндомизия и перимизия, а также в базальных мембранах коронарных сосудов. (рис 3.2.5 А, В, Д; 3.2.6. А, В). Эндотелиальный фактор роста сосудов – VEGF в нативном сердце выявляли как внутри, так и вне мышечных клеток во внеклеточном матриксе (рис 3.2.6 Д).

В кардиомиоцитах также определяли внутриклеточный сократительный белок тропомиозин и десмин (рис.3.2.7 А, В). На мембранах клеток выявили положительную реакцию с антителами к поверхностному антигену всех соматических клеток белку МНС I типа, а в клетках эндотелия сосудов с эндотелиальным маркером – фактором фон Виллебранда (рис.3.2.8 А, В).

В децеллюляризированной ткани сердца крысы сохранялась исходная локализация белков внеклеточного матрикса: коллагена I типа, коллагена IV типа, ламинина, эластина, фибронектина (рис. 3.2.5 Б, Г, Е; 3.2.6 Б, Г). Эндотелиальный фактор роста сосудов – VEGF выявляли в агрегированном к коллагеновым волокнам состоянии (рис. 3.2.6 Е).

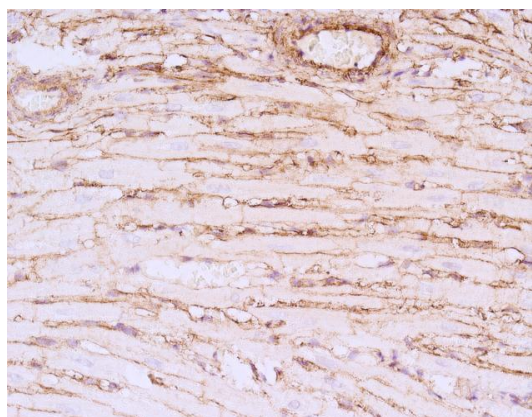
Внутриклеточный сократительный белок тропомиозин и белок десмин, обладающие антигенной активностью, поверхностный маркер всех соматических клеток белок МНС I типа, маркер эндотелиальных клеток фактор Виллебранта в децеллюляризированных матриксах, в отличие от нативных тканей сердца выявлены не были (рис. 3.1.7 Б, Г; 3.2.8 Б, Г).



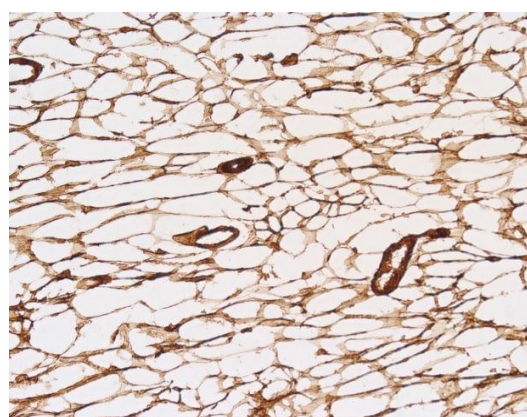
А



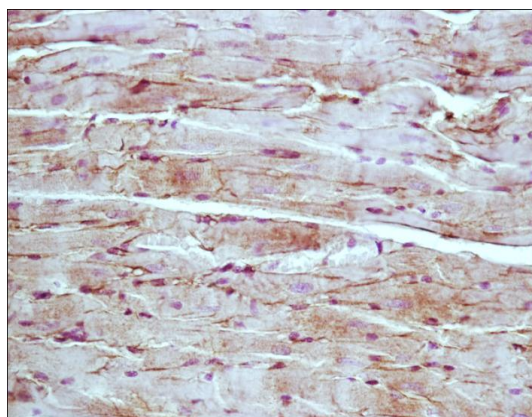
Б



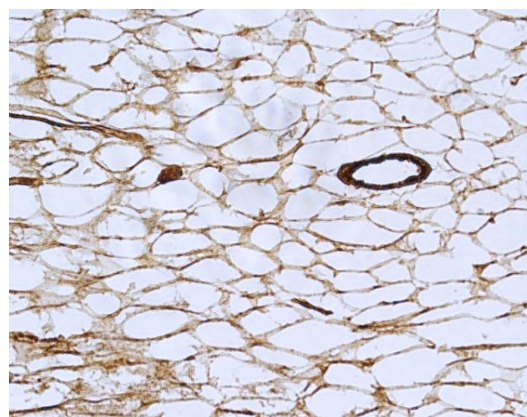
В



Г



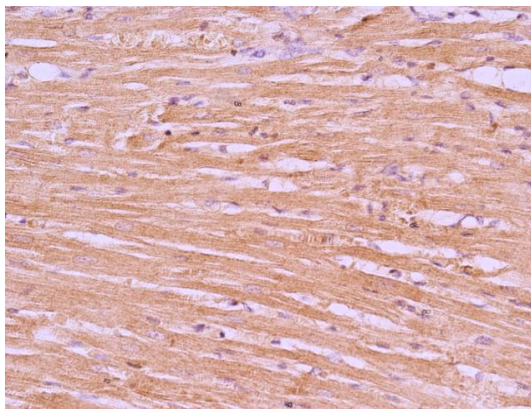
Д



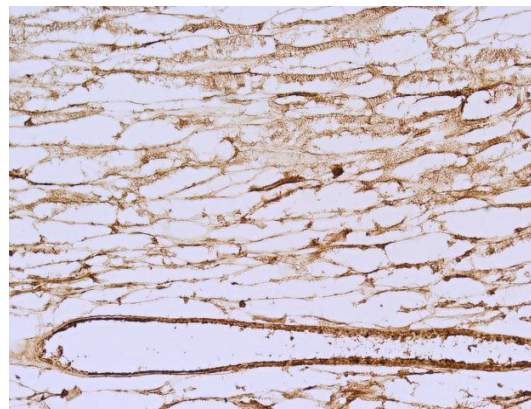
Е

Рис. 3.2.5 Нативное (А, В, Д) и децеллюляризированное (Б, Г, Е)
сердце крысы.

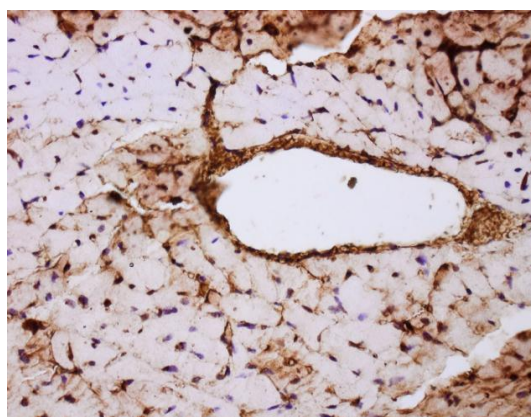
Иммуногистохимическая реакция с антителами к коллагену I (А, Б) и IV (В, Г) типов,
ламинину (Д, Е). Увеличение: об. x40, ок. x10.



А



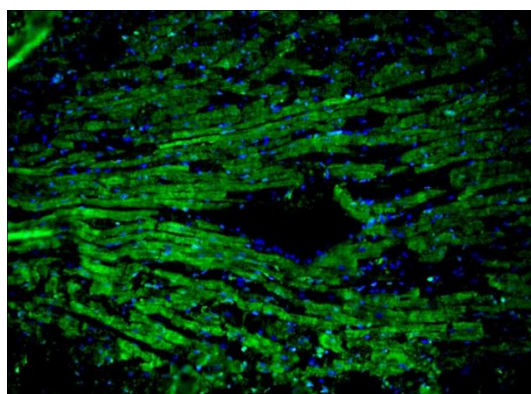
Б



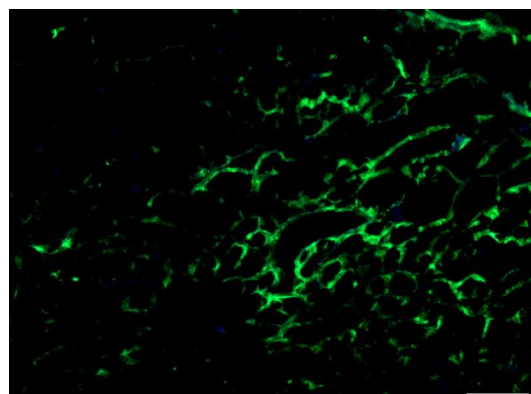
В



Г



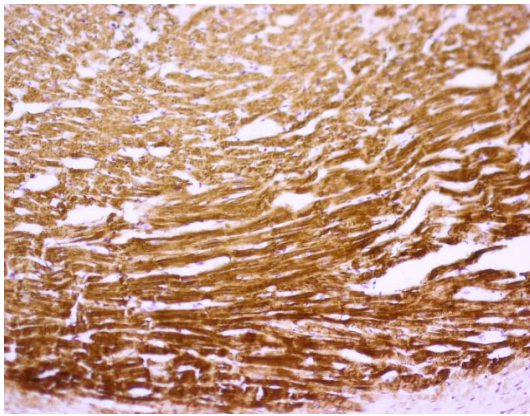
Д



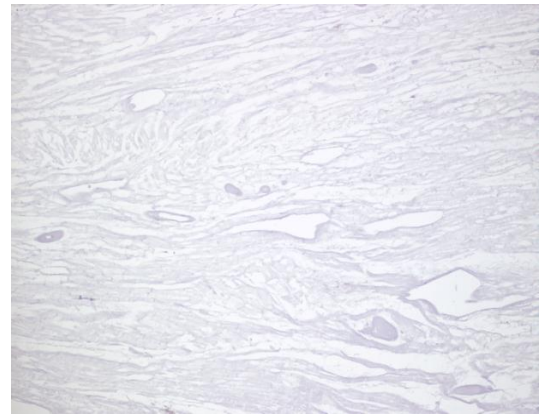
Е

Рис. 3.2.6 Нативное (А, В, Д) и децеллюляризированное (Б, Г, Е)
сердце крысы.

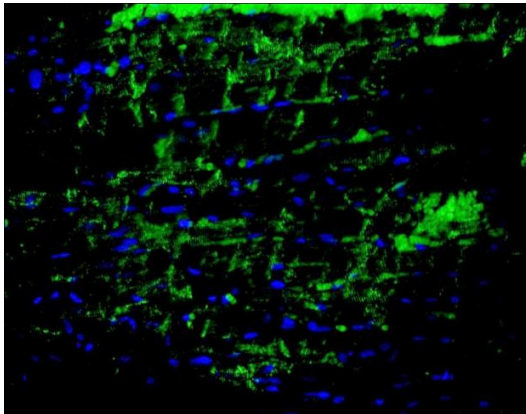
Иммуногистохимическая реакция с антителами к эластину (А, Б), фибронектину (В, Г),
VEGF (Д, Е). Увеличение: об. x40, ок. x10.



А



Б



В

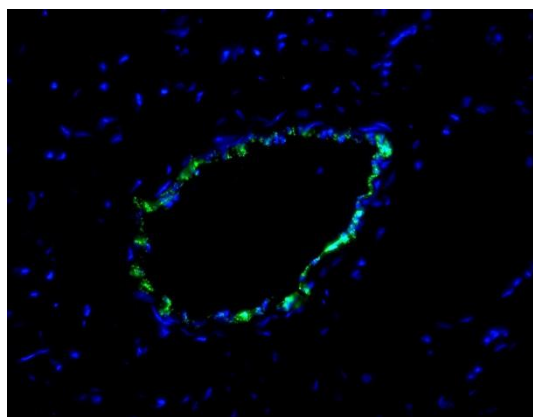


Г

Рис. 3.2.7 Нативное (А, В) и децеллюляризированное (Б, Г)
сердце крысы.

Иммуногистохимическая реакция с антителами к тропомиозину (А, Б) и десмину (В, Г).

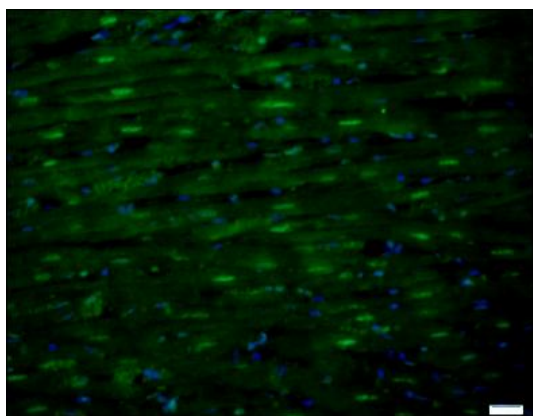
Увеличение: об. x40, ок. x10



А



Б



В



Г

Рис. 3.2.8 Нативное (А, В) и децеллюляризированное (Б, Г)
сердце крысы.

Иммуногистохимическая реакция с антителами к фактору фон Виллебранда (А, Б),
МНС I типа (В, Г). Увеличение: об. x40, ок. x10

Для подтверждения качественных методов оценки состава нативных и децеллюляризованных сердец был применен метод оценки площади позитивно окрашенных участков исследуемых образцов в узкой спектральной области с оптической плотностью выше пороговой (рис 3.2.9).

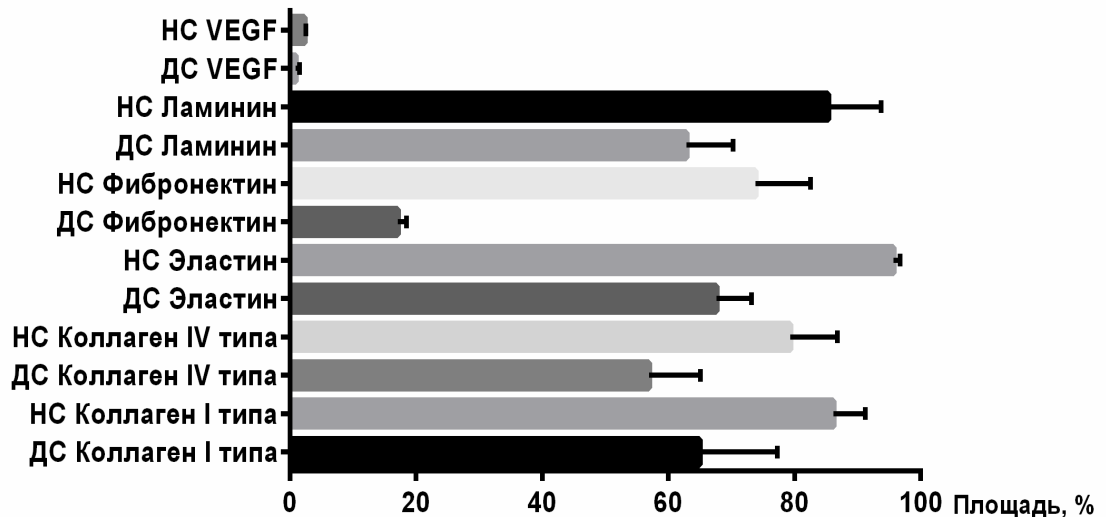


Рис 3.2.9 Количественный анализ белкового состава нативных и децеллюляризованных сердец крысы.

Примечание: НС – нативное сердце, ДС – децеллюляризованное сердце.

