

**На правах рукописи**

**СОТНИЧЕНКО АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ**

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

**03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Краснодар – 2016**

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук профессор

**Славинский Александр Александрович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук

зав. лабораторией регенеративной медицины ФГБУ "НЦАГиП им.

В.И. Кулакова" МЗРФ

**Фатхудинов Тимур Хайсамудинович**

кандидат медицинских наук

с.н.с. лаборатории клеточной биологии ФГБНУ «Научно-

исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.

Ореховича»

**Вахрушев Игорь Викторович**

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского»

**Защита** диссертации состоится " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.004.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д.3.

С диссертацией можно ознакомиться

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук

**Л.П. Михайлова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** 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).

Трансплантация сердца – хирургический способ лечения терминальной стадии ХСН (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; Барбухатти К.О. и соавт., 2012; 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 (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 консервации 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; 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). 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 морфологических исследований, направленных на всестороннее изучение структур получаемых каркасов. Перспективы применения децеллюляризированных 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 децеллюляризированного органа для использования в тканевой инженерии (Ott H.C. et al., 2008; Срапо Р. М et al., 2011; Gilbert T.W. et al., 2011). Морфологическая 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.

### **Задачи исследования:**

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**

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.

**Внедрение результатов исследования.** 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.

### **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 децеллюляризованный 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, рецеллюляризованный стволовыми клетками, может быть потенциальной основой для создания тканеинженерного сердца.

**Апробация работы.** 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 молодежи 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).

**Публикации.** Результаты исследования опубликованы в 15 научных работах, 5 из них в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Получен 1 патент РФ на изобретение.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 124 машинописных страницах, содержит 5 таблиц, 24 рисунка. Работа состоит из введения, 4 глав, выводов, указателя использованной литературы и приложений. Библиография включает 205 источников из них 55 на русском языке и 150 – на иностранных языках.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе использовали 60 взрослых крыс-самцов линии Lewis весом  $180 \pm 16$  г. Децеллюляризации была отработана на 20 сердцах, для экспериментов по рецеллюляризации использовали сердца 20 крыс. 20 крыс составили группу нативного контроля.

*Гистологическое исследование.* Препараты нативных и децеллюляризованных сердец окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизон, флуорохромировали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI).

*Сканирующая электронная микроскопия.* Для оценки ультраструктуры децеллюляризованных и рецеллюляризованных сердечных матриц применяли метод сканирующей электронной микроскопии. Исследование проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM6490, JEOL (Япония).

*Иммуногистохимическое исследование* включало в себя изучение качественного состава нативных, ацеллюлярных и заселенных образцов с оценкой локализации и количественного содержания белков внеклеточного матрикса, внутриклеточных и мембранно-ассоциированных молекул. Использовали моноклональные антитела фирмы Abscam (Англия) к коллагену I типа (ab34710), коллагену типа IV (ab6586), ламинину (ab11575), эластину (ab21610), фибронектину (ab6328), тропомиозину (ab133292), десмину (ab15200), актину (ab3280), VEGF (ab46154), Ki-67 (ab16667), МНС I типа (ab22367), коннексину-43 (ab11370), фактору фон Виллебранта (ab46154). Изучение микропрепаратов проводили на микроскопе Olympus IX51 (Япония).



Для количественной оценки содержания ДНК в нативных и децеллюляризованных органах (n=5) на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) были использованы стандартные наборы реактивов (DneasyBlood and Tissue Kit, Qiagen, Sweden) по стандартным протоколам.

Исследование проходимости для растворов сосудистого русла в децеллюляризованном сердце проводили путем ретроградной перфузии 0,4% раствора трипанового синего (Gibco, Англия) через аорту в коронарные сосуды.

*Механическое тестирование образцов.* Сравнительные биомеханические тесты образцов проводили на универсальных испытательных машинах фирмы Инстрон модель 5965 (датчик 50 Н) и на Lloyd LRX (100 N load cell). Использовали фрагменты левого желудочка и перегородки сердца децеллюляризованных и нативных сердец размером  $8 \pm 1 \times 20 \pm 2$  мм, ориентированные поперечно относительно продольной оси сердца. По результатам испытаний были определены предельная прочность, деформация при предельной прочности и модуль Юнга. Статистическую выборку осуществляли при скорости 1 мм/мин по 5 образцам, при скорости 10 мм/мин по 3 образцам.

