

## Децеллюляризированный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца

А.С. Сотниченко<sup>1</sup>, Е.А. Губарева<sup>1</sup>, И.В. Гилевич<sup>1</sup>, Е.В. Кувда<sup>1</sup>, С.В. Крашенинников<sup>3</sup>, Т.Е. Григорьев<sup>3</sup>, С.Н. Чвалун<sup>3</sup>, П. Маккиарини<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

<sup>2</sup> Каролинский институт, Швеция

<sup>3</sup> НИЦ «Курчатовский институт», Москва

### Decellularized rat heart matrix as a basis for creation of tissue engineered heart

A.S. Sotnichenko<sup>1</sup>, E.A. Gubareva<sup>1</sup>, I.V. Gilevich<sup>1</sup>, E.V. Kuevda<sup>1</sup>, S.V. Krasheninnikov<sup>3</sup>, T.E. Grigoriev, S.N. Chvalun<sup>3</sup>, P. Macchiarini<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar

<sup>2</sup> Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>3</sup> NRC «Kurchatov Institute», Moscow

Разработка биоинженерных каркасов внутренних органов является одним из приоритетных направлений тканевой инженерии. Методы децеллюляризации позволяют получать биологические (природные) каркасы с сохранением внеклеточного матрикса и трехмерной структуры органов. Основной целью данного исследования являлась патоморфологическая характеристика структур каркаса децеллюляризованного сердца крысы и оценка адгезии и жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в процессе рецеллюляризации.

Сердце крысы было децеллюляризовано с использованием модифицированного детергент-энзиматического метода, подразумевающего применение дезоксихолата натрия и ДНКазы. Результаты морфологических методов исследования подтвердили сохранность белков внеклеточного матрикса и проходимость коронарных сосудов. Механическое тестирование децеллюляризованных и нативных образцов сердца крысы показало увеличение механических характеристик матрикса в процессе децеллюляризации. В ходе проведенных опытов по рецеллюляризации полученного каркаса было показано, что децеллюляризованный внеклеточный матрикс не является токсичным для ММСК, которые остаются жизнеспособными и сохраняют свою метаболическую активность при длительном культивировании на каркасе.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия, децеллюляризация, сердце, рецеллюляризация, ММСК.

Сердечно-сосудистые заболевания — основная причина инвалидизации и преждевременной смерти жителей экономически развитых стран [1]. Рост заболеваемости, поражение людей всё более молодого возраста делают эти болезни важнейшей медико-социальной проблемой [2]. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) — одно из самых частых осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы. Количество больных, которые достигают терминальной стадии ХСН, постоянно растет. Трансплантация сердца — хирургический способ лечения терминальной стадии ХСН. Каждый год в мире проводятся более 5400 операций по пересадке сердца [3]. В настоящее время, основные проблемы трансплантологии связаны с острой нехваткой донорских органов, сложностью их доставки, трудностью поиска иммунологически совместимых органов и пожиз-

Development of bioengineered scaffolds of internal organs is one of the priority areas of tissue engineering. Decellularization allows to obtain biological (natural) scaffolds while preserving extracellular matrix and three-dimensional structure of organs. The primary goals of the present research were to investigate pathological characteristics of the decellularized rat heart scaffold and evaluate adhesion and viability of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) during recellularization. Rat hearts were decellularized using a modified detergent-enzymatic method including sodium deoxycholate and DNase. The results of morphological studies have confirmed the safety of extracellular matrix proteins and patency of the coronary vessels. Mechanical testing of decellularized and native samples of rat heart showed an increase of mechanical properties of the matrix during decellularization. During the conducted experiments on recellularization of obtained scaffold has been shown that the extracellular matrix was not toxic for MMSC which were viable and maintained their metabolic activity during prolonged cultivation on the scaffold.

**Key words:** tissue engineering, decellularization, heart, recellularization, MMSC.

ненным назначением иммуносупрессивной терапии [4]. Поэтому одной из наиболее перспективных задач можно считать развитие тканевой инженерии, как одного из направлений регенеративной медицины [5, 6].

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. Для создания органов и тканей будут использоваться каркасы, или матриксы (биологические или искусственные), клетки (ауто-, алло-, ксеногенные), биореакторы и биоактивные молекулы [4, 7–11].

Децеллюляризация — это способ получения биологических каркасов, который направлен на удаление клеток с сохранением внеклеточного матрикса

e-mail: alex24@mail.ru

(ВКМ) и трехмерной структуры органа [12]. 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 ВКМ в каждой ткани являются уникальными, определяют ее функциональность. Тем не менее, структура и состав каждого конкретного белка ВКМ остаются неизменными у различных видов млекопитающих [13–15]. Это способствует тому, что ВКМ одних видов не вызывает иммунного отторжения у других. При правильном удалении клеточных антигенов, которые вызывают иммунное отторжение, без повреждения ВКМ, полученный каркас может служить мощным источником сигналов и содействовать конструктивному ремоделированию тканей после повреждения. «Конструктивное ремоделирование» означает, что каркас ВКМ способствует формированию участка соответствующей ткани в месте имплантации, вместо образования рубцовой ткани [16]. Наиболее изученными являются ВКМ тонкого кишечника, мочевого пузыря, кожи [17–21]. Использование тканеспецифичных каркасов для создания тканеинженерных конструкций является наиболее предпочтительным [22–27].

Н.С. Ott с 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 [22, 28].

Ж.М. Wainwright с 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 [29].