Площадь окрашивания коллагеном I типа в нативном сердце составила $86,18 \pm 2,24$ %, в децеллюляризованном – $64,92 \pm 5,06$ % ($p=0,006$). Коэффициент соотношения сохранившегося коллагена I типа во внеклеточном матриксе после проведения децеллюляризации составил 0,75. Указанный коэффициент для коллагена IV типа составил 0,71. Площадь окрашивания коллагеном IV типа в нативном сердце – $79,35 \pm 3,34$ %, в децеллюляризованном – $56,9 \pm 3,66$ % ($p=0,0019$). Площадь окрашивания эластином в нативном сердце составила $95,73 \pm 0,45$ %, в децеллюляризованном – $67,62 \pm 2,4$ % ($p<0,0001$). Коэффициент соотношения – 0,71. Площадь окрашивания фибронектином в нативном сердце составила $73,82 \pm 4,3$ %, в децеллюляризованном – $17,05 \pm 0,72$ % ($p<0,0001$). Коэффициент соотношения – 0,23. Площадь окрашивания

ламинином в нативном сердце составила $85,3 \pm 3,4$ %, в децеллюляризованном – $62,85 \pm 2,6$ % ($p=0,0002$). Коэффициент соотношения сохранившегося ламинина во внеклеточном матриксе после проведения децеллюляризации составил 0,74. Указанный коэффициент для VEGF составил 0,38. Содержание VEGF в нативном сердце составило $2,28 \pm 0,1$ %, в децеллюляризованном – $0,88 \pm 0,0,29$ % ($p=0,0017$).

Определение остаточного содержания ДНК – этап оценки децеллюляризованного матрикса после процедуры. Количественный анализ показал, что в процессе децеллюляризации сердца было удалено около 81% ДНК ($30,10 \pm 13,77$ нг/мг в децеллюляризованном сердце по сравнению с $153,27 \pm 30,38$ нг/мг – в нативном). Это свидетельствовало о том, что матрикс децеллюляризованного сердца (после 1 цикла обработки детергент - ферментатическим методом) был в значительной степени ($p < 0,05$) очищен от ДНК (рис. 3.2.10).

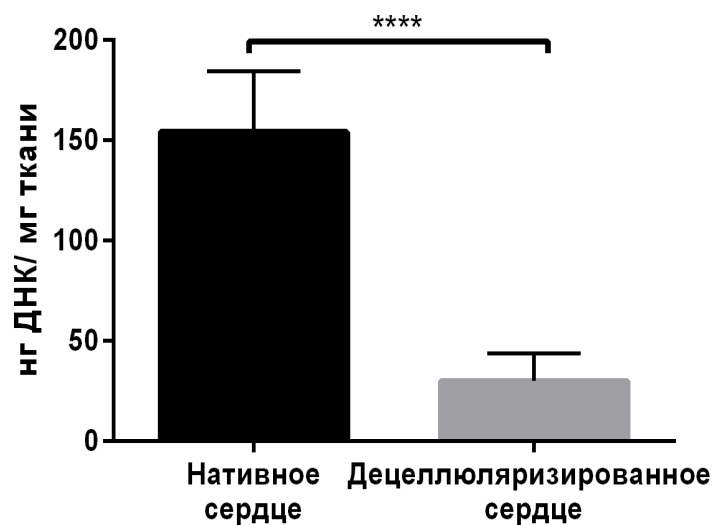


Рис. 3.2.10 Количественное содержание ДНК в ткани нативного и децеллюляризованного сердца крысы

Примечание: $P < 0,05$ между показателями до и после децеллюляризации

**** - $P < 0,0001$

Для более полной и всесторонней морфологической характеристики тканевых структур децеллюляризованного матрикса проводили

измерение его прочностных характеристик при помощи механического тестирования. По результатам испытаний были определены следующие параметры: предельная прочность ткани, ее деформация при предельной прочности и секущий модуль (модуль Юнга) при относительном удлинении 0,1, характеризующий свойства образцов сопротивляться растяжению/сжатию при упругой деформации.

В результате механического тестирования образцов нативных и децеллюляризированных сердец были получены типичные кривые при испытании на одноосное растяжение со скоростью 1 мм/мин и со скоростью 10 мм/мин (рис. 3.2.11).

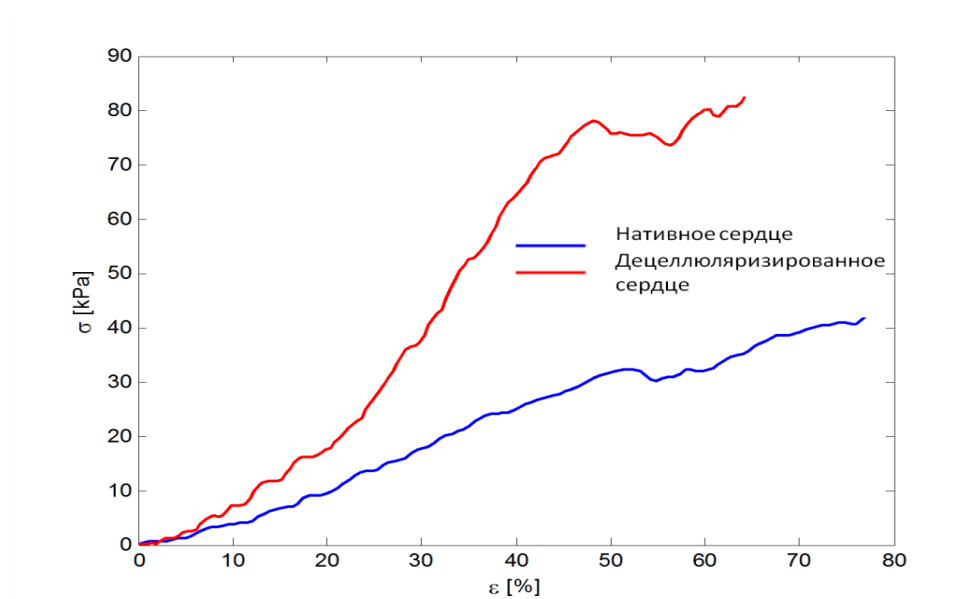
Полученные данные показывают, что и нативное и децеллюляризованное сердце в этом тесте демонстрируют различные свойства (табл. 3.2.1). Децеллюляризованное сердце имеет основные механические характеристики выше исходных в 1,8-1,9 раза. Обращает на себя внимание тот факт, что у образцов децеллюляризированных сердец наблюдается большее стандартное отклонение по всем определенным свойствам, чем у нативных, особенно это относится к предельной прочности и секущему модулю.

Таблица 3.2.1

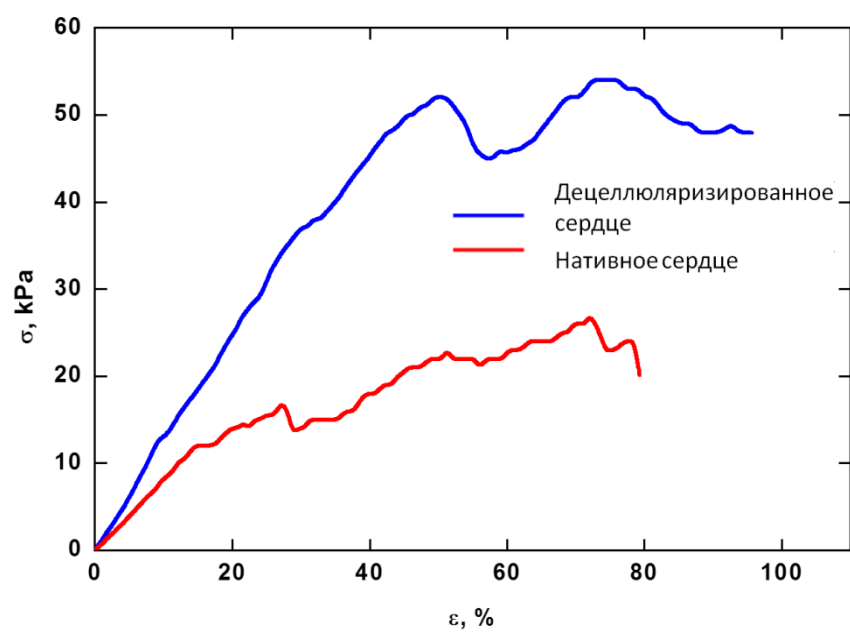
Механические свойства нативного и децеллюляризированного левого желудочка сердца крысы.

Образец	Скорость испытания, мм/мин	$E_{10\%}$, кПа	$\sigma_{\text{макс}}$, кПа	$\epsilon_{\text{пик}}$, %
Нативный	1	38±17	38±12	96±30
	10	74±20	27±6	72±15
Децеллюляризированный	1	71±50	93±35	61±4
	10	126±28	54±18	74±19

Примечание: $P < 0,05$ между показателями до и после децеллюляризации, $E_{10\%}$ - секущий модуль при относительном удлинении 0,1, $\sigma_{\text{макс}}$ - предельная прочность, $\epsilon_{\text{пик}}$ - деформация при предельной прочности.



А



Б

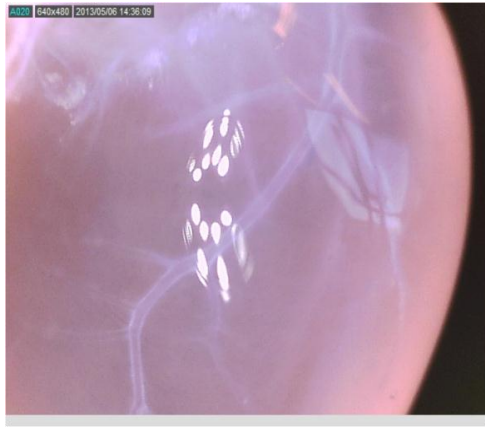
Рис. 3.2.11 Типичные кривые растяжения образцов сердца при различных скоростях испытания: А – 1 мм/мин; Б – 10 мм/мин.

Механический тест.

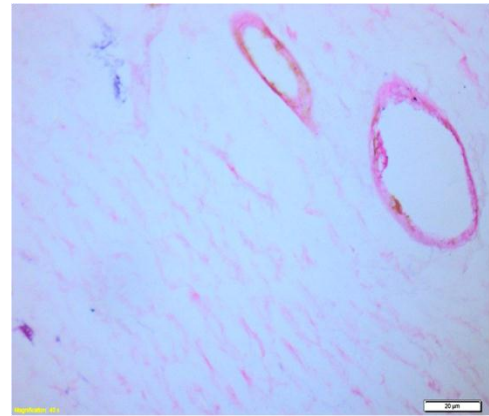
Оценку сохранности коронарных сосудов производили перед началом экспериментов по внутрисосудистому введению клеток в целях рецеллюляризации каркаса сердца. Венечные артерии оставались сохранными после проведения децеллюляризации сердца как при визуальном рассмотрении, так и при окрашивании гематоксилином и эозином образца децеллюляризированного сердца (рис. 3.2.12 А, Б). Диаметр артерий составлял 25 ± 5 мкм, толщина базальной мембраны – 4 ± 1 мкм. Проведение ретроградной перфузии через аорту 0,4% раствора трипанового синего показало проходимость коронарных артерий в децеллюляризированном сердце и позволило визуализировать сосуды вплоть до артерий третьего-четвертого порядков (рис. 3.2.12 В, Г). Рутинные методики гистологической окраски, а также иммуногистохимическое исследование не выявили эндотелиальных клеток в децеллюляризированном матриксе (отсутствовали фактор фон Виллебранд позитивные клетки).

3.3 Характеристика взаимодействия децеллюляризированного матрикса сердца крысы с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками

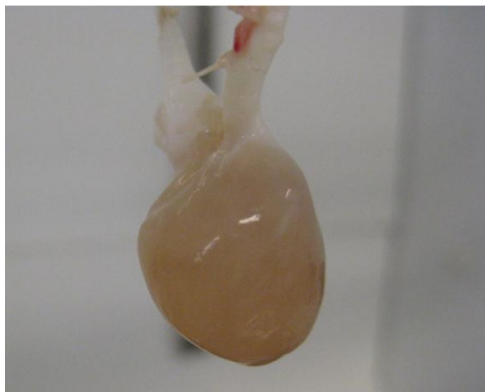
Учитывая результаты морфологического анализа децеллюляризированного матрикса, исследования проходимости сосудов для растворов, данные механического тестирования образцов, анализа количественного содержания ДНК в тканях, мы приступили к проведению дальнейших экспериментов, связанных с рецеллюляризацией полученного каркаса. Для проведения рецеллюляризации были выбраны ММСК в связи с высокой доступностью, а также возможностью оценить способность децеллюляризированного каркаса сердца специфически влиять на индукцию дифференцировки клеток. Также нами учитывалось и то, что выбранные клетки должны быть выделены в большом количестве во взрослом организме, так как в будущем подобная методика создания



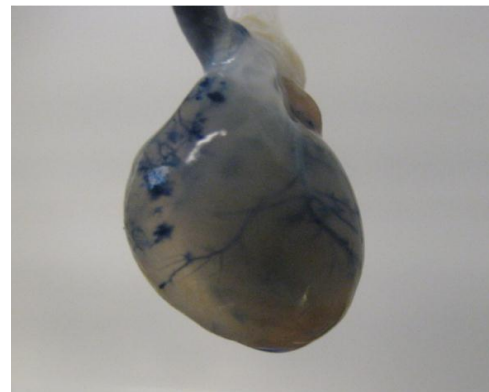
А



Б



В



Г

Рис. 3.2.12 Сосудистая архитектура децеллюляризованного сердца.

А - коронарная артерия в процессе децеллюляризации. Б – коронарные сосуды в децеллюляризованном сердце. Гематоксилин и эозин. Коронарные сосуды до (В) и после (Г) перфузии раствором трипанового синего.

Увеличение: А – об. х4; Б – об. х40, ок. х10.

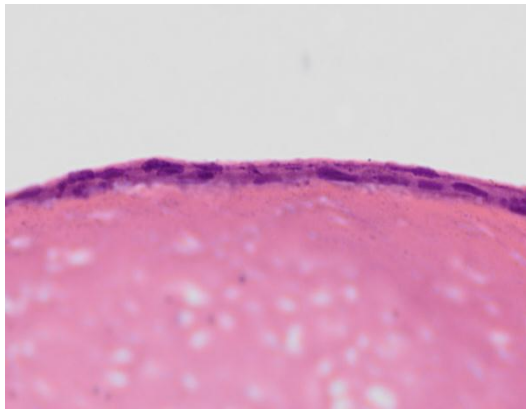
тканеинженерного сердца может быть перенесена и для более крупных, чем крысы, организмов.

Рецеллюляризацию матрикса производили двумя способами. На начальном этапе маленькие кусочки децеллюляризированных образцов статично заселяли в культуральных планшетах в течение 3 дней для последующего проведения гистологического анализа, МТТ-теста, антиоксидантного теста, что не требовало использования большого числа клеток, однако позволило получить необходимые данные о клеточной адгезии к матриксу и его цитотоксичности.