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.

*Статичную рецеллюляризацию матриксов* (n=15) производили в 96-луночном планшете путем помещения клеток в количестве 20000 на стерильные образцы матрикса диаметром 6 миллиметров при помощи пипеттора.

*Оценка жизнеспособности ММСК* на децеллюляризованном каркасе сердца заключалась в проведении колориметрического

анализа с 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетраразолом – МТТ-теста (Cell Proliferation Kit I, Roche, Австралия), антиоксидантного теста ABEL<sup>®</sup> с фолазином (Pholasin<sup>®</sup>) и пероксинитритом (Microplate Test Kit ABEL-41M2, Knight Scientific Ltd, UK), дифференциального окрашивания живых и мертвых клеток с использованием набора LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США) по стандартным протоколам.

Для выявления локализации жизнеспособных клеток в рецеллюляризованном сердце был применен метод оценки *in vivo* биолюминесценции клеток с использованием IVIS spectrum Imaging System (Perkin-Elmer, США). По окончании рецеллюляризации сердца в аорту было введено 0,5 мл D-люциферина в концентрации 9 мг/мл в стерильном фосфатном буфере. Изображения получали каждые 30 секунд. Анализ проведен с использованием Living Image Software (Perkin-Elmer, США).

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 – «р», 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).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ СЕРДЦА КРЫСЫ**

Создание децеллюляризованных внеклеточных матриц и выявление их морфологических, механических и цитотоксических свойств необходимо для создания тканеинженерных органов. Для проведения децеллюляризации сердца нами был модифицирован

детергент-энзиматический метод, который позволял наиболее полным образом удалять клетки из тканей, но в то же время был щадящим по отношению к белкам волокон внеклеточного матрикса сердца, отличавшийся тем, что антикоагулянт гепарин вводили крысе интраперитонеально в дозе 100 ЕД перед забором органокомплекса сердце-легкие, аорту канюлировали выше уровня отхождения левой подключичной артерии с последующим лигированием ветвей дуги аорты, осуществляли лигирование устья полых вен, отсекали легкие, перфузию для децеллюляризации осуществляли через аорту при атмосферном давлении и скорости потока реагентов через орган 2,4-3,6 мл/минуту, при этом перфузию фосфатным буфером с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина и деионизированной водой проводили по 1,5 часа, затем использовали 4% раствор дезоксихолата натрия в комбинации с 0,002М Na<sub>2</sub>-ЭДТА в течение 3,5 часов, фосфатный буфер с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина - в течение 1 часа, свиную панкреатическую ДНКазу-I 2000 ЕД /200 мл фосфатного буфера с кальцием и магнием - 2,5 часов и завершали децеллюляризацию фосфатным буфером с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина со сменой раствора каждые 6 часов.

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. Общее время проведения децеллюляризации сердца крысы было сокращено со 152 до 28 часов, что позволило существенно снизить риск бактериальной контаминации получаемого сердечного матрикса.

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 ускорило 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.

### **СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА**

#### **ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО СЕРДЦА КРЫСЫ**

Оценку качества децеллюляризации сердца крысы проводили согласно разработанному алгоритму, включающему в себя проведение патогистологического 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 засеянным на него стволовым клеткам

Окраска гематоксилином и эозином препаратов нативного сердца выявила продольно расположенные кардиомиоциты с периферически расположенными клеточными ядрами, межмышечную рыхлую соединительную ткань, многочисленные сосуды и капилляры. В препаратах децеллюляризованных сердец интактные мышечные клетки и клеточные ядра не выявлялись, однако визуализировались тончайшие, рыхло расположенные эозинофильные волокна внеклеточного матрикса сердца, которые в нативном органе окружают кардиомиоциты со всех сторон, формируя строму органа.

Окраска пикрофуксином по Ван Гизон, тропная к соединительнотканным 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. В децеллюляризированной ткани внеклеточный матрикс, состоящий преимущественно из коллагена, оставался неизменным. Оставались сохранными упорядоченная структура и преимущественно параллельное расположение коллагеновых волокон в матриксе. Отчетливо визуализировали неизменные базальные мембраны сосудов как мелкого, так и крупного калибра. Набухания либо иных патологических изменений структуры, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было.