Мы предложили модифицированный детергент-энзиматический метод децеллюляризации сердца крысы для получения бесклеточного каркаса, позволивший сократить длительность процедуры до 24 ч, в том числе активную фазу до 8 ч [30]. Сердце крысы было децеллюляризовано с использованием протокола, включающего применение дезоксихолата натрия и ДНКазы. В сравнении с протоколами децеллюляризации, представленными в литературе, в предложенном нами варианте было уменьшено время воздействия детергентов и энзимов: продолжительность действия 4% раствора дезоксихолата натрия на сердце составила 3 ч, а ДНКазы – 1 ч. Результаты морфологических методов исследования показали отсутствие клеток и сохранность ВКМ. При количественной оценке ДНК обнаружено, что при проведении децеллюляризации было удалено около 81% ядерного материала в сердце до уровня  $30,10 \pm 13,77$  нг/мг ткани.

Целью работы являлась патоморфологическая характеристика структур каркаса децеллюляризованного сердца крысы и оценка адгезии и жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в процессе рецеллюляризации.

### Материал и методы

Для проведения де- и рецеллюляризации использовались органокомплексы «сердце-легкие» крыс-самцов линии Lewis, весом  $180 \pm 16$  г ( $n = 30$ ). Все манипуляции с животными осуществляли с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных и в соответствии с «Принципами ухода за лабораторными животными» и «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (Рекомендации Национального общества по медицинским исследованиям, 2001, США; Руководство по уходу и использованию лабораторных животных, National Academy Press, переиздано 1996 г., США).

### Децеллюляризация сердца

Перед эксплантацией органов, предназначенных для последующей децеллюляризации, крысам интраперитонеально вводилось 100 ЕД гепарина. Выделяли органокомплекс «сердце-легкие». Верхняя и нижняя полые вены отсекались. Аорта канюлировалась на расстоянии 2–2,5 см от сердца. Ветви дуги аорты: плечеголовной ствол, левая общая сонная и левая подключичная артерии – лигировались. Трахея канюлировалась на расстоянии 2 см от киля. Для проведения децеллюляризации органокомплекс «сердце-легкие» помещали в биореактор и начинали ретроградную перфузию жидкости через аорту, а также перфузию жидкости через трахею. Все растворы были стерильными. Этапы децеллюляризации: PBS 200 мл – 1 ч, деионизированная вода 200 мл – 1 ч, дезоксихолат натрия 4% 200 мл – 3 ч, PBS 200 мл – 1 ч, ДНКазы-I 2000 ЕД/мг – 2 ч, PBS 200 мл – 16 ч (рис. 1А).

### Морфологический анализ

Полученные образцы децеллюляризованных сердец фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, дегидратировали и заключали в парафин по стандартной методике. С помощью микротомы получали срезы толщиной 5 мкм. Для гистологической оценки препаратов проводили окраску срезов гематоксилином и эозином (Histolab, Швеция). Для изучения структуры соединительной ткани внеклеточного матрикса срезы окрашивали по Ван Гизону (Histolab, Швеция).

Также нами был проведен иммуногистохимический анализ. В качестве первичных были выбраны поликлональные антитела к ламинину (ab11575, Abcam, Англия), эластину (ab21610, Abcam, Англия), фибронектину (ab6328, Abcam, Англия), коллагену IV типа (ab6586, Abcam, Англия), коллагену I типа (ab34710, Abcam, Англия), тропомиозину (ab133292, Abcam, Англия). Препараты дополнительно докрашивались гематоксилином. В качестве первичных антител для иммунофлуоресцентного анализа были выбраны поликлональные антитела к фактору фон Виллебранда (ab6994, Abcam, Англия), МНС I типа конъюгированные с FITC (ab22367, Abcam, Англия). В качестве положительных контролей были выбраны аорта, кожа и мышечная ткань бедра крысы. Изучение микропрепаратов проводилось на микроскопе Olympus BX51 (Япония).

Исследование проходимости для растворов сосудистого русла проводилось путем ретроградной перфузии через аорту 0,4% раствора трипанового синего (Gibco, Англия).

Дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток на рецеллюляризованном каркасе после длительного культивирования ММСК производилось с использованием набора LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США), согласно инструкции производителя.

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

#### Сканирующая электронная микроскопия

Для оценки структуры децеллюляризованных и рецеллюляризованных сердечных матриксов применялась сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Образцы ткани фиксировали в 2,5% растворе глутеральдегида (Merk, Германия) в 0,1 M какодилатном буфере (Prolabo, Франция) в течение 2 ч. После промывания образцы были обезвожены в спиртах возрастающей концентрации, высушены в течение ночи в термостате при 37°C и подвергнуты напылению золотом. Исследование проводилось на сканирующем электронном микроскопе JSM6490, JEOL (Япония)

#### Оценка механических свойств

Сравнительные биомеханические тесты образцов сердца проводили на универсальных испытательных машинах фирмы Инстрон модели 5965 (датчик 50 Н) и на Lloyd LRX (100 N load cell). Испытания в виде одноосного растяжения с постоянной скоростью движения зажимов выполняли на воздухе при скорости 1 и 10 мм/мин и расстоянии между зажимами 10 мм. По результатам испытаний были определены предельная прочность, деформация при предельной прочности и модуль Юнга. Статистическая выборка при скорости 1 мм/мин – по пяти образцам, при скорости 10 мм/мин – по трем образцам. Все испытания проводились при температуре 23°C, до момента испытания образцы хранились в фосфатном буфере (PBS) при 4°C, перед испытанием кондиционировались в PBS 5 ч при температуре 23°C.