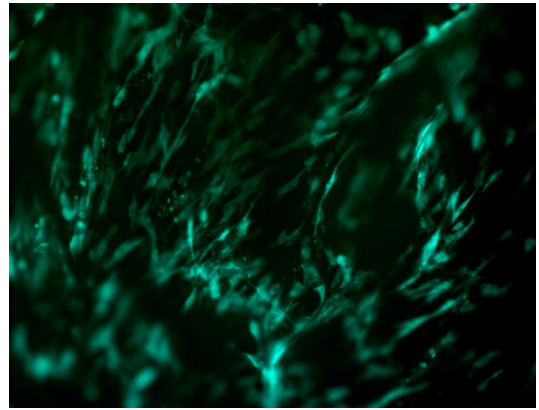
Далее ацеллюлярный каркас рецеллюляризировали полностью с применением методики интравазального введения клеточной суспензии для получения структуры, подобной нативному органу, с последующей ее морфологической оценкой, анализом распределения стволовых клеток внутри каркаса сердца и его влиянием на индукцию клеточной дифференцировки.

При окрашивании гематоксилином и эозином статично рецеллюляризированных в течение 3 дней образцов было установлено, что клетки прикрепились к каркасу, образовав на нем 1-2 слоя, но не мигрировали внутрь, оставаясь на поверхности. Результаты сканирующей электронной микроскопии подтвердили полученные данные. При увеличении в 2000 раз были выявлены клетки, прикрепившиеся к волокнам внеклеточного матрикса, формирующие на поверхности каркаса монослой, имеющие полигональную форму, продольно вытянутые, размером до 25 мкм (рис. 3.3.1).

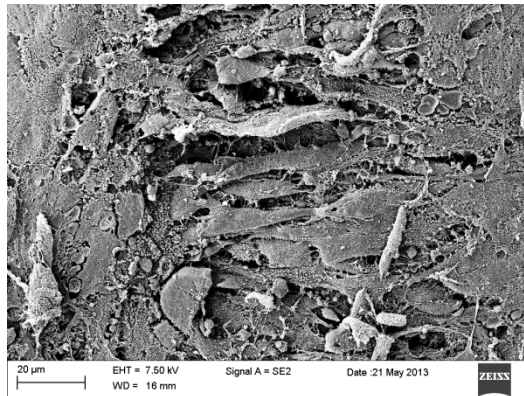
Определение жизнеспособности и метаболической активности клеток на каркасе сердца – еще один этап оценки цитотоксических свойств матрикса, а равно и успешности проведенной рецеллюляризации. МТТ-тест – метод определения жизнеспособности клеточных культур, основанный на способности дегидрогеназ живых клеток превращать



А



Б



В

Рис. 3.3.1 Рецеллюляризированное сердце крысы. ММСК образуют монослой на поверхности децеллюляризированного образца.

А - гематоксилин и эозин; Б - флуоресцентная микроскопия GFP+ клеток на каркасе,

В - сканирующая электронная микроскопия

Увеличение: А,Б об. x200; В x2000

желтый бромид 3-(4, 5- диметилтиазол – 2-ил) – 2,5 – дифенилтераразолия (МТТ-реагент) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана, растворимого в диметилсульфоксиде, проведенный после рецеллюляризации матрикса сердца, показал наличие живых клеток на рецеллюляризированном сердечном матриксе и метаболической активности в них после статичной рецеллюляризации в течение 50 часов, а также после рецеллюляризации целого органа в течение 168 часов. В случае рецеллюляризации целого органа метаболическая активность клеток была в 1,5 раза выше, чем при статичной рецеллюляризации (рис. 3.3.2 А, Б). В негативных контролях образования МТТ-формазана не происходило.

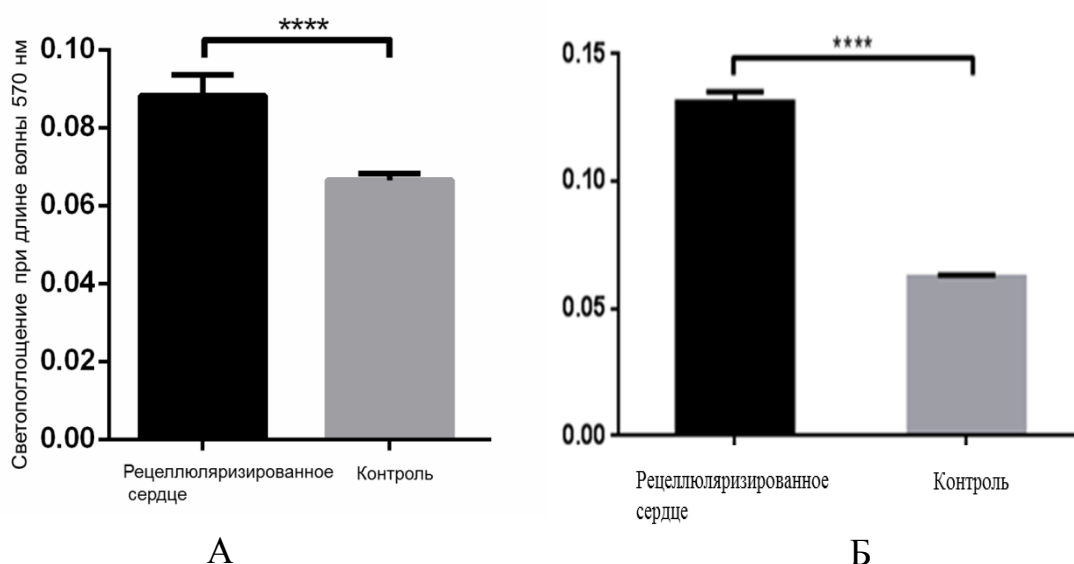


Рис. 3.3.2 Оценка жизнеспособности ММСК, заселенных на децеллюляризованный каркас сердца крысы в течение 50 (А) и 168 (Б) ч. МТТ-тест. **** - $P < 0,0001$

Дифференциальное выявление живых (флуоресценция с кальцеином) и мертвых (флуоресценция с гомодимером этидия) клеток, основанное на активном транспорте кальцеина внутрь живых клеток и пассивном транспорте гомодимера этидия внутрь мертвых клеток, позволило визуализировать живые клеток во время длительной статичной

рецеллюляризации каркаса (рис 3.3.3). Было установлено, что $80\pm 10\%$ клеток оставались жизнеспособными после культивирования на децеллюляризованном каркасе в течение 3 дней.

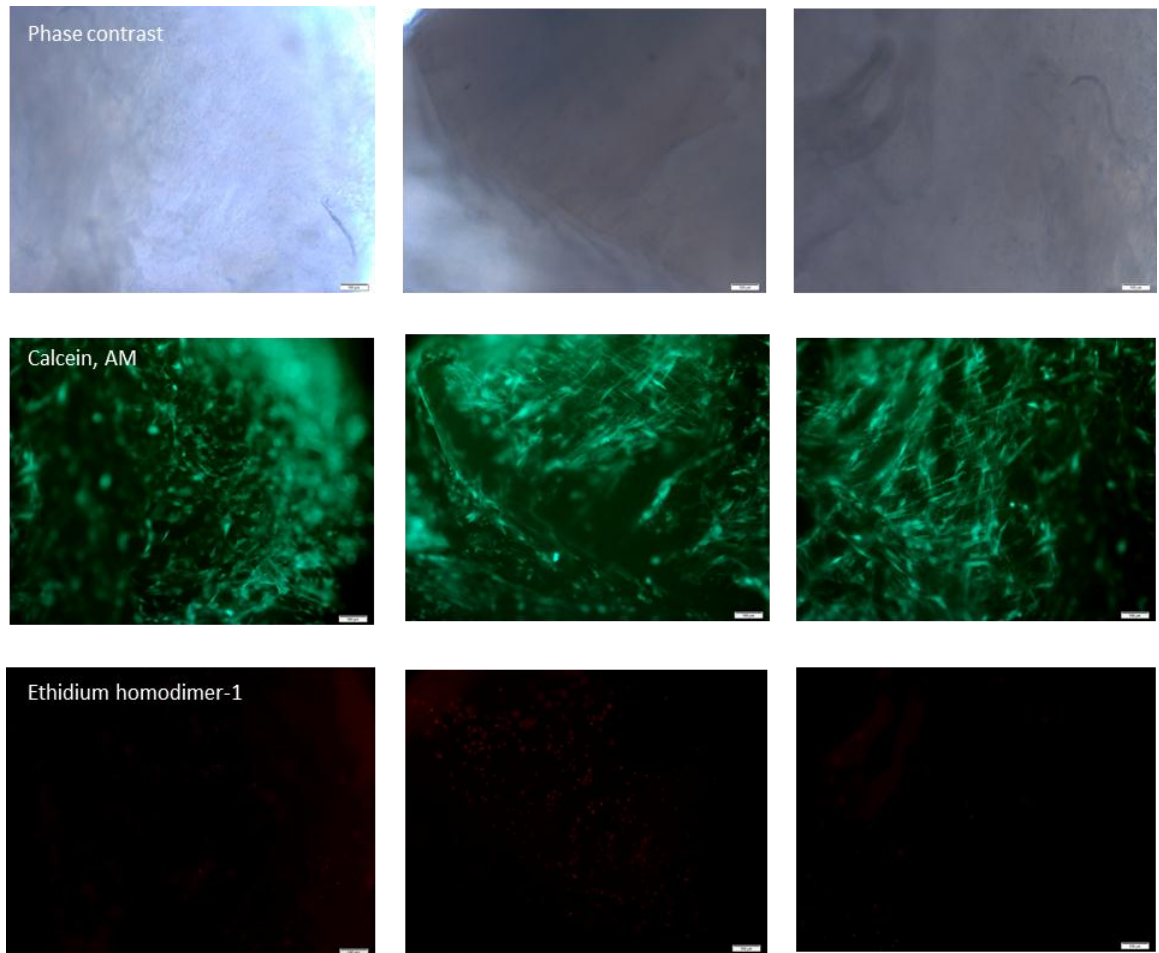


Рис. 3.3.3 Оценка жизнеспособности ММСК, заселенных на децеллюляризованный каркас сердца крысы. Живые клетки позитивное окрашивание кальцеином АМ, погибшие – позитивное окрашивание гомодимером этидия.

Увеличение: об. x10, ок x10

Во время децеллюляризации и последующей рецеллюляризации мы уделили внимание определению содержания элементов антиоксидантной системы в матриксе, так как антиоксиданты – это важные внутриклеточные молекулы, играющие значительную роль в метаболизме живых клеток, и одновременно с этим, в зависимости от содержания в тканях, косвенно свидетельствуют о наличии либо отсутствии других внутриклеточных биологически активных молекул и соединений.

Интенсивность люминесценции антиоксидантов в нативной ткани сердца крысы была в 2,7 раза ниже интенсивности люминесценции контрольного раствора аналога витамина А концентрацией 600 ммоль/л. Пик люминесценции антиоксидантов в децеллюляризованном каркасе сердца крысы при проведении антиоксидантного теста был самый ранний, в сравнении с нативной и рецеллюляризованной тканью, совпадал по времени с пиком люминесценции контрольного раствора аналога витамина А концентрацией 10 ммоль/л, интенсивность его была в 6 раз выше, чем в нативной ткани и в 3,7 раза выше, чем в рецеллюляризованной, что соответствовало минимальной активности внутриклеточных антиоксидантных систем в нем.

Низкое содержание антиоксидантов в децеллюляризованной ткани подтверждало отсутствие жизнеспособных клеток в полученном матриксе и косвенно свидетельствовало об отсутствии иных внутриклеточных белков, которые теоретически могут являться антигенами при трансплантации матрикса в организм-реципиент и тем самым спровоцировать отторжение трансплантата. В то же время рецеллюляризованный сердечный матрикс, также как и нативный, обладал антиоксидантной активностью, что подтверждало наличие жизнеспособных клеток на нем (рис. 3.3.4).

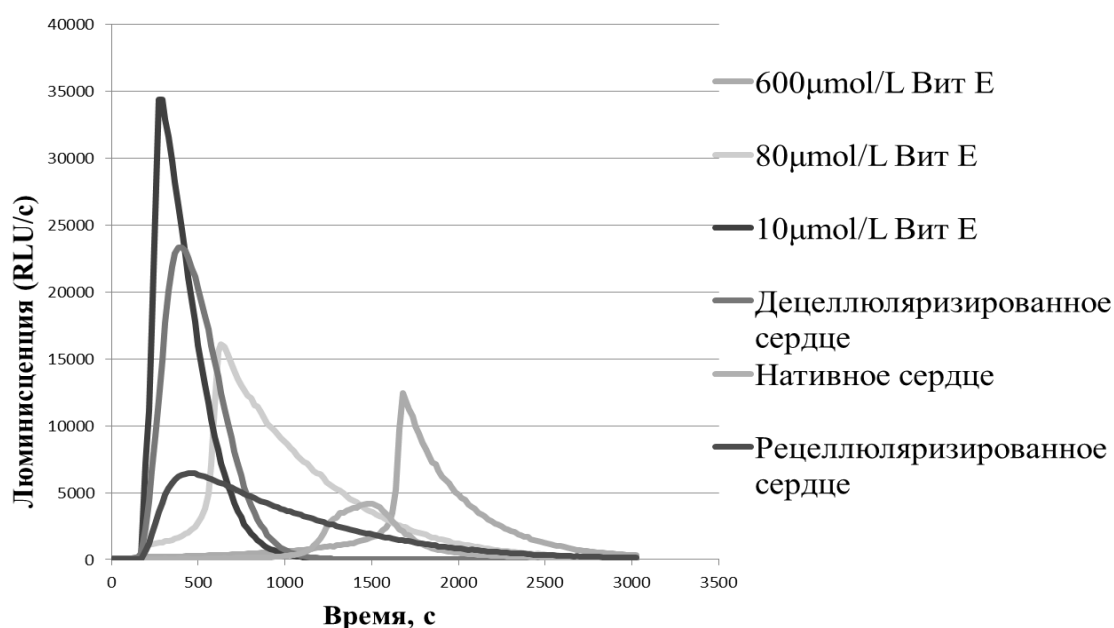


Рис. 3.3.4 График относительного содержания элементов антиоксидантной системы в нативном, децеллюляризованном и рецеллюляризованном сердце крысы. Антиоксидантный тест.

После экспериментов по статичной рецеллюляризации мы приступили к рецеллюляризации каркаса целого органа в биореакторе. Для этого децеллюляризованное сердце помещали в биореактор (Harvard Apparatus, США, рис. 3.3.5) и стерилизовали его путем ретроградной перфузии через аорту 10% этанола в фосфатном буфере в течение 15 минут, затем трижды в течение 60 минут перфузировали раствором PBS +/- (Gibco, Англия), содержащим 1% раствор антибиотика-антимикотика. И, наконец, перфузировали его культуральной средой для ММСК в течение трех часов. Затем производили рецеллюляризацию клеточной суспензией: 20 млн. клеток растворяли в 200 мл культуральной среды и вводили со скоростью 0,5 мл/мин в аорту. Насыщение культуральной среды кислородом производилось при пропускании через нее смеси из 95% воздуха и 5% CO₂. Смену культуральной среды производили каждые 2 дня с последующим подсчетом клеток, находящихся в ней. Время

подобной рецеллюляризации составляло от 1 до 3 недель и зависело от наличия либо отсутствия бактериальной контаминации растворов либо самого матрикса. Причиной контаминации служили конструктивные особенности биореактора – большое количество трубок и соединений, необходимость его сборки вручную непосредственно перед проведением рецеллюляризации.