При флуорохромировании DAPI клеточные ядра в нативном сердце активно флуоресцировали и были выявлены в большом количестве. В децеллюляризированных образцах обнаружили лишь незначительную аутофлуоресценцию волокон внеклеточного матрикса.

При сканирующей электронной микроскопии в образцах нативных тканей хорошо визуализировалась структура миокарда, отмечено наличие продольно ориентированных мышечных клеток, клеток и межклеточного вещества. В децеллюляризированных органах при сохранности пористой структуры внеклеточного матрикса клетки не обнаружены. Выявлены взаимопереплетенные, ветвящиеся сети волокон внеклеточного матрикса диаметром до 60 - 100 нм. Расстояние между отдельными волокнами достигало 300 - 400 нм.

Количественный анализ содержания ДНК показал, что в процессе децеллюляризации сердца было удалено около 81% ДНК ( $30,10 \pm 13,77$  нг/мг в децеллюляризированном сердце по сравнению с  $153,27 \pm 30,38$  нг/мг – в нативном). Это свидетельствовало о том, что матрикс децеллюляризированного сердца (после 1 цикла обработки детергентно - энзиматическим методом) был в значительной степени ( $p < 0,05$ ) очищен от ДНК.

Полученные результаты согласуются с ранее установленными критериями децеллюляризации (Сгаро Р. М. et al., 2011), которые используют отсутствие видимого ядерного материала в срезах ткани, окрашенных 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) или гематоксилином и эозином 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 проведении иммуногистохимического анализа в нативных сердцах крысы выявлены белки внеклеточного матрикса, такие как коллаген I типа, коллаген IV типа, ламинин, эластин, фибронектин. Указанные белки в нативной ткани преимущественно локализовались вдоль мышечных клеток в составе эндомизия и перимизия, а также в базальных мембранах коронарных сосудов. Эндотелиальный фактор роста сосудов – VEGF в нативном сердце выявляли как внутри, так и вне мышечных клеток во внеклеточном матриксе. В кардиомиоцитах также определяли внутриклеточные сократительные белки – тропомиозин и десмин. На мембранах кардиомиоцитов 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. В децеллюляризированной ткани сердца крысы сохранялась исходная локализация белков внеклеточного матрикса: коллагена I типа, коллагена IV типа, ламинина, эластина, фибронектина. Эндотелиальный фактор роста сосудов – VEGF выявляли в агрегированном к коллагеновым волокнам состоянии. Внутриклеточные сократительные белки десмин и тубулин, 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.

Морфометрический анализ образцов заключался в оценке площади позитивно окрашенных участков исследуемых образцов в узкой спектральной области с оптической плотностью выше пороговой (рис. 1).

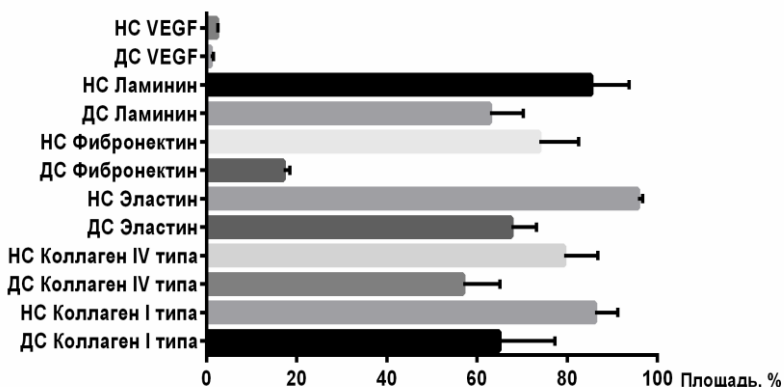


Рис 1. Количественный анализ белкового состава нативных и децеллюляризированных сердец крысы.