#### Выделение ММСК

Источником ММСК служил красный костный мозг крыс. Лабораторным животным интраперитонеально вводились барбитураты в летальной дозе 150 мг/кг. Выделялись бедренные и большеберцовые кости, метафизы отсекались и костный мозг вымывался раствором PBS с помощью иглы и шприца. После центрифугирования осадок суспендировали в культуральной среде (DMEM, Invitrogen, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, Invitrogen, США) и 1% пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, США), высевали в культуральный флакон (Corning, США) и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После 24 ч инкубации культуральную среду удаляли, устраняя все не прикрепившиеся клетки. Клетки, которые адгезировали к культуральному флакону были определены как первичная культура ММСК. Клетки культивиру-

вали до 10 пассажа и использовали в последующих этапах исследования.

**Статичное заселение образцов** выполняли для проведения гистологического анализа, МТТ-теста, антиоксидантного теста. Из децеллюляризованного матрикса сердца в стерильных условиях получали образцы диаметром 6 мм, которые далее были стерилизованы 10% раствором этанола в течение 15 мин и дважды отмыты раствором PBS +/+ (Gibco, Англия) с антибиотиком-антимикотиком по 15 мин. Заселение полученных образцов ММСК производили в 96-луночном планшете путем помещения клеток в количестве  $2 \times 10^4$  на каркас при помощи пипеттора.

#### Оценка антиоксидантной активности

Для оценки содержания антиоксидантов в исследуемых децеллюляризованных, рецеллюляризованных и нативных образцах был использован антиоксидантный тест ABEL® с фолазином (Pholasin®) и пероксинитритом (Microplate Test Kit ABEL-41M2, Knight Scientific Ltd, UK). Для выполнения теста в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 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, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·HCL). Для измерения возникающей флюоресценции использовали Fluostar OPTIMA (BMGLABTECH, Германия).

#### МТТ-тест (колориметрический анализ)

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

После 50 ч инкубации ММСК на каркасе сердца в каждую лунку 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 0,01 M HCl и инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем образцы переносили в 96-луночный планшет и производили колориметрический анализ с помощью спектрофотометра (SpectraMax 250, Molecular Devices, США).

#### Засевание целого органа

Децеллюляризованный органокомплекс «сердце-легкие» помещали в биореактор (Harvard Apparatus, США) и стерилизовали путем ретроградной перфузии через аорту 10% этанола в фосфатном буфере в течение 15 мин, затем трижды в течение 60 мин. перфузировали раствором PBS +/+ (Gibco, Англия), содержавшим 1% раствор антибиотика-антимикотика. И, наконец, перфузировали его культуральной средой для ММСК в течение 3 ч. Затем в течение 5 сут. равными порциями вводили в аорту ММСК общим количеством 90 млн клеток. Насыщение культуральной среды кислородом производилось при пропускании через нее смеси из 95%

воздуха и 5% CO<sub>2</sub>. Смену культуральной среды производили каждые 3 сут. с последующим подсчетом клеток, находящихся в ней. Общая продолжительность рецеллюляризации составила 18 сут. (рис. 1Б).

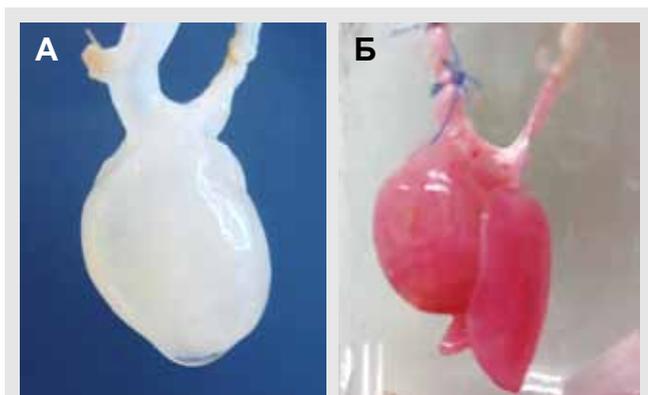


Рис. 1. Сердце крысы после проведения децеллюляризации (А) и рецеллюляризации (Б)

#### Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики

с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010. Полученные результаты выражали в виде средних значений (М) и ошибки среднего (m). В зависимости от вида распределения признака использовали параметрические и непараметрические методы, разницу считали статистически значимой при  $p < 0,05$ .

#### Результаты

В ходе морфологического исследования образцов децеллюляризованных сердец было отмечено, что ткани после удаления клеток теряли характерный темно-красный цвет и приобретали молочно-белую окраску, присущую всем децеллюляризованным тканям, что соотносится с данными литературы [12, 22, 27, 28, 29]. При окраске гематоксилином и эозином интактные мышечные волокна, клетки и клеточные ядра не выявлялись. Окраска по Ван Гизону, тропная к соединительнотканым волокнам, показала, что ВКМ, состоящий преимущественно из коллагена, оставался неизменным. Патологических изменений структуры, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было.

Иммуногистохимическая реакция с антителами к белкам ВКМ проходила как в испытуемых образцах, так и в контролях (рис. 2).