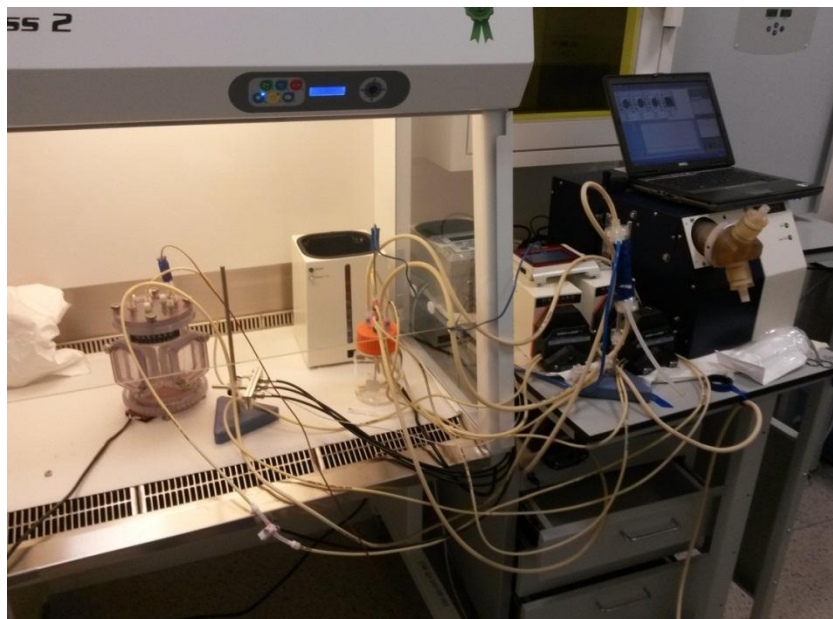


Рис 3.3.5 Биореактор Harvard Apparatus для проведения рецеллюляризации сердца крысы.

Трудностью, возникшей на этом этапе, было и то, что оказалось невозможным вводить более 10-15 миллионов клеток интравазально одновременно: из-за большого объема клеточной суспензии часть клеток (около 20%) не прикреплялась к каркасу, оставалась в культуральной среде во взвешенном состоянии и впоследствии погибала. Для предотвращения гибели клеток от гипоксии на мы проводили дополнительную оксигенацию культуральной среды путем пропускания через нее смеси воздуха (95%) и углекислого газа (5%).

В начале рецеллюляризации сердце приобретало нежно розовый цвет за счет окрашивания каркаса культуральной средой, содержащей клетки, но оставалось прозрачным. Однако, по мере культивирования

рецеллюляризированного каркаса сердца в биореакторе, оно становилось все менее прозрачным к концу первой недели культивирования (рис 3.3.6).



Рис. 3.3.6 Сердце крысы после рецеллюляризации

Окраска микропрепаратов рецеллюляризированного сердца крысы гематоксилином и эозином, проведенная после интравазальной рецеллюляризации целого органа перфузионным методом показала, что клетки способны заселять все камеры сердца. Они образовывали 1-2 слоя на внутренней поверхности всех камер и перегородки сердца, на базальной мембране коронарных сосудов, а также мигрировали внутрь стенки каркаса, располагаясь в ней диффузно (рис. 3.3.7 А-Е).

Расположенные в строме органа клетки имели преимущественно округлую либо овальную форму, при отношении продольного размера к поперечному равном 2,3, в то время как при прикреплении к внутренней поверхности камер каркаса и коронарных сосудов клетки имели уплощенную форму с соотношением продольного размера к поперечному равном 7,1 (табл. 3.3.1).

Таблица 3.3.1

Локализация	Продольный размер клеток, мкм	Поперечный размер клеток, мкм
Строма органа	5,74±0,26	2,48±0,1
Внутренняя поверхность камер сердца, сосудов	11,34±0,28	1,59±0,05

Примечание: $P < 0,0001$

Биолюминесценция клеток после проведения рецеллюляризации всего сердца под воздействием D-люциферина выявила наличие жизнеспособных клеток во всех камерах органа, однако наибольшая интенсивность люминесценции клеток отмечалась преимущественно вдоль коронарных сосудов, что объясняется их интравазальным способом введения (рис 3.3.8).

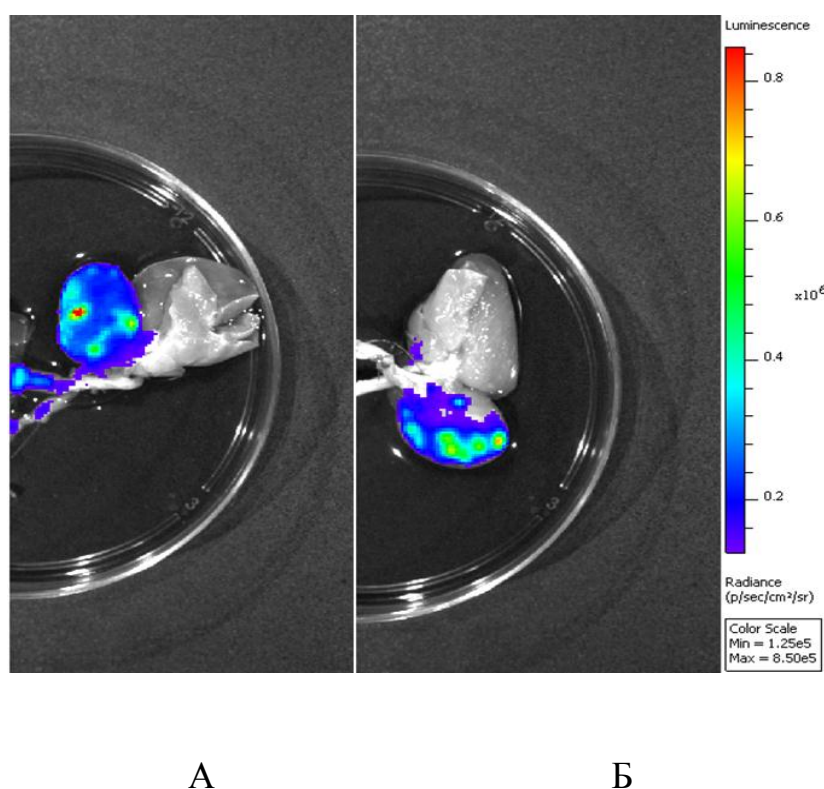
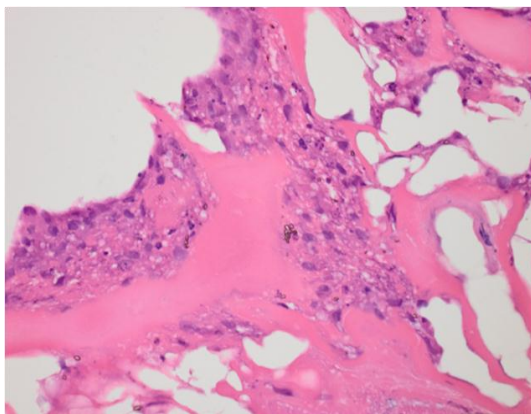
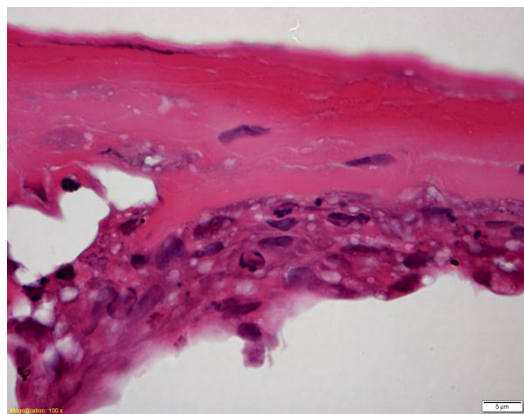


Рис. 3.3.8 Биолюминесценция жизнеспособных клеток на каркасе сердца крысы: А – передняя поверхность, Б – задняя поверхность сердца.

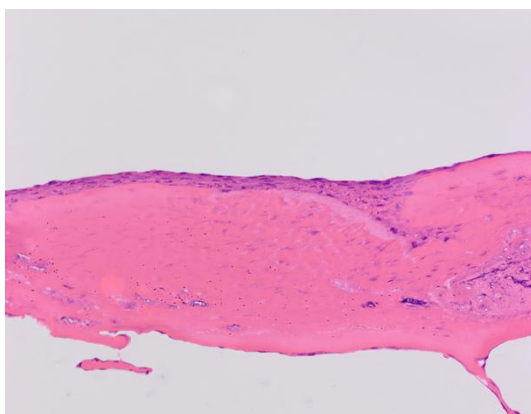
3D томография



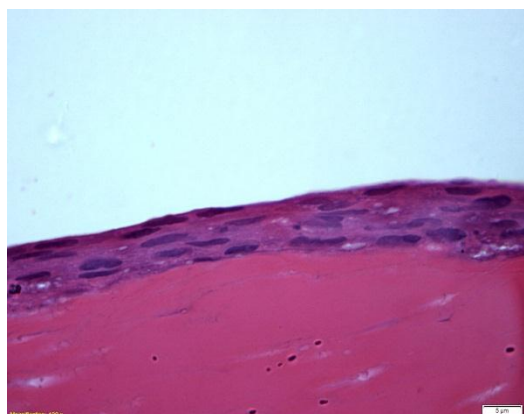
А



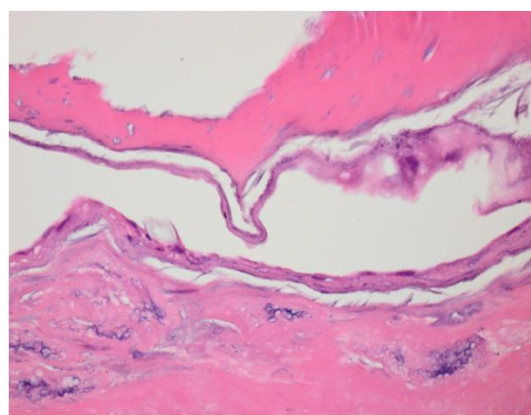
Б



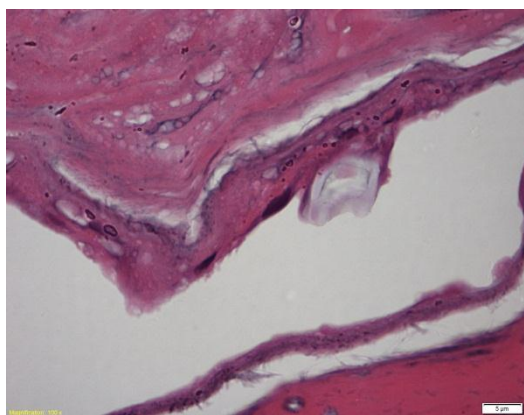
В



Г



Д



Е

Рис. 3.3.7 Рецеллюляризированное сердце крысы: ММСК в толще стромы сердца (А, Б), клетки в 1-2 слоя выстилают внутреннюю поверхность камер сердца (В, Г), коронарных сосудов (Д, Е).

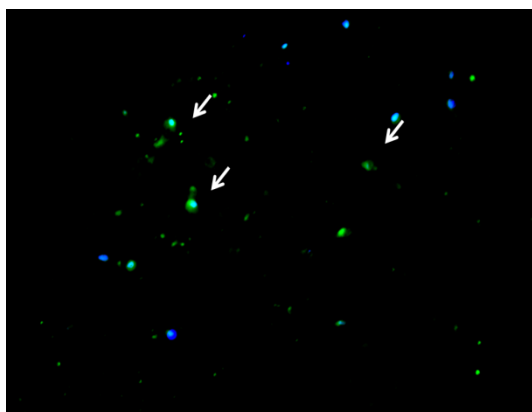
Гематоксилин и эозин; Увеличение: А, В, Д об. x40, ок x10; Б, Г, Е об. x100, ок x10;

Иммуногистохимический анализ рецеллюляризированного сердца проводили с целью определения влияния матрикса на пролиферативную способность клеток, а также, ввиду того, что в культуральную среду не добавляли факторы роста клеток и дифференцировочные агенты, для установления возможности децеллюляризированного матрикса способствовать дифференцировке мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в более зрелые клеточные линии.

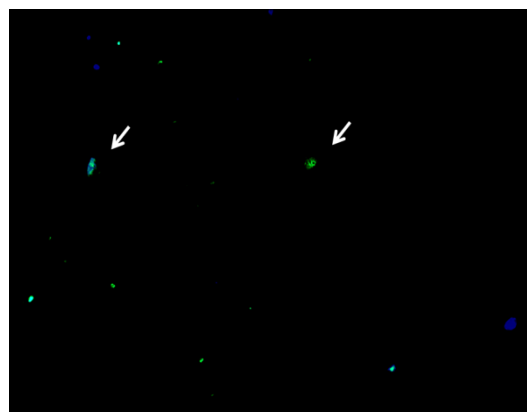
В первую очередь, при помощи иммуногистохимического исследования была выявлена положительная реакция клеток с антителами к поверхностному антигену всех соматических клеток МНС I типа (рис. 3.3.9 А). Обнаруженные клетки в рецеллюляризированном матриксе обладали пролиферативной активностью, что доказывала флуоресценция клеточных ядер с антителами к маркеру пролиферации – Ki-67 (индекс пролиферации составил $10\% \pm 5$; рис. 3.3.9 Б).

В рецеллюляризированном внеклеточном матриксе, а также в некоторых клетках была обнаружена положительная экспрессия эндотелиального фактора роста сосудов – VEGF, также ряд клеток имел позитивную реакцию с фактором фон Виллебранда, что говорит о потенциальной возможности образования в рецеллюляризированном матриксе новых сосудов и эндотелиальной дифференцировке стволовых клеток (рис 3.3.9 В, Г).

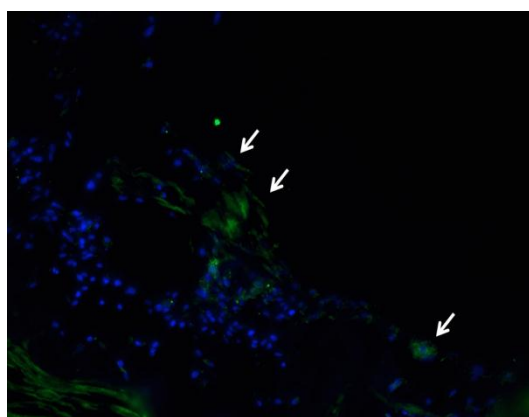
Наличие потенции к мышечной дифференцировке мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток после культивирования на децеллюляризированном матриксе подтверждалось положительной реакцией клеток с антителами к сократительному белку α -гладкомышечному актину, и коннексину-43 – основному коннексину щелевых контактов в сердце, играющему критическую роль в эмбриональном развитии сердечной мышечной ткани (рис 3.3.9 Д, Е).