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

Площадь окрашивания коллагеном I типа в нативном сердце составила  $86,18 \pm 2,24$  %, в децеллюляризированном –  $64,92 \pm 5,06$  % ( $p=0,006$ ). 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 децеллюляризированном –  $56,9 \pm 3,66$  % ( $p=0,0019$ ). Площадь окрашивания эластином в нативном сердце составила  $95,73 \pm 0,45$  %, в децеллюляризированном –  $67,62 \pm 2,4$  % ( $p<0,0001$ ). Коэффициент соотношения – 0,71. Площадь окрашивания фибронектином в нативном сердце составила  $73,82 \pm 4,3$  %, в децеллюляризированном –  $17,05 \pm 0,72$  % ( $p<0,0001$ ). Коэффициент соотношения – 0,23. Площадь окрашивания ламинином в нативном сердце составила  $85,3 \pm 3,4$  %, в децеллюляризированном –  $62,85 \pm 2,6$  % ( $p=0,0002$ ). 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 децеллюляризированном –  $0,88 \pm 0,029$  % ( $p=0,0017$ ).

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.

По результатам дополнительного механического тестирования образцов установлено, что нативное и децеллюляризованное сердце в этом тесте демонстрируют различные свойства (табл. 1). Децеллюляризованное сердце имеет основные механические характеристики выше, чем нативное в 1,8-1,9 раза.

Таблица 1

Механические свойства нативного и децеллюляризованного левого желудочка сердца крысы.

Образец	Скорость испытания, мм/мин	$E_{10\%}$ , кПа	$\sigma_{\max}$ , кПа	$\epsilon_{\text{пик}}$ , %
Нативный	1	38±17	38±12	96±30
	10	74±20	27±6	72±15
Децеллюляризованный	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,  $\sigma_{\max}$  - предельная прочность,  $\epsilon_{\text{пик}}$  - деформация при предельной прочности.

Такое различие связано с тем, что децеллюляризованный образец представляет собой набор высокопрочных коллагеновых волокон, в том 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. Механическое тестирование децеллюляризованного правого желудочка сердца крысы, проведенное Witzenburg и соавт. (2012), также показало, что децеллюляризованные 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.

Проведение ретроградной перфузии через аорту 0,4% раствора трипанового синего показало проходимость коронарных артерий в децеллюляризованном сердце и позволило визуализировать сосуды вплоть до артерий третьего-четвертого порядков. Рутинные методики гистологической окраски, а также иммуногистохимическое исследование не выявили эндотелиальных клеток в децеллюляризованном матриксе. Диаметр артерий составлял  $25 \pm 5$  мкм, толщина базальной мембраны –  $4 \pm 1$  мкм.

Таким образом, в децеллюляризованном каркасе сердца крысы после проведения процедуры отсутствуют сохраненные клетки, клеточные ядра, мышечные клетки, достоверно снижается уровень ДНК, однако, получаемая структура содержит все необходимые структурные белки соединительной ткани, факторы роста, сохраняет трехмерную организацию, 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.

### **ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО МАТРИКСА СЕРДЦА КРЫСЫ С МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ**

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

задач рецеллюляризации: оценки цитотоксических свойств каркаса, определения способности клеточной адгезии к получаемому децеллюляризованному матриксу, а также выявление его потенциальной возможности управлять дифференцировкой стволовых клеток; 3) методика использования аутологических мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток может быть в будущем транслирована в клинику.

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.

При окрашивании гематоксилином и эозином статично рецеллюляризованных 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. При сканирующей электронной микроскопии были выявлены клетки, прикрепившиеся к волокнам внеклеточного матрикса, формирующие на поверхности каркаса монослой, имеющие полигональную форму, продольно вытянутые, размером до 25 мкм.

МТТ-тест, проведенный как после статичной рецеллюляризации кусочков матрикса сердца в течение 50 часов, так и после заселения целого органа в течение 168 часов, показал наличие живых клеток на рецеллюляризованном сердечном матриксе и метаболической активности в них. В случае рецеллюляризации целого органа метаболическая активность клеток была в 1,5 раза выше, чем при статичной рецеллюляризации (рис. 2).

Дифференциальное выявление живых и мертвых клеток позволило визуализировать живые клеток во время длительной статичной рецеллюляризации каркаса. Было установлено, что свыше  $80 \pm 10\%$  клеток оставались жизнеспособными после культивирования на децеллюляризованном каркасе в течение 3 дней.

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.