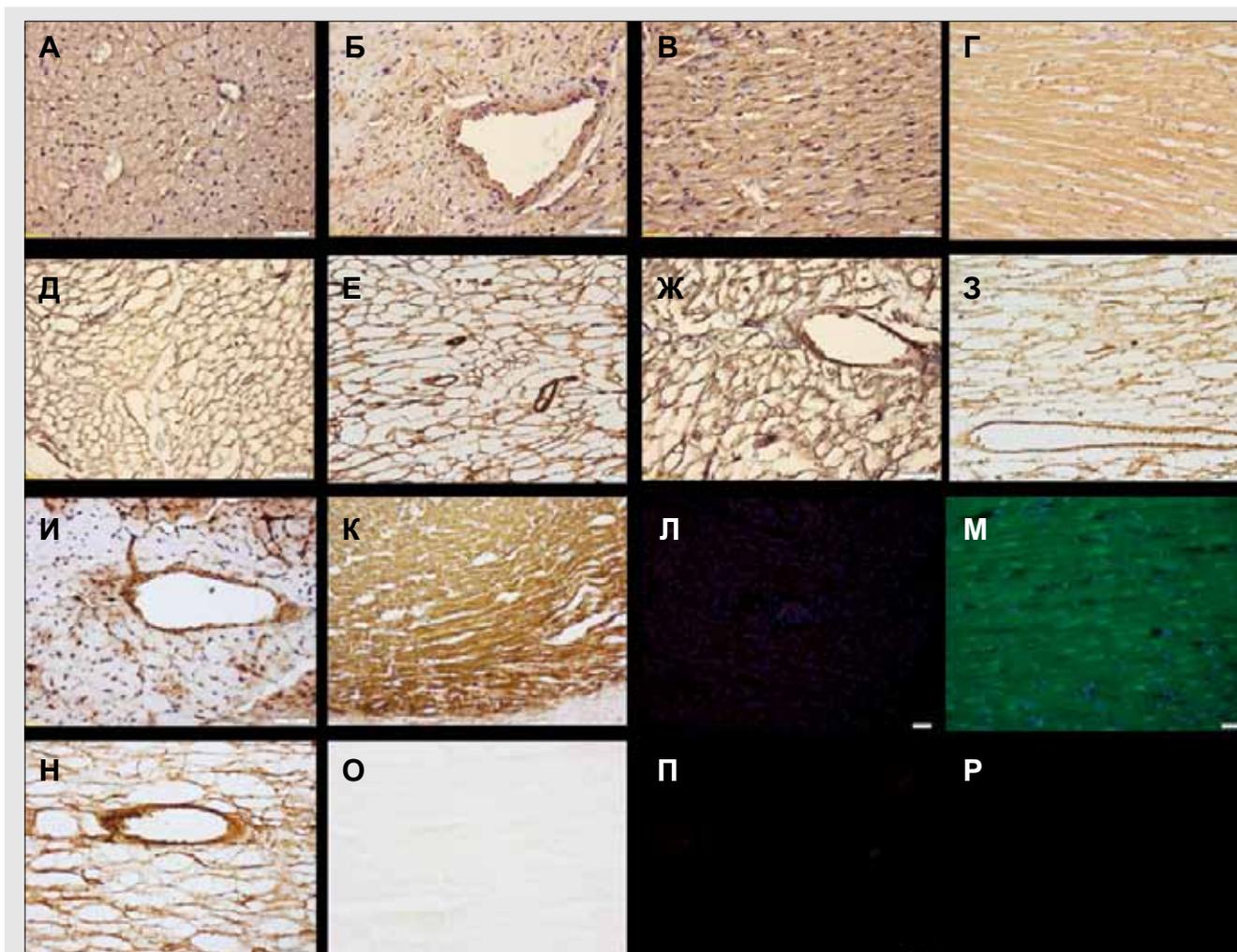


Рис. 2. Ткани сердца крысы: нативные (А–Г, И–М) и децеллюляризованные (Д–З, Н–Р). Иммуногистохимическая реакция с антителами к коллагену I (А, Д) и IV (Б, Е) типов, ламинину (В, Ж), эластину (Г, З), фибронектину (И, Н), тропмиозину (К, О), фактору Виллебранда (Л, П), МНС I типа (М, Р). Ув.:  $\times 40$

В образцах нативных тканей при помощи сканирующей электронной микроскопии визуализировалась структура миокарда, отмечалось наличие клеток и межклеточного вещества. В децеллюляризован-

ных органах при сохранности пористой структуры ВКМ клетки не обнаруживались. При исследовании заселенных образцов были обнаружены клетки, прикрепившиеся к каркасу (рис. 3).

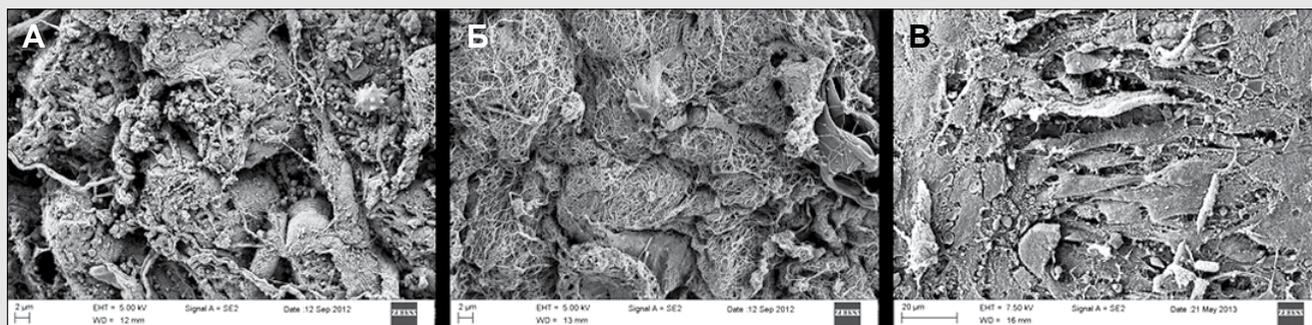


Рис. 3. Нативное (А), децеллюляризованное (Б) и рецеллюляризованное (В) сердце. Сканирующая электронная микроскопия

Ретроградная перфузия через аорту 0,4% раствора трипанового синего подтвердила проходимость коронарных артерий и позволила визуализировать сосуды вплоть до артерий третьего-четвертого порядков (рис. 4). Посредством гистохимических и иммуногистохимических методов не были выявлены эндотелиальные клетки в децеллюляризованном матриксе (отсутствовали клетки, экспрессирующие фактор фон Виллебранда) (см. рис. 2 Л, П).