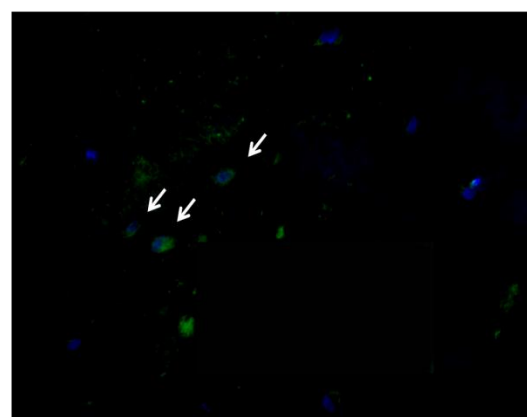
А



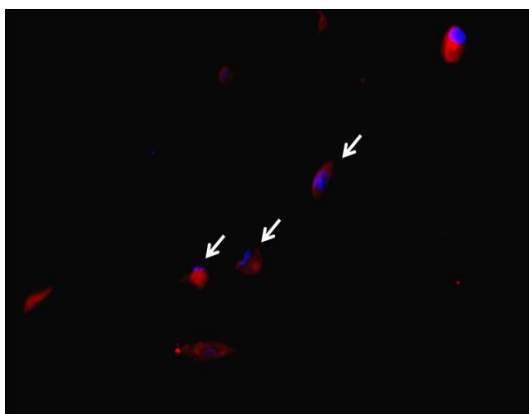
Б



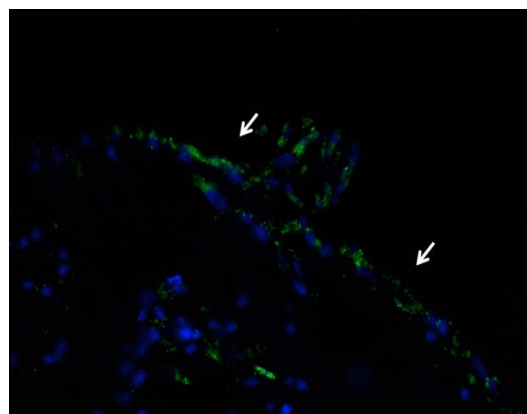
В



Г



Д



Е

Рис. 3.3.9 Рецеллюляризированное сердце крысы.

Иммуногистохимическая реакция (обозначена стрелками) с антителами МНС I (А), Ki-67(Б), VEGF (В), фактору фон Виллебранда (Г), α -гладкомышечному актину(Д), коннексину 43(Е) Увеличение: А-В об. $\times 10$, ок. $\times 10$; Г-Е об. $\times 40$, ок. $\times 10$.

Резюме

Создание децеллюляризированных внеклеточных матриксов и выявление их морфологических, механических цитотоксических свойств является важнейшим этапом создания тканеинженерных органов. Оценку качества децеллюляризации сердца крысы проводили согласно разработанному алгоритму, включающему в себя проведение гистологического анализа, сканирующей электронной микроскопии, иммуногистохимического исследования состава внеклеточного матрикса, определение количественного содержания уровня ДНК, оценку основных прочностных механических свойств матрикса, а также цитотоксичности каркаса по отношению к заселенным на него стволовым клеткам

Был разработан способ моделирования биоинженерного каркаса сердца в эксперименте на крысе, позволивший максимально сохранить гистологическую структуру внеклеточного матрикса сердца, обеспечить щадящий режим обработки биологического материала, снизить концентрацию детергентов, время экспозиции растворов и вероятность бактериальной контаминации получаемого каркаса.

Проведенный морфологический анализ децеллюляризированного каркаса сердца крысы показал эффективность удаления клеток с применением детергент-энзиматического метода децеллюляризации.

Гистологическое исследование тканей подтвердило, что внеклеточный матрикс оставался неизменным. Сохранялась упорядоченная структура и преимущественно параллельное расположение коллагеновых волокон в матриксе. Патологических изменений структуры, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было. Коронарные сосуды оставались проходимы для растворов и были использованы для введения клеток в процессе рецеллюляризации.

В результате децеллюляризации оставались сохранными структурные белки внеклеточного матрикса, не обладающие антигенной активностью: коллагены I (коэффициент соотношения – 0,75) и IV типов (0,71), ламинин (0,74), эластин (0,73), фибронектин (0,23), а также сосудистый эндотелиальный фактор роста – VEGF (0,38), в то же время как внутриклеточный сократительный белок тропомиозин, а также мембранные белки – МНС I типа, десмин, маркер эндотелия – фактор фон Виллебранда, обладающие антигенной активностью и видовой специфичностью – отсутствовали полностью.

В децеллюляризованном сердце происходило достоверное снижение уровня содержания ДНК ($30,10 \pm 13,77$ нг/мг в децеллюляризованном сердце по сравнению с $153,27 \pm 30,38$ нг/мг – в нативном). Основные механические прочностные характеристики децеллюляризованного сердца были выше исходных в 1,8-1,9 раза. Уровень содержания элементов антиоксидантной системы оказался в 6 раз ниже, чем в нативной ткани, что косвенно подтверждало отсутствие прочих внутриклеточных белковых систем.

Рецеллюляризацию предварительно децеллюляризованного каркаса сердца крысы осуществляли мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костномозгового происхождения. Время процедуры составляло от 3-х суток во время статичной рецеллюляризации матрикса до 3 недель при интравазальной рецеллюляризации целого органа.

Гистологический анализ, проведенный после статической рецеллюляризации децеллюляризованного матрикса сердца, показал способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток к адгезии к данному матриксу. Клетки за время культивирования в течение 3 дней оказались способны к формированию монослоя на поверхности матрикса, сохраняя свою метаболическую активность и жизнеспособность.

Во время рецеллюляризации целого органа перфузионным методом клетки образовывали 1-2 слоя на внутренней поверхности камер сердца, коронарных сосудов, а также мигрировали внутрь всей стенки каркаса, располагаясь в нем диффузно с преимущественной локализацией вдоль коронарных сосудов. За время рецеллюляризации сроком до 3 недель ММСК сохраняли митотическую активность и приобретали дифференцировку в сторону эндотелиальных клеток (положительная экспрессия маркера фактора фон Виллебранда) и потенцию к мышечной клеточной дифференцировке (положительная экспрессия маркера коннексин-43).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты проведенного исследования показали, что в децеллюляризованном при помощи модифицированного детергент-энзиматического метода с использованием дезоксихолата натрия и ДНКазы каркасе сердца крысы после проведения процедуры отсутствуют сохраненные мышечные клетки, клеточные ядра, внутриклеточные и мембранные антигенные молекулы, достоверно снижается уровень ДНК, однако, получаемая структура сохраняет все необходимые структурные белки соединительной ткани, факторы роста, подобно нативному органу, а также проходимость коронарных сосудов для растворов и клеточной суспензии. Все основные механические прочностные характеристики не только не снижаются, а наоборот возрастают. Результаты рецеллюляризации показывают, что получаемый каркас не является токсичным для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, они сохраняют свою жизнеспособность, метаболическую и пролиферативную активность, способны к адгезии к данному каркасу и миграции внутрь него при интравазальном способе рецеллюляризации. В то же время нами показана способность внеклеточного матрикса сердца крысы потенциально индуцировать эндотелиальную и мышечную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Используемый нами детергент-энзиматический протокол децеллюляризации, позволяет сокращать время воздействия детергентов и энзимов для получения внеклеточного матрикса сердца крысы, а также вероятность бактериальной контаминации получаемого каркаса.

По данным D. Taylor и соавт. (2009) для создания подходящего каркаса биоинженерного органа требуется воссоздать структуру, морфологически сходную с нативной, имеющую развитую сосудистую сеть, способную обеспечить адекватную перфузию тканей. Необходимо, чтобы клетки, используемые при рецеллюляризации матрикса, были

способны к дифференцировке во все паренхиматозные и сосудистые структуры органа. Исследователь должен обладать возможностью управления микроокружением клеток для воздействия на их физиологию и функции, а также управления дифференцировкой и созреванием клеток *in vitro*.

Практическая цель децеллюляризации – максимально полное удаление клеток из тканей с минимальными повреждениями внеклеточного матрикса (Badylak S. F. и др., 2001). Тканеинженерные органы, предварительно подвергшиеся децеллюляризации, не должны содержать клеток донора, включая такие клеточные компоненты как цитоплазма и ядра. Их присутствие во внеклеточном матриксе может способствовать нарушению клеточной биосовместимости *in vitro* и вызывать побочные реакции в условиях *in vivo* при последующей рецеллюляризации (Nagata S. et al., 2010; Zhang Q. et al., 2010).

Поскольку при использовании различных методов децеллюляризации невозможно удалить 100% клеток, существует большое количество методов оценки оставшихся компонентов клеток, таких как ДНК, митохондрии или мембран-ассоциированные молекулы, например, фосфолипиды. Пороговая концентрация остаточного клеточного материала во внеклеточном матриксе, которая может быть достаточной для развития нежелательного эффекта, не была подробно изучена и может изменяться в зависимости от источника внеклеточного матрикса, типа ткани, в которую он был имплантирован, и иммунной системы реципиента.

В настоящее время не определены количественные критерии эффективности децеллюляризации. Основываясь на результатах исследований, в которых изучалось развитие ремоделирующего эффекта и возникновение побочных явлений на клеточном и организменном уровнях, были предложены следующие минимальные критерии для оценки эффективности децеллюляризации (Badylak S.F., et al., 2011): 1) <50 нг

двухцепочечной ДНК в 1 мг сухого веса внеклеточного матрикса; 2) фрагменты ДНК длиной <200 пар нуклеотидов (Brown B.N. et al., 2009; Brown B.N. et al., 2010); 3) отсутствие видимого ядерного материала в срезах ткани, окрашенных 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) или гематоксилином и эозином.

Изучение резидуального количества ядер клеток заслуживает пристального внимания, так как от наличия ДНК зависит развитие неблагоприятных реакций со стороны организма-реципиента (Nagata S. et al., 2010; Zheng M.H. et al., 2005). Содержание в ткани нуклеиновых кислот легко оценить. Полученные данные в этом случае дают основания к формированию представлений об остаточном количестве клеток обработанной ткани. Третий критерий оценивается путем рутинных морфологических методов исследования, которые служат качественной проверкой первых двух критериев.

Более поздние работы поставили эти критерии под сомнение, так как менее эффективно децеллюляризованные ткани показывали аналогичные результаты после имплантации при сравнении с эффективно децеллюляризованными тканями. Хотя эти критерии дают много полезной информации, можно утверждать, что они определяют денуклеаризацию тканей, а не децеллюляризацию. Эти критерии используют ДНК в качестве ориентира концентрации других внутриклеточных или мембранных молекул, предполагая, что они удалены с той же эффективностью.

При работе с сердечной мышечной тканью мы столкнулись с проблемой выбора оптимальных протоколов децеллюляризации для минимизации структурных повреждений внеклеточного матрикса и эффективного удаления клеточного дебриса, что должно приводить к снижению антигенности каркаса. Использование высоких концентраций детергентов приводило к чрезмерному разрушению ткани каркаса, а также

к невозможности адекватной отмывки от него матрикса, что делало его токсичным для стволовых клеток и не пригодным для создания тканеинженерного сердца в итоге. В то же время использование низких концентраций детергентов не позволяло адекватно децеллюляризовать сердечную мышечную ткань.

По сравнению с оригинальным протоколом децеллюляризации (Ott H. et al., 2006) был изменен метод доставки детергентов в сердце, вместо постоянного давления жидкости 75,6 мм. рт. ст. использовали постоянную скорость тока реагентов через коронарные сосуды со скоростью 2,4-3,6 мл/мин, что соответствует физиологической скорости тока крови в нативном сердце. Использованный протокол децеллюляризации отличался от оригинального по составу, времени экспозиции детергентов и энзимов, последовательности их применения (рис. 4.1).



Рис. 4.1 Алгоритм проведения децеллюляризации сердца по различным протоколам:

1.Ott H., Taylor D., inventors; Regents of the University of Minnesota, assignee. Decellularization and recellularization of organs and tissues. US patent 20090202977. 2009 Aug 13.

2.Авторский протокол.

На разных этапах децеллюляризации кардиомиоциты подвергали осмотическому шоку при помощи деионизированной воды, клеточные и внутриклеточные мембраны растворяли детергентом дезоксихолатом натрия и, наконец, ДНК в тканях сердца разрушали ферментативным путем при помощи фермента ДНКазы. Завершали децеллюляризацию обильной перфузией органа фосфатным буферным раствором, позволявшей вымывать из полученного каркаса остатки клеток и внутриклеточных структур.

Всем животным предварительно интраперитонеально вводили антикоагулянт гепарин, чтобы избежать образования тромбов в коронарных сосудах, а после забора органа механически удаляли сгустки крови из камер сердца. Также при проведении перфузии сердца не допускали попадания пузырьков воздуха в трубки с децеллюляризирующими растворами, которые могли бы обтурировать сосуды. В результате время децеллюляризации было сокращено до 28 часов. Применение дезоксихолата натрия вместо додецил сульфата натрия и снижение времени воздействия децеллюляризирующих растворов полностью нивелировало негативные эффекты известных способов того же назначения.

С помощью гистологического анализа тканей, сканирующей электронной микроскопии в нашем исследовании было доказано отсутствие клеток, клеточных ядер в полученном децеллюляризованном матриксе сердца. Сохранность архитектоники позволяла выявлять отличительные гистологические особенности, характерные для сердечной мышцы.

Количественное определение ДНК в тканях сердца, децеллюляризованных по используемому нами протоколу, показало существенное снижение ее содержания. При работе с новым протоколом нам удалось уменьшить содержание ДНК до уровня ниже порогового,

равного 50 нг/мг. Проведенный анализ количественного содержания ДНК продемонстрировал, что ее уровень после децеллюляризации составил $30,10 \pm 13,77$ нг/мг в ткани сердца.

Полученные результаты согласуются с ранее установленными критериями децеллюляризации (Crapo P. M. и др., 2011), которые используют отсутствие клеточных ядер и остаточную концентрацию ДНК на уровне ниже 50 нг/мг ткани в качестве ориентира концентрации других внутриклеточных или мембранных молекул, предполагая, что они удалены с той же эффективностью (Gilbert T. W., 2012).

При качественной оценке состава внеклеточного матрикса сердца большое внимание уделяется сохранности основных структурных белков матрикса, необходимых как для сохранения механических свойств, так и для последующей успешной адгезии и функционирования стволовых клеток в тканеинженерном сердце. Важно также отслеживать удаление молекул-антигенов, способных в будущем индуцировать иммунное отторжение в организме-реципиенте.