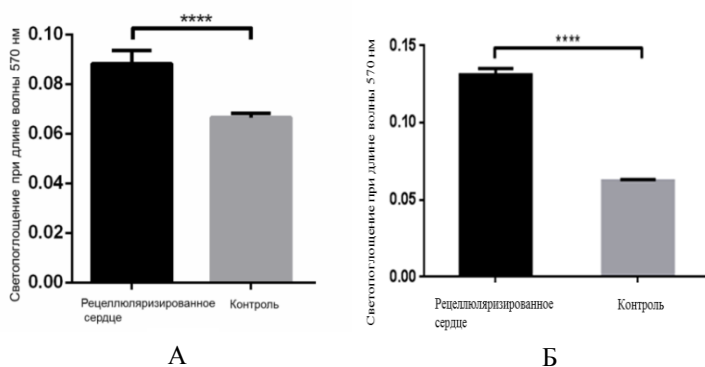


Рис. 2 Оценка жизнеспособности ММСК, заселенных на децеллюляризованный каркас сердца крысы в течение 50 (А) и 168 (Б) ч. МТТ-тест. \*\*\*\* -  $P < 0,0001$

После экспериментов по статичной рецеллюляризации мы приступили к рецеллюляризации каркаса целого органа. Нами 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 децеллюляризованного матрикса позволял сохранять его целостность. Таким образом, децеллюляризованное сердце помещали в биореактор (Harvard Apparatus, США) 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. Для предотвращения гибели клеток от гипоксии (Taylor D. A., 2009) мы проводили дополнительную оксигенацию культуральной среды смесью воздуха (95%) и CO<sub>2</sub> (5%). 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.

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

Таблица 2

Морфологическая характеристика ММСК в рецеллюляризованном матриксе сердца

Локализация	Продольный размер, мкм	Поперечный размер, мкм
Строма органа	5,74±0,26*	2,48±0,1
Внутренняя поверхность камер сердца	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.

Иммуногистохимический анализ рецеллюляризованного 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 децеллюляризованного матрикса способствовать дифференцировке ММСК в более зрелые клеточные линии.

Обнаруженные клетки в рецеллюляризованном матриксе обладали пролиферативной активностью, что доказывала флуоресценция клеточных ядер с антителами к маркеру пролиферации – Ki-67 (индекс пролиферации составил 10%). В рецеллюляризованном 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 рецеллюляризованном матриксе новых сосудов и эндотелиальной дифференцировке ММСК.

Наличие потенции к мышечной дифференцировке ММСК после культивирования на децеллюляризованном матриксе подтверждалось положительной реакцией клеток с антителами к сократительному белку  $\alpha$ -гладкомышечному актину и коннексину-43.

Использованные нами мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки являются стволовыми клетками, имеющимися во взрослом организме в постнатальный период. Однако, несмотря на меньший, чем у эмбриональных стволовых клеток (S. Higuchi et al., 2012) 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.

Таким образом, результаты рецеллюляризации показывают, что получаемый каркас не является токсичным для стволовых 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 доказана потенциальная способность внеклеточного матрикса сердца крысы индуцировать дифференцировку ММСК в эндотелиальном и мышечном направлении.

## **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, внутриклеточные сократительные белки (тропомиозин, 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. Децеллюляризованный 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.

## РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Губарева Е. А. **Сотниченко А.С.**, Гилевич И.В., Маккиарини П. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – №. 4. – С. 20-7.

2. **Сотниченко А. С.**, Губарева Е. А., Гилевич И. В., Куевда Е. В., Крашенинников С.В., Григорьев Т. Е., Чвалун С. Н., Маккиарини П. Децеллюляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8. – №. 3. – С. 86-94.

3. Friedrich L. H., Jungebluth P., Sjöqvist S., Lundin V., Haag J. C., Lemon G., Gustafsson Y., Ajallouelian F., **Sotnichenko A.**, Kielstein H., Burguillos M.A., Joseph B., Teixeira A. I., Lim M. L., Macchiarini P. Preservation of aortic root architecture and properties using a detergent-enzymatic perfusion protocol //Biomaterials. – 2014. – Vol. 35. – №. 6. – P. 1907-1913.

4. **Сотниченко А. С.**, Славинский А. А., Гилевич И. В., Куевда Е. В., Гуменюк И. С., Губарева Е. А., Маккиарини П. Структурные основы взаимодействия мезенхимальных стволовых клеток с децеллюляризованным матриксом сердца крысы // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – № 2 (151). – С. 140-146.