Во время механического тестирования образцов были получены типичные кривые при испытании на одноосное растяжение со скоростью 1 мм/мин и 10 мм/мин, а также оценены основные механические характеристики нативных и децеллюляризованных образцов сердца крысы (рис. 5; табл.).

В соответствии с гистологическими данными, полученными после статичного засеивания образцов в течение 3 сут. в 96-луночном планшете клетки прикреплялись к каркасу, но не мигрировали внутрь, оставаясь на поверхности. Однако во время рецеллюляризации целого органа перфузионным методом клетки определялись как на внутренней поверхности камер сердца, коронарных сосудов, так и внутри стенки каркаса (рис. 6).

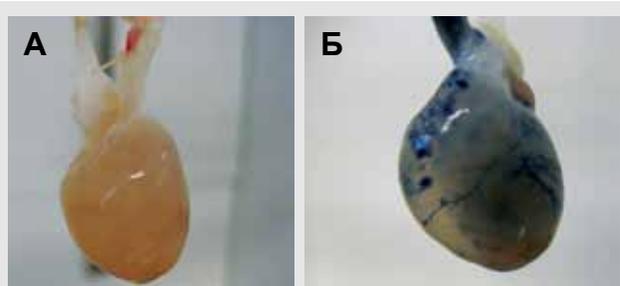


Рис. 4. Коронарные сосуды до (А) и после (Б) перфузии раствором трипанового синего

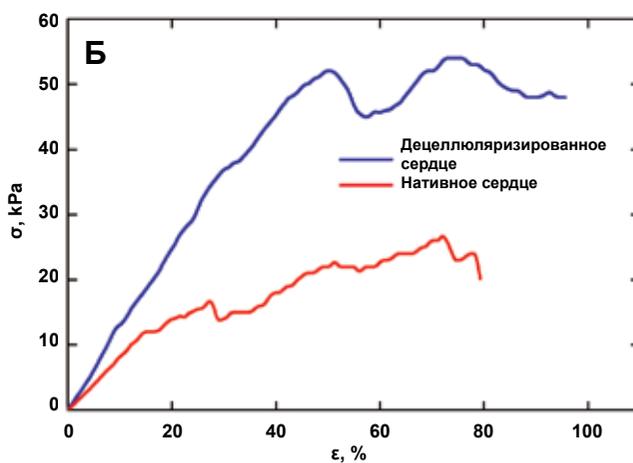
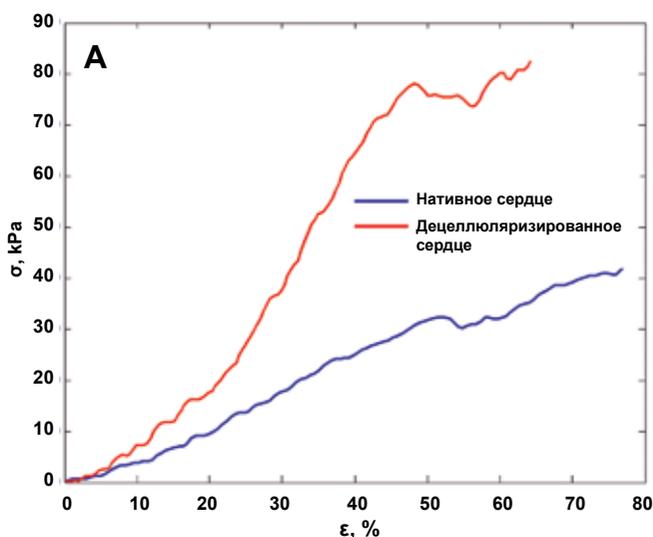


Рис. 5. Механический тест. Типичные кривые растяжения образцов сердца при различных скоростях испытания: А – 1 мм/мин; Б – 10 мм/мин

**Механические свойства нативного и децеллюляризованного 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
Децеллюляризованный	1	71±50	93±35	61±4
	10	126±28	54±18	74±19

\* –  $p < 0,05$ .