Ott и соавт. (2008) изучали наличие в децеллюляризованном матриксе сердца следующих белков – коллагена I, III типа, ламинина, фибронектина, актина, МНС I типа; Wainwright и соавт. (2010) – коллагена I, III, IV типов, гликозаминогликанов, эластических волокон.

Иммуногистохимическое исследование внеклеточного матрикса не показало качественных изменений его состава. Основные структурные белки - коллаген I и IV типов, ламинин, эластин, фибронектин, а также эндотелиальный фактор роста сосудов – VEGF были обнаружены в децеллюляризованном матриксе сердца. Количественный анализ белкового состава внеклеточного матрикса показал, что после децеллюляризации в нем хорошо сохранялись молекулы с высокой молекулярной массой, являющиеся фибриллярными белками, такие как коллаген I типа (300кДа), коллаген IV типа (120-180 кДа), ламинин (850

кДа), эластин (64-66 кДа) и фибронектин (450 кДа) коэффициент соотношения этих белков в ацеллюлярном и нативном матриксах составил 0,75, 0,71, 0,74, 0,71 и 0,23 соответственно. Эндотелиальный фактор роста сосудов VEGF с молекулярной массой 24-53 кДа сохранялся в меньшей степени (коэффициент соотношения – 0,38) и находился в агрегированном состоянии к белкам внеклеточного матрикса.

В то же время молекулы МНС I класса, которые экспрессируются на мембранах всех соматических клеток, маркер эндотелиальных клеток – фактор фон Виллебранда, внутриклеточный сократительный белок тропомиозин и мембранный белок десмин обнаружены не были, что также явилось для нас косвенным свидетельством отсутствия других мембранных и внутриклеточных белков, являющихся антигенами.

Механическое тестирование децеллюляризированного правого желудочка сердца крысы, проведенное Witzenburg и соавт. (2012), показало, что децеллюляризированные ткани имели значительно более высокую жесткость, чем нативные, что, по мнению авторов, свидетельствовало о низком вкладе мышечных клеток в жесткость каркаса, при этом секущий модуль упругости тканеинженерных образцов и контроля отличался значительно.

Полученные данные механического тестирования образцов левого желудочка в нашем исследовании показали, что при различных скоростях испытания форма кривой деформации заметно различается. При скорости 1 мм/мин кривая растяжения имела ярко выраженный s-образный вид, характерный для эластомерных систем (Haward R. N., 1999). При увеличении скорости растяжения время деформации становилось сопоставимым со временем, характерными для релаксационных процессов, происходящих в образце во время испытания и приводящих к перераспределению нагрузки в материале. Именно это и приводит к изменению формы кривой.

Независимо от скорости испытания децеллюляризованные образцы демонстрировали более высокие механические характеристики по сравнению с исходными. Такое различие связано с тем, что децеллюляризованный образец представляет собой набор высокопрочных коллагеновых волокон, в то время как в исходных образцах значительный объем занимают «слабые» клеточные агрегаты. Процесс децеллюляризации «освобождает» волокна коллагена от них, что приводит к частичному коллапсу (стенка сердечной мышцы сокращается примерно на 30% по толщине) и, как следствие, увеличению плотности, что и приводит, в конечном счете, к повышению уровня механических характеристик.

Таким образом, можно констатировать, что при децеллюляризации не происходит разрушения структуры коллагена или, по крайней мере, это невозможно было выявить при данном типе испытаний.

Необходимо отметить также, что полученные результаты не вполне отражали истинную картину и, скорее всего, являются заниженными. Это связано с огромным разбросом экспериментальных данных ввиду различий в характеристиках исходных материалов. Кроме того, сложно достаточно точно определить истинное начальное сечение образцов. Однако это не снижает ценности результатов измерений, так как позволяет оценить влияние процесса децеллюляризации на механические свойства.

Перед началом экспериментов по интравазальной рецеллюляризации каркаса было необходимо оценить проходимость сосудов для растворов, чтобы доказать принципиальную возможность подобного метода рецеллюляризации полученного каркаса. Ott и соавт. (2008) для этой цели использовали красную эпоксидную смолу (red Mercox™ resin), которую вводили интравазально.

Коронарные сосуды в децеллюляризованном каркасе было возможно обнаружить визуально, а при перфузии раствором трипанового

синего сосуда сердца оставались проходимыми вплоть до артерий третьего – четвертого порядка. Большой визуализации не удалось достичь из-за высокой вязкости раствора.

Учитывая результаты морфологического анализа, исследования сосудистой проходимости для растворов, данные механического тестирования децеллюляризированных образцов стало возможным проведение дальнейших экспериментов связанных с рецеллюляризацией полученного каркаса.

Было произведено статичное засеивание матрикса, с последующим выполнением гистологического анализа, МТТ-теста, антиоксидантного теста, так как при данном способе рецеллюляризации было возможно получить необходимые данные без использования большого числа децеллюляризированных сердец и клеток, за меньший промежуток времени.

По результатам проведенных исследований было предположено, что, во-первых, клетки оказались способными прикрепиться к полученному матриксу, во-вторых, каркас не обладает цитотоксическим действием на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки и, в-третьих, клетки остаются жизнеспособными и сохраняют свою метаболическую активность при культивировании на каркасе.

С целью рецеллюляризации каркаса целого органа был применен внутрисосудистый способ введения клеток, в отличие от Ott и соавт. (2008), использовавших как интравазальный способ введения стволовых клеток, так и инъекционный. Отказ от инъекционного метода введения клеток внутрь децеллюляризированного матрикса позволял сохранять его целостность.

Трудностью, возникшей на этом этапе, было то, что оказалось невозможным вводить более 10 миллионов клеток интравазально единовременно: из-за большого объема клеточной суспензии часть клеток

(около 20%) не прикреплялась к каркасу, оставалась в культуральной среде во взвешенном состоянии и погибала. Однако, нивелировать указанные сложности представлялось возможным благодаря медленному введению раствора с клетками в аорту со скоростью около 0,5 мл/мин. В результате клетки не образовывали агрегаты, способные обтурировать просвет коронарных артерий и успешно прикреплялись к матриксу. Для предотвращения гибели клеток от гипоксии (Taylor D. A., 2009) мы проводили дополнительную оксигенацию культуральной среды смесью воздуха (95%) и CO₂ (5%).

Ott и соавт. (2008) для создания тканеинженерного сердца использовали несколько различных клеточных линий: неонатальные кардиомиоциты, фиброциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки), Tung-Ying Lu и соавт. (2013) использовали для этой цели индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека.

Для рецеллюляризации каркаса сердца мы использовали мультипотентные мезенхимальные стромальные стволовые клетки, полученные из красного костного мозга крысы. Выбор этих клеток был обусловлен следующими причинами: 1) простотой получения – требуемое количество клеток наращивали в течение 3-5 пассажей; 2) данные клетки были пригодны для реализации поставленных нами целей рецеллюляризации: оценки цитотоксических свойств матрикса, определения потенциальной возможности децеллюляризованного каркаса управлять дифференцировкой стволовых клеток; 3) методика использования аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток может быть в будущем транслирована в клинику.

В результате длительного культивирования мультипотентных мезенхимальных клеток на каркасе сердца с помощью дифференциального окрашивания живых и мертвых клеток было показано наличие жизнеспособных клеток на каркасе, иммуногистохимическое исследование

подтвердило наличие пролиферативной активности в них. Гистологический анализ тканей, методика трехмерной *in vivo* биолюминесценции живых клеток позволили определить преимущественное паравазальное расположение клеток, что объясняется методом их введения. Тем не менее, клетки были обнаружены во всех камерах органа, что подтвердило принципиальную возможность подобного метода рецеллюляризации.

S. Higuchi и соавт. (2012) изучали эффект воздействия внеклеточного матрикса сердца на кардиальную дифференцировку мышечных эмбриональных стволовых клеток и показали его основополагающую роль в этом процессе. В клетках, засеянных на сердечный внеклеточный матрикс, была обнаружена экспрессия тяжелых цепей миозина и тропонина I – сердечных сократительных белков в отличие от клеток, засеянных на печеночный внеклеточный матрикс. При этом нужно понимать, что эмбриональные стволовые клетки имеют высокую потенцию к дифференцировке. Используемые нами мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки являются стволовыми клетками, имеющимися во взрослом организме в постнатальный период. Однако, несмотря на меньший, чем у эмбриональных стволовых клеток дифференцировочный потенциал, иммуногистохимический анализ рецеллюляризованного сердечного внеклеточного матрикса в нашем исследовании показал потенциальную возможность эндотелиальной и кардиогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, засеянных на децеллюляризованный при помощи модифицированного детергент-энзиматического протокола каркас сердца крысы. Скорее всего, это стало возможным благодаря имеющимся в децеллюляризованном матриксе специфичным факторам роста и дифференцировки клеток, в том числе, и обнаруженному нами эндотелиальному фактору роста сосудов – VEGF.

ВЫВОДЫ

1. Модифицированный протокол децеллюляризации сердца крысы с применением дезоксихолата натрия и ДНКазы позволяет сократить общее время децеллюляризации до 28 часов, что существенно снижает риск бактериальной контаминации, и сохранить структуру внеклеточного матрикса.

2. В децеллюляризованном матриксе сердца отсутствуют неповрежденные клетки и клеточные ядра, внутриклеточный сократительный белок тропомиозин, мембранный белок десмин, МНС I типа (поверхностный маркер всех соматических клеток), фактор фон Виллебранта (маркер эндотелия). Одновременно с этим сохраняются структурные белки внеклеточного матрикса, факторы роста, не обладающие видовой специфичностью и антигенной активностью, такие как коллаген I типа (коэффициент соотношения – 0,75), коллаген IV типа (0,71) ламинин (0,74), эластин (0,71), фибронектин (0,23), VEGF (0,38). Элементы внутриклеточной антиоксидантной системы, ДНК, непосредственно или косвенно подтверждающие присутствие в матриксе молекул-антигенов, отсутствуют либо их уровень достоверно снижен.

3. В ацеллюлярном каркасе сердца сканирующая электронная микроскопия выявляет свойственную нативному органу трехмерную структурную организацию соединительнотканых волокон и сосудистой сети. Прочностные механические характеристики в результате децеллюляризации возрастают в 1,8-1,9 раза в сравнении с исходными в нативном органе.

4. Ретроградное введение в аорту суспензии ММСК в культуральной среде позволяет доставить клетки во все отделы ацеллюлярного сердечного матрикса и представляет собой оптимальный способ рецеллюляризации сердца.

5. Децеллюляризированный сердечный матрикс не является токсичным для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, способствует их адгезии, миграции внутрь, образованию монослоя на поверхности сосудов и внутри камер сердца с сохранением жизнеспособности и метаболической активности при культивировании в течение 3 недель. Он способен индуцировать развитие в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках потенции к эндотелиальной и мышечной клеточной дифференцировке без добавления в культуральную среду специфических ростовых и дифференцировочных факторов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

МНС – major histocompatibility complex

NYHA – New York Heart Association

TGF- β – transforming growth facto

VEGF – vascular endothelial growth factor

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

МТТ – 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтераразол

РАРР-А – ассоциированный с беременностью протеин плазмы А

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Максимов. Лимфоцит как общая стволовая клетка различных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих //Folia Haematologica – 1909. – №8.– С.125-134.
2. Акаимова О. Н., Железнов Л. М., Сеницын В. Е. Структурные особенности венозной системы сердца при хронической сердечной недостаточности //Морфология. – 2010. – Т. 137. – №. 1. – С. 27-30.
3. Ахмедов Ш. Д., Афанасьев С. А. Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4. – №. 2. – С. 32-39.
4. Байкова Ю.П. и др. Пути дифференцировки моноклеарных клеток костного мозга при трансплантации в постинфарктное сердце //Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 3. – С. 140-146.
5. Барбухатти А. О. и др. Первый опыт трансплантации сердца в краснодарском крае //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 14. – №. 3. – С. 42-47.
6. Барбухатти А. О. и др. Трансплантация сердца на кубани: трёхлетний опыт одного центра //Кубанский научный медицинский вестник.– 2013. – №. 7. – С. 11-18.
7. Бокерия Л. А., Шаталов К. В., Колоскова Н. Н. Формирование «листа ожидания» на трансплантацию сердца в кардиохирургической клинике (обзор литературы) //Сердечно-сосудистые заболевания. – 2011. – С. 43-110.
8. Бокерия Л.А., Колоскова Н.Н. Критерии отбора больных для формирования листа ожидания на трансплантацию сердца (обзор литературы). Новости науки и техники. Серия: Медицина. Сердечно-сосудистая хирургия. –2012. – № 1. – С. 31-41.

9. Бухарова Т.В. и др. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8. – №. 4.– С. 61-8.
10. Винник Ю. С. и др. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно не заживающих ран //Вестн Эксперим и Клини Хирургии. – 2011. – Т. 4. – №. 2. – С. 392-97.
11. Галеева Г. Р. Актуальные правовые проблемы современной трансплантологии в России //Медицинское право. – 2009. – №. 4. – С. 21-24.
12. Готье А. В., Хомяков А. М. Обоснование рационального числа центров трансплантации и донорских баз в Российской Федерации, их географии и номенклатуры //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 15. – №. 4. – С. 5-15.
13. Готье С. В., Хомяков С. М. Оценка потребности населения в трансплантации органов, донорского ресурса и планирование эффективной сети центров трансплантации //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2013. – Т. 15. – №. 3. – С. 11-24.
14. Готье С.В., Шевченко А. О., Кормер А. Я., Шевченко А. П. Перспективы улучшения отдаленных результатов трансплантации сердца //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – №. 3. – С. 23-30.
15. Гулай Ю. С. и др. Тканевая инженерия печени (современное состояние проблемы по данным зарубежных источников) //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 16. – №. 2. – С. 103-113.