5. **Сотниченко А. С.**, Славинский А. А., Гилевич И. В., Куевда Е. В., Гуменюк И. С., Губарева Е. А., Маккиарини П. Патоморфологическая характеристика матрикса тканеинженерного сердца крысы // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2; URL: [www.science-education.ru/122-17629](http://www.science-education.ru/122-17629)

6. Маккиарини П., Губарева Е.А., **Сотниченко А.С.**, Гилевич И.В., Юнгеблут Ф. Способ моделирования биоинженерного каркаса сердца в эксперименте на крысе. Патент на изобретение РФ №2550286 от 03.06.2014.

### Другие публикации

7. Куевда Е.В., Губарева Е.А., **Сотниченко А.С.**, Попова А.В. Подходы к решению проблемы выбора каркасов биоинженерных органов. Всероссийская научная конференция молодых ученых-медиков. Материалы конференции 6-7 декабря 2012г. Москва. С. 295-7.

8. **Сотниченко А.С.**, Губарева Е.А., Гилевич И.В., Куевда Е.В., Попова А.В., Хааг Й., Юнгеблут Ф., Крашенинников С.В., Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н., Маккиарини П. Патоморфологическая характеристика децеллюляризованного каркаса сердца крысы. V всероссийская научно-практическая конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина» № 18-21 ноября г. Москва, 2013г.



9. **Sotnichenko A.**, Gubareva E., Kuevda E., Gilevich I., Macchiarini P. Coronary and lung vessel preservation in the heart and lung decellularization. //Regenerative Medicine. 2013.– Vol. 8. – № 6s. – P. 254
10. **Sotnichenko A.**, Gubareva E., Kuevda E., Gilevich I., Haag J., Jungebluth P., Macchiarini P. Evaluation of a new rat heart decellularization protocol. //Regenerative Medicine. – 2013.– Vol. 8. – № 6s. – P. 253.
11. Gubareva E., Gilevich I., **Sotnichenko A.**, Kuevda E., Jungebluth P., Haag J., Sjöqvist S., Macchiarini P. Comparison between paraffin and cryosection of decellularized matrices intrathoracic tissues and organs. //Regenerative Medicine. – 2013.– Vol. 8. – № 6s. – P. 407.
12. Губарева Е. А. Маккиарини П., Барышев М. Г., Текуцкая Е.Е., Кокурина Е.В., Кувда Е.В., **Сотниченко А.С.**, Попова А.В., Джимаков С.С., Долгов М. А. Возможность использования воды с измененным изотопным составом в протоколах децеллюризации. Труды XXI международной конференции и дискуссионного научного клуба. Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии 1 Т + М & Е 2013 Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, с 05 по 15 июня 2013 года. С. 174-6.
13. Macchiarini P., Porhanov V.A., Gubareva E.A., Polakov I.S., Kuevda E.V., **Sotnichenko A.S.**, Gilevich I.V., Nakohov R.N., Danilenko K.A. Megagrant approaches to tissue-engineering intrathoracic organs. Science of the future. Russia. St.Petersburg. 17-20 September 2014
14. **Sotnichenko A.**, Elena A. Gubareva, Elena V. Kuevda, Irina V. Gilevich, and Paolo Macchiarini. Repopulation of decellularized rat heart scaffold with rat MSCs. Science of the future. Russia. St.Petersburg. 17-20 September 2014.
15. Губарева Е.А., Маккиарини П., Чвалун С.Н., **Сотниченко А.С.**, Кувда Е.В., Гилевич И.В., Юнгеблут Ф., Крашенинников С.В., Григорьев Т.Е. Оценка качества децеллюляризованных матриц для создания тканеинженерных интраторакальных органов. //Стволовые клетки и регенеративная медицина: сборник статей. М: Издательство Московского университета. – 2014. – С. 58-73.
16. **Sotnichenko A.**, Gubareva E., Kuevda E., Gilevich I., Kuevda E., Gumenyuk I., Sharkova T., Orlov S., Macchiarini P.. MSCs differentiation in decellularized rat and non-human primate hearts. //Regenerative Medicine. 2015.– Vol. 10. – № 7s. – P. 167.