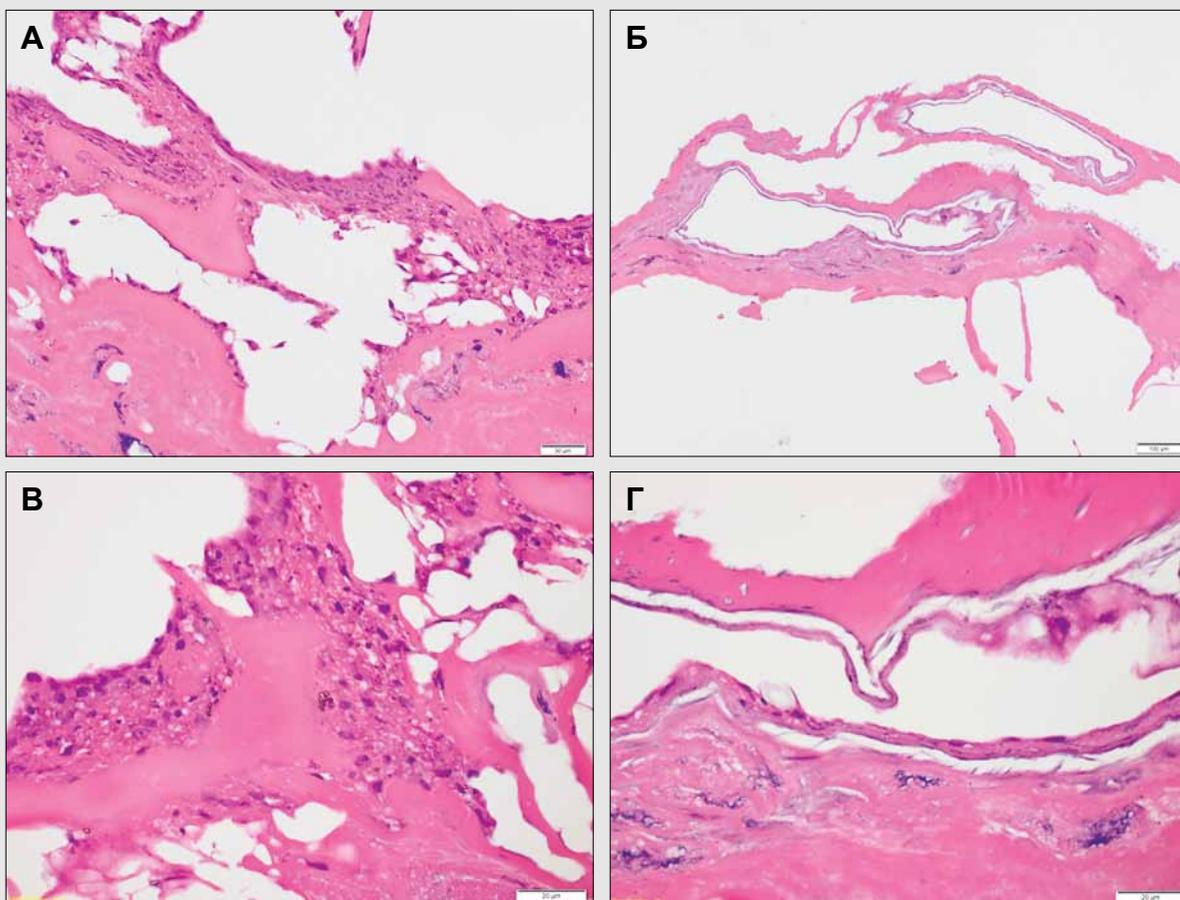


Рис. 6. Рецеллюляризованное сердце: ММСК в толще стромы сердца (А, В), клетки в 1–2 слоя выстилают внутреннюю поверхность камер сердца, коронарных сосудов (Б, Г). Окраска: гематоксилин, эозин. Ув.: А, Б ×10; В, Г ×40

МТТ-тест, основанный на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразола (МТТ-реактанта) до голубого кристаллического фармазана, растворимого в диметилсульфоксиде, был проведен после рецеллюляризации матрикса сердца и показал наличие живых, метаболически активных клеток на засеянном кардаске (рис. 7).

Пик люминесценции децеллюляризованного каркаса при проведении антиоксидантного теста был самым ранний, в сравнении с рецеллюляризованной и нативной тканью, что соответствует минимальной активности внутриклеточных антиоксидантных систем в нем. В то же время засеянный матрикс сердца обладал антиоксидантной активностью (рис. 8).