16. Дземешкевич С. Л., Фролова Ю. В., Раскин В. В. Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца и системный атеросклероз-сходства и различия //Атеросклероз и дислипидемии. – 2014. – №. 3 (16). – С. 16-20.
17. Дядыгк А.И., Багрий А.Е., Самойлова О.В. и др. Хроническая сердечная недостаточность у больных с кардиомиопатиями//Кардиология.– 2008.– №241. – С. 25-37
18. Зайратьянц О. В. Медико-демографические показатели России за столетие (1907-2007 гг.) //Здравоохранение. – 2010. – №. 1. – С. 28-37.
19. Зайратьянц О. В. Инфаркт миокарда и острый коронарный синдром: дефиниции, классификация и критерии диагностики //Арх. пат. – 2014.– Т. 76.– № 6.– С. 3-11.
20. Захаревич В. М. Влияние посттрансплантационных факторов на длительность выживания реципиентов после трансплантации сердца //Вестник трансплант. и искусств. органов. – 2009. – №. 2. – С. 6-16.
21. Зубайдов Р. Н. и др. Хроническая сердечная недостаточность, артериальная гипертония и ремоделирование сердца // Вестник Авиценны. – 2010. – № 2 (43). – С. 71-75.
22. Кактурский Л. В. Первичные (идиопатические) кардиомиопатии //Арх пат. – 2011. – Т. 73. – №. 3. – С.18-20
23. Киршина Н. С., Пименов Л. Т. Этапность развития дисфункции почек и анемии у больных с хронической сердечной недостаточностью //Российский кардиологический журнал. – 2009. – №. 3. – С. 21-25.
24. Климушева Н. Ф., Баранская Л. Т., Шмакова Т. В. Психологическая реабилитация пациентов с трансплантированными органами в послеоперационный период //вестник южно-уральского

- государственного университета. Серия: психология. – 2013. – Т. 6. – №. 4.– С. 99-105.
25. Козиолова Н.А. , Суровцева М.В., Чернявина А.И., Ельцова М.А. Оценка сосудистого ремоделирования у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от выраженности хронической сердечной недостаточности//Сердечная недостаточность.– 2010. – Т.11, № 2(58). – С.83-88
 26. Копылова Ю.В. и др. Острое повреждение почек при трансплантации сердца: факторы риска и показания к заместительной почечной терапии //Нефрология и диализ. –2011.– Т. 13.– № 4.– С. 419-425.
 27. Кормер А.Я. и др. Острое отторжение с нарушением насосной функции пересаженного сердца // Тезисы докладов. IV Всероссийский съезд трансплантологов. 9–10 ноября 2008. Москва. С. 21.
 28. Кормер А.Я. Острое отторжение пересаженного сердца // Трансплантация сердца: Руководство для врачей. Под ред. В.И. Шумакова. М.,– 2006. – С. 211–222.
 29. Космачева Е.Д. и др. Осложнения в послеоперационном периоде у пациентов, перенесших ортотопическую трансплантацию сердца //Клиническая медицина.– 2014.– Т. 92.– № 4.– С. 30-34.
 30. Котина А. Д. и др. Трансплантированное сердце. Правожелудочковая недостаточность, отторжение или миокардит? //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 13. – №. 1. – С. 65-71.
 31. Крылова Н.С., Авдеева Е.В., Потешкина Н.Г. Хроническая сердечная недостаточность у больных гипертрофической кардиомиопатией //Российский кардиологический журнал. –2011.– №2. – С. 26-32.

32. Курапеев Д. И., Анисимов С. В. Тканевая инженерия клапанов сердца: децеллюляризация алло и ксенографтов //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – №. 1.
33. Минасян С.М. и др. Консервация донорского сердца: история и современность с позиции трансляционной медицины //Регионарное кровообращение и микроциркуляция.– 2014.– Т. 13.– № 3 (51).– С. 4-16.
34. Минина А. Г. О некоторых аспектах организации органного донорства //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 12. – №. 3. – С. 81-88.
35. Насрединов А. С. и др. Рецеллюляризация тканеинженерных сосудов в проточном биореакторе //Цитология. – 2014. – Т. 56. – №. 12. – С. 926-932.
36. Островский А. П., Курлянская А. К. Инфекционные осложнения у пациентов, перенесших ортотопическую трансплантацию сердца //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 13. – №. 4. – С. 24-31.
37. Островский Ю.П. и др. Инфекция в структуре заболеваемости и смертности пациентов после ортотопической трансплантации сердца //Кардиология в Беларуси. – 2011. – № 5. – С. 152.
38. Островский Ю.П. и др. Предикторы выживаемости после трансплантации сердца: роль пред и посттрансплантационных факторов //Кардиология.– 2014. – Т. 54. – № 2. – С. 26-30.
39. Пауков В.С. и др. Функциональная морфология ишемической кардиомиопатии //Арх. пат. – 2014. – Т. 76. – № 6. – С. 12-21.
40. Прилуков М.Д. История развития правовой трансплантации в России //Закон и право. – 2012. – № 6. – С. 122-124.

41. Резник Е. В. и др. Хроническая болезнь почек у больных с хронической сердечной недостаточностью (Обзор литературы) //Нефрология и диализ. – 2010. – Т. 12. – №. 1. – С. 13-24.
42. Салютин Р. В. и др. Определение иммунологических показателей качества трансплантата сердца человека донора-трупа // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2013. – №. 4. – С. 83-86.
43. Севастьянов В. И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 16. – №. 3. – С. 93-108
44. Севастьянов В. И., Кирпичникова М. Т. Биосовместимые материалы //М., МИА. – 2011.
45. Сергеевичев Д. С. и др. Морфо-функциональные особенности аортального графта после децеллюляризации //Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2012. – №. 2. – С. 3-6.
46. Ситникова М. Ю., Лясникова Е. А., Трукшина М. А. Хроническая сердечная недостаточность: эпидемиология и перспективы планирования //Сердечная недостаточность. – 2012. – Т. 13. – №. 6. – С. 372-376.
47. Соломакина Н. И. Сердечная и внесердечная коморбидность у больных систолической и диастолической ХСН пожилого и старческого возраста //Журн. сердечная недостаточность. – 2009. – №. 6. – Т. 10. – С. 298-303.
48. Суджаева О.А. и др. Отбор пациентов для трансплантации сердца с учетом вероятности развития летального исхода //Кардиология в Беларуси. – 2014. – № 5 (36). – С. 40-59.
49. Терских В.В. Структурно-функциональные единицы эпидермиса //Известия РАН. Серия биологическая. – 2003. – №. 6. – С. 645-649.

50. Фролова Э.Б., Яушев М.Ф. Современное представление о хронической сердечной недостаточности//Вестник современной клинической медицины – 2013. – Т. 6. – №. 2. – С. 87-93.
51. Хубутия М. Ш. и др. Современные подходы к отбору больных для трансплантации сердца //Трансплантология. – 2010. – № 3-4. – С. 50-64.
52. Шевченко А. П., Кормер А. Я., МIRONKOV А. Л. Ассоциированный с беременностью протеин плазмы а (PAPP-A) при васкулопатии трансплантированного сердца //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 13. – №. 2. – С. 46-51.
53. Шемакин А. Ю. и др. Особенности клинических проявлений острой реакции отторжения пересаженного сердца //Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 12. – №. 1. – С. 7-16.
54. Шилов А. В. и др. Случай криза отторжения после ортотопической трансплантации сердца //Вятский медицинский вестник. – 2013. – С. 37-39.
55. Шумаков В. И. и др. Отторжение трансплантированного сердца //М.: Реафарм.– 2005. – С. 65-90
56. Abràmoff M. D., Magalhães P. J., Ram S. J. Image processing with ImageJ //Biophotonics international. – 2004. – Vol. 11. – №. 7. – P. 36-42.
57. Alison M. R. Liver stem cells //Stem cell reviews. – 2005. – Vol. 1. – №. 3. – P. 253-260.
58. Álvarez D., Levine M., Rojas M. Regenerative medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: current position //Stem cells and cloning: advances and applications. – 2015. – Vol. 8. – P. 61.

59. Allou N. et al. Postoperative pneumonia following cardiac surgery in non-ventilated patients versus mechanically ventilated patients: is there any difference? //Critical Care. – 2015. – Vol. 19. – №. 1. – P. 116.
60. Assmus B. et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI) //Circulation. – 2002. – Vol. 106. – №. 24. – P. 3009-3017.
61. Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends. – 2005.
62. Badylak S. et al. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model //Journal of pediatric surgery. – 2000. – Vol. 35. – №. 7. – P. 1097-1103.
63. Badylak S. F. et al. Biologic scaffolds for constructive tissue remodeling //Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – №. 1. – P. 316-319.
64. Badylak S. F. et al. Comparison of the resistance to infection of intestinal submucosa arterial autografts versus polytetrafluoroethylene arterial prostheses in a dog model //Journal of vascular surgery. – 1994. – Vol. 19. – №. 3. – P. 465-472.
65. Badylak S. F. et al. Host protection against deliberate bacterial contamination of an extracellular matrix bioscaffold versus Dacron™ mesh in a dog model of orthopedic soft tissue repair //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2003. – Vol. 67. – №. 1. – P. 648-654.
66. Badylak S. F. et al. Marrow-derived cells populate scaffolds composed of xenogeneic extracellular matrix //Experimental hematology. – 2001. – Vol. 29. – №. 11. – P. 1310-1318.
67. Badylak S. F. et al. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achille's tendon repair in a dog model //Journal of biomedical materials research. – 1995. – Vol. 29. – №. 8. – P. 977-985.

68. Badylak S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material //Biomaterials. – 2007. – Vol. 28. – №. 25. – P. 3587-3593.
69. Badylak S. F., Freytes D. O., Gilbert T. W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function //Acta biomaterialia. – 2009. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1-13.
70. Badylak S. F., Taylor D., Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds //Annual review of biomedical engineering. – 2011. – Vol. 13. – P. 27-53.
71. Balsam L., Robbins R. Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart //Clinical Science. – 2005. – Vol. 109. – P. 483-492.
72. Barash Y. et al. Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering //Tissue Engineering Part C: Methods. – 2010. – Vol. 16. – №. 6. – P. 1417-1426.
73. Berger T. W. et al. International Assessment of Research and Development in Brain-Computer Interfaces. WTEC Panel Report. – World technology evaluation center inc baltimore MD, 2007.
74. Bernard M. P. et al. Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro. alpha. 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution //Biochemistry. – 1983. – Vol. 22. – №. 22. – P. 5213-5223.
75. Bernard M. P. et al. Structure of a cDNA for the pro. alpha. 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro. alpha. 2 (I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene //Biochemistry. – 1983. – Vol. 22. – №. 5. – P. 1139-1145.
76. Bissell M. J., Aggeler J. Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression? //Progress in clinical and biological research. – 1986. – Vol. 249. – P. 251-262.

77. Bittner R. E. et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice //Anatomy and embryology. – 1999. – T. 199. – №. 5. – C. 391-396.
78. Bonner-Weir S., Sharma A. Pancreatic stem cells //The Journal of pathology. – 2002. – Vol. 197. – №. 4. – P. 519-526.
79. Bonvillain R. W. et al. A nonhuman primate model of lung regeneration: detergent-mediated decellularization and initial in vitro recellularization with mesenchymal stem cells //Tissue Engineering Part A. – 2012. – Vol. 18. – №. 23-24. – P. 2437-2452.
80. Boruch A. V. et al. Constructive remodeling of biologic scaffolds is dependent on early exposure to physiologic bladder filling in a canine partial cystectomy model //Journal of Surgical Research. – 2010. – Vol. 161. – №. 2. – P. 217-225.
81. Brennan E. P. et al. Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix //Tissue engineering. – 2006. – Vol. 12. – №. 10. – P. 2949-2955.
82. Brown B. et al. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix //Tissue engineering. – 2006. – Vol. 12. – №. 3. – P. 519-526.
83. Brown M. A., Iyer R. K., Radisic M. Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering //Biotechnology progress. – 2008. – Vol. 24. – №. 4. – P. 907-920.
84. Caimi P. F. et al. Emerging Therapeutic Approaches For Multipotent Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) //Current opinion in hematology. – 2010. – Vol. 17. – №. 6. – P. 505.
85. Chan V. et al. Fabrication and characterization of optogenetic, multi-strip cardiac muscles //Lab on a Chip. – 2015. – Vol. 15. – №. 10. – P. 2258-2268.

86. Chanda D., Kumar S., Ponnazhagan S. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton //Journal of cellular biochemistry. – 2010. – Vol. 111. – №. 2. – P. 249-257.
87. Clemmensen T. S. et al. Changes in Longitudinal Myocardial Deformation during Acute Cardiac Rejection: The Clinical Role of Two-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography //Journal of the American Society of Echocardiography. – 2015. – Vol. 28. – №. 3. – P. 330-339.
88. Coraux C. et al. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells //Current Biology. – 2003. – Vol. 13. – №. 10. – P. 849-853.
89. Davani S. et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model //Circulation. – 2003. – Vol. 108. – №. 10 suppl 1. – P. II-253-II-258.
90. de Peppo G. M. et al. Osteogenic potential of human mesenchymal stem cells and human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors: a tissue engineering perspective //Tissue Engineering Part A. – 2010. – Vol. 16. – №. 11. – P. 3413-3426.
91. Dejardin L. M. et al. Tissue-engineered rotator cuff tendon using porcine small intestine submucosa histologic and mechanical evaluation in dogs //The American journal of sports medicine. – 2001. – Vol. 29. – №. 2. – P. 175-184.
92. Doenst T. et al. Cardiac surgery 2014 reviewed //Clinical Research in Cardiology. – 2015. – P. 1-15.
93. Dong J., Li Y., Mo X. The study of a new detergent (octyl-glucopyranoside) for decellularizing porcine pericardium as tissue engineering scaffold //Journal of Surgical Research. – 2013. – Vol. 183. – №. 1. – P. 56-67

94. Evseenko D. et al. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107. – №. 31. – P. 13742-13747.
95. Exposito J. Y. et al. Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2 (I) collagen //Journal of Biological Chemistry. – 1992. – Vol. 267. – №. 22. – P. 15559-15562.
96. Ferrero P. et al. Prognostic scores in heart failure—Critical appraisal and practical use //International Journal of Cardiology. – 2015. – Vol. 188. – P. 1-9.
97. Frank R. et al. Correlations of lymphocyte subset infiltrates with donor-specific antibodies and acute antibody-mediated rejection in endomyocardial biopsies //Cardiovascular Pathology. – 2015. – Vol. 24. – №. 3. – P. 168-172.
98. Fuchs J. R., Nasser B. A., Vacanti J. P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction //The Annals of thoracic surgery. – 2001. – Vol. 72. – №. 2. – P. 577-591.
99. Gass A. L. et al. Cardiac Transplantation in the New Era //Cardiology in review. – 2015.
100. Gilbert T. W. et al. Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix //Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – №. 36. – P. 4775-4782.
101. Gilbert T. W. et al. Degradation and remodeling of small intestinal submucosa in canine Achilles tendon repair //The Journal of Bone & Joint Surgery. – 2007. – Vol. 89. – №. 3. – P. 621-630.
102. Gilbert T. W. et al. Repair of the thoracic wall with an extracellular matrix scaffold in a canine model //Journal of Surgical Research. – 2008. – Vol. 147. – №. 1. – P. 61-67.

103. Gilbert T. W. Strategies for tissue and organ decellularization //Journal of cellular biochemistry. – 2012. – Vol. 113. – №. 7. – P. 2217-2222.
104. Gilpin S. E. et al. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: Bringing the matrix to clinical scale //The Journal of Heart and Lung Transplantation. – 2014. – Vol. 33. – №. 3. – P. 298-308.
105. Gojo S. et al. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells //Experimental cell research. – 2003. – Vol. 288. – №. 1. – P. 51-59.
106. Grefrath S. P., Reynolds J. A. The molecular weight of the major glycoprotein from the human erythrocyte membrane //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1974. – Vol. 71. – №. 10. – P. 3913-3916.
107. Grompe M. Bone marrow-derived hepatocytes //Novartis Found Symp. – 2005. – Vol. 265. – P. 20-27.
108. Gustafsson Y. et al. Viability and proliferation of rat MSCs on adhesion protein-modified PET and PU scaffolds //Biomaterials. – 2012. – Vol. 33. – №. 32. – P. 8094-8103.
109. Heng B. C. et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro //Cardiovascular research. – 2004. – Vol. 62. – №. 1. – P. 34-42.
110. Hiles M. C. An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS Wound Matrix //J Wound Care. – 2005. – Vol. 14. – P. 23.
111. Hill J. M. et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk //New England Journal of Medicine. – 2003. – Vol. 348. – №. 7. – P. 593-600.
112. Hodde J. et al. Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix //Biomaterials. – 2002. – Vol. 23. – №. 8. – P. 1841-1848.

113. Hodde J. P. et al. Retention of endothelial cell adherence to porcine-derived extracellular matrix after disinfection and sterilization //Tissue engineering. – 2002. – Vol. 8. – №. 2. – P. 225-234.
114. Hodde J. P. et al. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix //Endothelium. – 2001. – Vol . 8. – №. 1. – P. 11-24.
115. Hollenberg S. M. et al. Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death //Circulation. – 2001. – Vol. 104. – №. 25. – P. 3091-3096.
116. Howard P. A. Treating Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Challenge for Clinicians //Hospital Pharmacy. – 2015. – Vol. 50. – №. 6. – P. 454-459.
117. Hoshiba T. et al. Decellularized matrices for tissue engineering //Expert opinion on biological therapy. – 2010. – Vol. 10. – №. 12. – P. 1717-1728.
118. Hrebikova H. et al. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. //Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. – 2013.– Vol 159(1).–P. 12-7.
119. Hurd S. A. et al. Development of a biological scaffold engineered using the extracellular matrix secreted by skeletal muscle cells //Biomaterials. – 2015. – Vol. 49. – P. 9-17.
120. Imamura T. et al. Late Rejection Occurred in Recipients Who Experienced Acute Cellular Rejection Within the First Year After Heart Transplantation //International heart journal. – 2015. – №. 0.
121. Jezierska-Woźniak K. et al. [Use of adipose tissue as a source of mesenchymal stem cells] //Postepy higieny i medycyny doswiadczałnej (Online). – 2009. – Vol. 64. – P. 326-332.
122. Jungebluth P. et al. Verification of cell viability in bioengineered tissues and organs before clinical transplantation //Biomaterials. – 2013. – Vol. 34. – №. 16. – P. 4057-4067.

123. Kawasaki T. et al. Novel detergent for whole organ tissue engineering //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2015.
124. Keane T. J., Swinehart I. T., Badylak S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance //Methods. – 2015.
125. Kellar C. A. Solid organ transplantation overview and delection Criteria //The American journal of managed care. – 2015. – Vol. 21. – №. 1 Suppl. – P. 4-11.
126. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine //Genes & development. – 2005. – Vol. 19. – №. 10. – P. 1129-1155.
127. Kleinman, H.K., Philp, D., and Hoffman, M.P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis //Current opinion in biotechnology. – 2003. – Vol. 14. – №. 5. – P. 526-532.
128. Krause D. S. Bone marrow–derived cells and stem cells in lung repair //Proceedings of the American Thoracic Society. – 2008. – Vol. 5. – №. 3. – P. 323-327.
129. Krejčí J. Interaction of mixture of anionic surfactants with collagen //International journal of cosmetic science. – 2007. – Vol. 29. – №. 2. – P. 121-129.
130. Lamprecht M. R. et al. CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis //Biotechniques. – 2007. – Vol. 42. – №. 1. – P. 71.
131. Landini G., Othman I. E. Estimation of tissue layer level by sequential morphological reconstruction //Journal of Microscopy. – 2003. – Vol. 209. – №. 2. – P. 118-125.
132. Lee K. M. et al. Natural Cardiac Extracellular Matrix Sheet as a Biomaterial for Cardiomyocyte Transplantation //Transplantation Proceedings. – Elsevier, 2015. – Vol. 47. – №. 3. – P. 751-756.

133. Lees J. G. et al. Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential. – 2007. – Vol. 2. – №. 3. – P. 289-300
134. Li F. et al. Low-molecular-weight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells //Endothelium. – 2004. – Vol. 11. – №. 3-4. – P. 199-206.
135. Li Y. et al. Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering //The Scientific World Journal. – 2015. – Vol. 2015. – P.1-10.
136. Lim M. L. et al. Whole Organ and Tissue Reconstruction in Thoracic Regenerative Surgery //Mayo Clinic Proceedings. – Elsevier, 2013. – Vol. 88. – №. 10. – P. 1151-1166.
137. Losordo D. W., Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease part II: Cell-based therapies //Circulation. – 2004. – Vol. 109. – №. 22. – P. 2692-2697.
138. Lu T. Y. et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells //Nature communications. – 2013. – Vol. 4. – P. 2307
139. Macchiarini P. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway //The Lancet. – 2008. – Vol. 372. – №. 9655. – P. 2023-2030.
140. MacLeod T. M. et al. Evaluation of a porcine origin acellular dermal matrix and small intestinal submucosa as dermal replacements in preventing secondary skin graft contraction //Burns. – 2004. – Vol. 30. – №. 5. – P. 431-437.
141. Makino S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro //Journal of Clinical Investigation. – 1999. – Vol. 103. – №. 5. – P. 697.

142. Malmsten M., Davoudi M., Schmidtchen A. Bacterial killing by heparin-binding peptides from PRELP and thrombospondin //Matrix biology. – 2006. – Vol. 25. – №. 5. – P. 294-300.
143. Mangi A. A. et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts //Nature medicine. – 2003. – Vol. 9. – №. 9. – P. 1195-1201.
144. Martin G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1981. – Vol. 78. – №. 12. – P. 7634-7638.
145. Martin G. R., Evans M. J. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1975. – Vol. 72. – №. 4. – P. 1441-1445.
146. McDevitt C. A., Wildey G. M., Cutrone R. M. Transforming growth factor- β 1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2003. – Vol. 67. – №. 2. – P. 637-640.
147. Medberry C. J. et al. Resistance to infection of five different materials in a rat body wall model //Journal of Surgical Research. – 2012. – Vol. 173. – №. 1. – P. 38-44.
148. Momtahan N. et al. Strategies and processes to decellularize and recellularize hearts to generate functional organs and reduce the risk of thrombosis //Tissue Engineering Part B: Reviews. – 2014. – Vol. 21. – №. 1. – P. 115-132
149. Montoya C. V., McFetridge P. S. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization //Tissue Engineering Part C: Methods. – 2009. – Vol. 15. – №. 2. – P. 191-200.

150. Murry C. E., Field L. J., Menasché P. Cell-based cardiac repair reflections at the 10-year point //Circulation. – 2005. – Vol. 112. – №. 20. – P. 3174-3183.
151. Murphy S. V., Atala A. Organ engineering—combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation //Bioessays. – 2013. – Vol. 35. – №. 3. – P. 163-172.
152. Ng S. L. J. et al. Lineage restricted progenitors for the repopulation of decellularized heart //Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – №. 30. – P. 7571-7580.
153. Nussbaum J. et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response //The FASEB Journal. – 2007. – Vol. 21. – №. 7. – P. 1345-1357.
154. Ofenbauer A. et al. Dewaxed ECM: A simple method for analyzing cell behaviour on decellularized extracellular matrices //Journal of tissue engineering and regenerative medicine. – 2012.
155. Omae H. et al. Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering //Journal of Orthopaedic Research. – 2009. – Vol. 27. – №. 7. – P. 937-942.
156. Orberg J. W., Klein L., Hiltner A. Scanning electron microscopy of collagen fibers in intestine //Connective tissue research. – 1982. – Vol. 9. – №. 3. – P. 187-193.
157. Orberg J., Baer E., Hiltner A. Organization of collagen fibers in the intestine //Connective tissue research. – 1983. – Vol. 11. – №. 4. – P. 285-297.
158. Orlic D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium //Nature. – 2001. – Vol. 410. – №. 6829. – P. 701-705.
159. Ott H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart //Nature medicine. – 2008. – Vol. 14. – №. 2. – P. 213-221.

160. Ott H., Taylor D. Decellularization and recellularization of organs and tissues : заяв. пат. 12/064,613 США. – 2006.
161. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms //Automatica. – 1975. – Vol. 11. – №. 285-296. – P. 23-27.
162. Ozeki M. et al. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2006. – Vol. 79. – №. 4. – P. 771-778.
163. Page K. et al. A systematic approach to chronic heart failure care: a consensus statement //Med J Aust. – 2014. – Vol. 201. – №. 3. – P. 146-150.
164. Parmacek M. S. Cardiac stem cells and progenitors: developmental biology and therapeutic challenges //Transactions of the American Clinical and Climatological Association. – 2006. – Vol. 117. – P. 239.
165. Patel J. K., Kobashigawa J. A. Should we be doing routine biopsy after heart transplantation in a new era of anti-rejection? //Current opinion in cardiology. – 2006. – Vol. 21. – №. 2. – P. 127-131.
166. Patel J. et al. Extracorporeal photopheresis in heart transplant rejection //Transfusion and Apheresis Science. – 2015. – Vol. – №. 2. – P. 167–170
167. Petersen B. E. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells //Science. – 1999. – Vol. 284. – №. 5417. – P. 1168-1170.
168. Pittenger M. F., Martin B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics //Circulation research. – 2004. – Vol. 95. – №. 1. – P. 9-20.
169. Radisic M. et al. Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: oxygen carriers and channeled scaffolds //Tissue engineering. – 2006. – Vol. 12. – №. 8. – P. 2077-2091.
170. Radisic M. et al. Biomimetic approach to cardiac tissue engineering //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2007. – Vol. 362. – №. 1484. – P. 1357-1368.

171. Radisic M. et al. Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue //Biotechnology and bioengineering. – 2006. – Vol. 93. – №. 2. – P. 332-343.
172. Rao M. S. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells //Stem cells and development. – 2004. – Vol. 13. – №. 5. – P. 452-455.
173. Reyes M. et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells //Blood. – 2001. – Vol. 98. – №. 9. – P. 2615-2625.
174. Ringe J. et al. Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering //Journal of tissue engineering and regenerative medicine. – 2008. – Vol. 2. – №. 2-3. – P. 136-146.
175. Ritchey M. L., Ribbeck M. Successful use of tunica vaginalis grafts for treatment of severe penile chordee in children //The Journal of urology. – 2003. – Vol. 170. – №. 4. – P. 1574-1576.
176. Rosso F. et al. From cell–ECM interactions to tissue engineering //Journal of cellular physiology. – 2004. – Vol. 199. – №. 2. – P. 174-180.
177. Ruifrok A. C., Johnston D. A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution //Analytical and quantitative cytology and histology/the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology. – 2001. – V. 23. – №. 4. – P. 291-299.
178. Sacks M. S., Gloeckner D. C. Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of porcine intestinal submucosa //Journal of biomedical materials research. – 1999. – Vol. 46. – №. 1. – P. 1-10.
179. Sarikaya A. et al. Antimicrobial activity associated with extracellular matrices //Tissue engineering. – 2002. – Vol. 8. – №. 1. – P. 63-71.
180. Sawada R. et al. Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells //Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects. – Springer Netherlands. – 2006. – Vol. 14. – P. 325-329.

181. Saxena A. K. et al. Tissue engineering: Present concepts and strategies //Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons. – 2005. – Vol. 10. – №. 1. – P. 14.
182. Scarritt M. E., Pashos N. C., Bunnell B. A. A Review of Cellularization Strategies for Tissue Engineering of Whole Organs //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2015. – Vol. 3. – P. 43.
183. Schmauss D., Weis M. Cardiac Allograft Vasculopathy Recent Developments //Circulation. – 2008. – Vol. 117. – №. 16. – P. 2131-2141.
184. Sehgal S. et al. Strain and strain rate imaging using speckle tracking in acute allograft rejection in children with heart transplantation //Pediatric Transplantation. – 2015. – Vol. 19. – №. 2. – P. 188-195.
185. Sellaro T. L. et al. Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds //Tissue engineering. – 2007. – Vol. 13. – №. 9. – P. 2301-2310.
186. Shi Q. et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells //Blood. – 1998. – Vol. 92. – №. 2. – P. 362-367.
187. Shim W. S. N. et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells //Biochemical and biophysical research communications. – 2004. – Vol. 324. – №. 2. – P. 481-488.
188. Syed O. et al. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering //Acta biomaterialia. – 2014. – Vol. 10. – №. 12. – P. 5043-5054.
189. Taylor D. A. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs //Current opinion in biotechnology. – 2009. – Vol. 20. – №. 5. – P. 598-605.
190. Tkalcic M. et al. Colour spaces: perceptual, historical and applicational background //Eurocon. – 2003. – P. 304-308.

191. Toma C. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart //circulation. – 2002. – Vol. 105. – №. 1. – P. 93-98.
192. Vacanti J. P., Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation //The Lancet. – 1999. – Vol. 354. – P. S32-S34.
193. Vasa M. et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease //Circulation research. – 2001. – Vol. 89. – №. 1. – P. 1-7.
194. Vinci M. C. et al. Mechanical compliance and immunological compatibility of fixative-free decellularized/cryopreserved human pericardium //PloS one. – 2013. – Vol. 8. – №. 5. – P. 64769.
195. Vitinius F., Ziemke M., Albert W. Adherence with immunosuppression in heart transplant recipients //Current opinion in organ transplantation. – 2015. – Vol. 20. – №. 2. – P. 193-197.
196. Voytik-Harbin S. L. et al. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa //Journal of cellular biochemistry. – 1997. – Vol. 67. – №. 4. – P. 478-491.
197. Wang B. et al. Structural and biomechanical characterizations of porcine myocardial extracellular matrix //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2012. – Vol. 23. – №. 8. – P. 1835-1847.
198. Wang H. et al. Decellularization technology in CNS tissue repair //Expert review of neurotherapeutics. – 2015. – №. 0. – P. 1-8.
199. Wang J. S. et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: the importance of microenvironment for milieu dependent differentiation //Circulation. – 530 Walnut st, Philadelphia, PA 19106-3621 USA : Lippincott Williams & Wilkins, 2000. – Vol. 102. – №. 18. – P. 683-683.

200. Wainwright D. J. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns //Burns. – 1995. – Vol. 21. – №. 4. – P. 243-248.
201. Wainwright J. M. et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart //Tissue Engineering Part C: Methods. – 2009. – Vol. 16. – №. 3. – P. 525-532.
202. Weissman I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution //cell. – 2000. – Vol. 100. – №. 1. – P. 157-168.
203. Zantop T. et al. Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction //Journal of orthopaedic research. – 2006. – Vol. 24. – №. 6. – P. 1299-1309.
204. Zimmermann W. H. et al. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts //Nature medicine. – 2006. – Vol. 12. – №. 4. – P. 452-458.
205. Zou Y., Zhang Y. Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta //Journal of Surgical Research. – 2012. – Vol. 175. – №. 2. – P. 359-368.