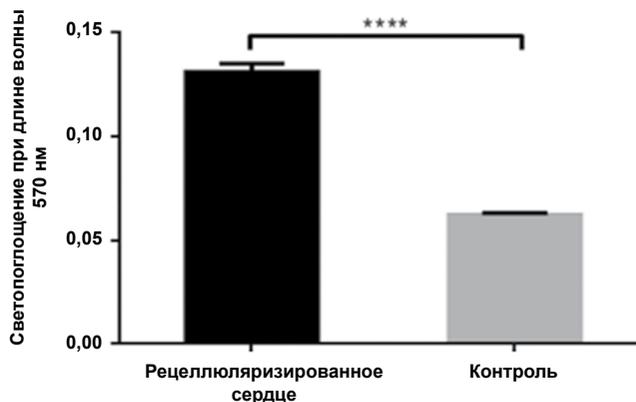


Рис. 7. МТТ-тест

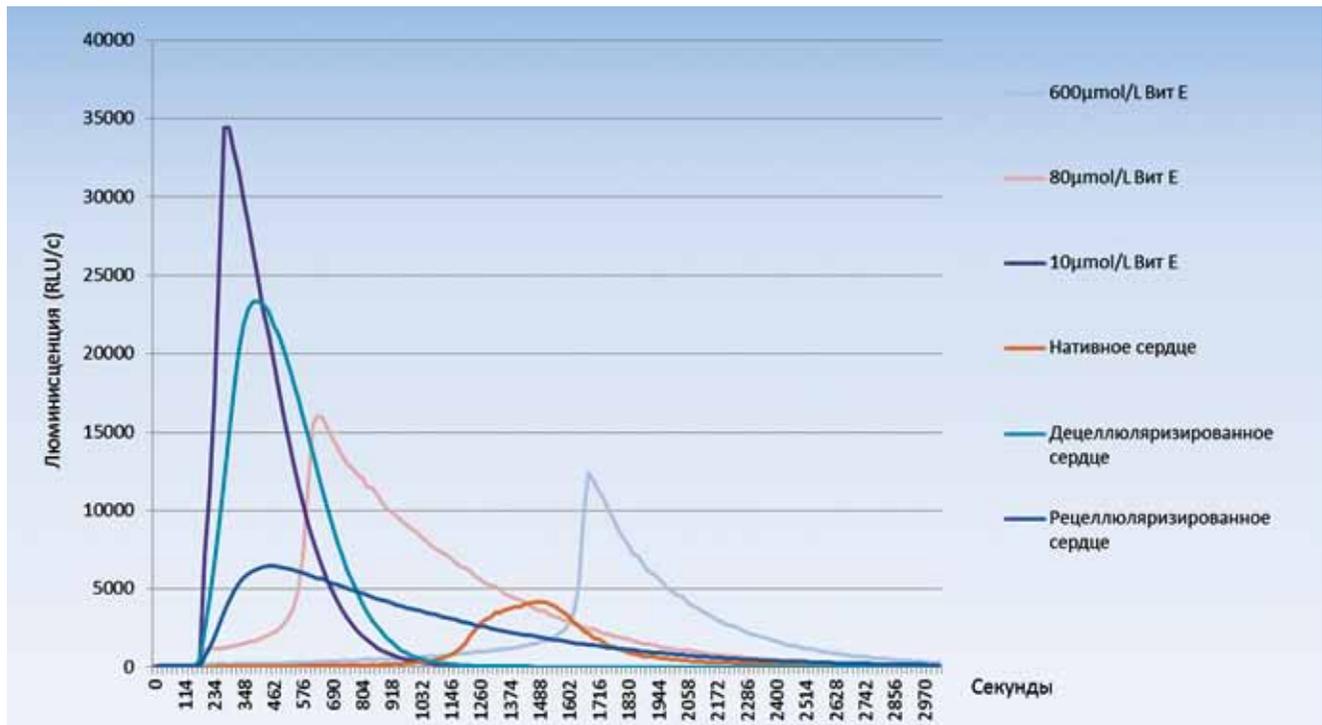


Рис. 8. Антиоксидантный тест

Дифференциальное выявление живых (позитивное окрашивание кальцеином) и мертвых (позитивное окрашивание гомодимером этидия) клеток позволило выявить наличие жизнеспособных клеток после длительного культивирования на каркасе (рис. 9).

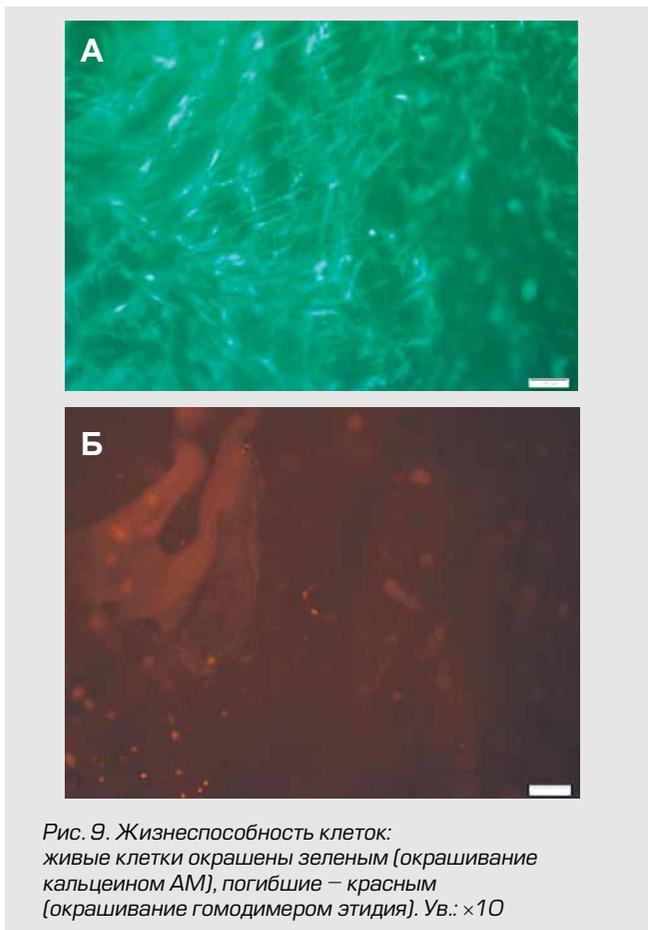


Рис. 9. Жизнеспособность клеток: живые клетки окрашены зеленым (окрашивание кальцеином АМ), погибшие – красным (окрашивание гомодимером этидия). Ув.:  $\times 10$

Биолюминесценция клеток на засеянном каркасе сердца под воздействием D-люциферина выявила наличие жизнеспособных клеток во всех камерах органа, однако наибольшая интенсивность люминесценции клеток отмечалась преимущественно вдоль коронарных сосудов (рис. 10).

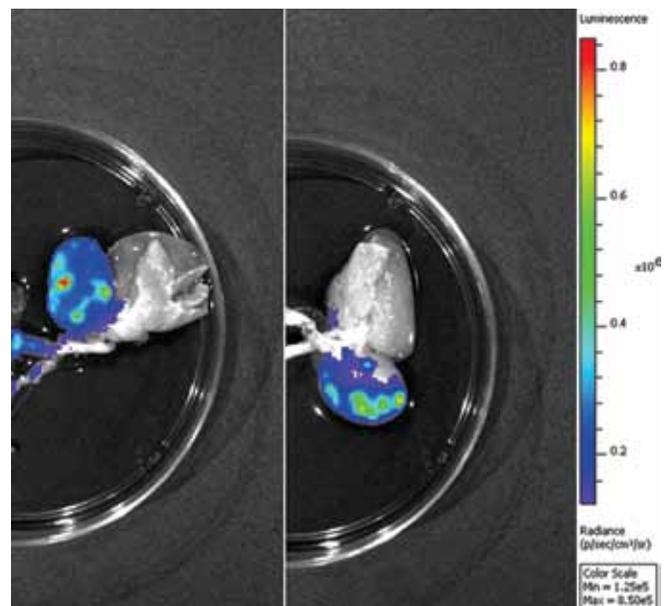


Рис. 10. Биолюминесценция жизнеспособных клеток на каркасе сердца:

А – передняя поверхность, Б – задняя поверхность сердца. IVIS

### Обсуждение

Для создания подходящего каркаса биоинженерного органа требуется: во-первых, воссоздать структуру, сходную с нативной; во-вторых, развитая сосудистая сеть, способная обеспечить адекватную перфузию тканей; в-третьих, необходимо, чтобы клетки, используемые при рецеллюляризации, были способны к дифференцировке во все паренхиматозные и сосудистые структуры органа; в-четвертых, иметь возможность управления микроокружением клеток для воздействия на их физиологию и функции; в-пятых, должна существовать возможность управления дифференцировкой и созреванием клеток *in vitro* [33].

Практической целью децеллюляризации является максимально полное удаление клеток из тканей с минимальными повреждениями ВКМ. [12] С помощью гистохимического анализа, сканирующей электронной микроскопии в нашем исследовании было доказано отсутствие клеток, клеточных ядер в полученном децеллюляризованном матриксе сердца. Эти результаты согласуются с ранее установленными критериями децеллюляризации [34], 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 [35].

Иммуногистохимическое исследование внеклеточного матрикса не показало качественных изменений его состава. Основные структурные белки — коллаген I и IV типов, ламинин, эластин, фибронектин — были обнаружены в децеллюляризованном матриксе сердца. В то же время молекулы МНС I класса, которые экспрессируются на мембранах всех соматических клеток, внутриклеточный сократительный белок тропомиозин обнаружены не были, что также явилось для нас косвенным свидетельством отсутствия других мембранных и внутриклеточных белков, являющихся антигенами.

После проведения децеллюляризации в нашем исследовании сосуды сердца остались проходными для контраста вплоть до артерий третьего-четвертого порядка. Большой визуализации не удалось достичь из-за высокой вязкости раствора.

Полученные данные механического тестирования образцов показали, что при различных скоростях испытания форма кривой деформации заметно различается. При скорости 1 мм/мин кривая растяжения имеет ярко выраженный *s*-образный вид, характерный для эластомерных систем [36]. При увеличении скорости растяжения время деформации становится сопоставимым со временем, характерным 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 в механических характеристиках 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

на от них, что сопровождается частичным коллапсом (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 выявить при данном типе испытаний.

Необходимо отметить также, что полученные результаты не вполне отражают 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.

Учитывая результаты морфологического анализа, исследования сосудистой проходимости для растворов, данные механического тестирования децеллюляризованных образцов мы приступили к проведению дальнейших экспериментов, связанных с рецеллюляризацией полученного каркаса. Вначале мы провели статичное заселение матрикса, с последующим проведением гистологического анализа, МТТ-теста, антиоксидантного теста. По результатам проведенных исследований мы предположили, что, во-первых, клетки оказались способными прикрепиться к полученному матриксу, во-вторых, каркас не обладает цитотоксическим действием для ММСК и, в-третьих, клетки остаются жизнеспособными и сохраняют свою метаболическую активность при культивировании на каркасе. Далее мы приступили к рецеллюляризации каркаса целого органа. Трудностью, возникшей на этом этапе, было то, что оказалось невозможным вводить более 20 млн клеток интравазально одновременно — из-за большого объема клеточной суспензии часть клеток (около 20%) не прикреплялась к каркасу и оставалась в культуральной среде во взвешенном состоянии. Для предотвращения гибели клеток от гипоксии [33] на данном этапе мы проводили оксигенацию культуральной среды смесью воздуха (95%) и CO<sub>2</sub> (5%). В результате длительного культивирования ММСК на каркасе сердца с помощью дифференциального окрашивания живых и мертвых клеток было показано наличие жизнеспособных клеток на каркасе, методом *in vivo* биoluminesценции было определено преимущественное паравазальное расположение клеток, что объясняется методом их введения. Тем не менее, обнаружение клеток во всех камерах органа доказывает принципиальную реализуемость подобного метода рецеллюляризации.

### Заключение

Использование модифицированного протокола для децеллюляризации сердца крысы детергент-энзиматическим методом позволяет сохранить основные белки внеклеточного матрикса. Результаты рецеллюляризации показывают, что получаемый каркас не является токсичным для клеток. Таким образом, следует продолжить работы по рецеллюляризации каркаса сердца крысы с использованием методик индуцирования клеточной дифференцировки *in vitro*.

**Благодарности**

Работа частично финансирована грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в Российских образовательных учреждениях высшего профес-

сионального образования от 19 октября 2011 г. №11.G34.31.0065. Работа частично выполнена на оборудовании Ведущего центра трансляционной регенеративной медицины (ACTREM) Каролинского Института (Швеция).

**ЛИТЕРАТУРА:**

1. ВОЗ. 10 ведущих причин смерти в мире. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/>
2. World Health Statistics. [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics)
3. GKT1 Activity and Practices. <http://www.who.int/transplantation/gkt/statistics/en/>
4. Fuchs J.R., Nasser B.A., Vacanti J.P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 72: 577–91.
5. Murphy S.V., Atala A. Organ engineering – combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. *Bioessays.* 2012; 35: 163–72.
6. Taylor D.A. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs. *Current Opinion in Biotechnology.* 2009; 20: 598–605.
7. McIntire L.V., Greisler H.P., Griffith L. et al. WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research. Final report. International Technology Research Institute. Baltimore, 2002.
8. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Science* 1993; 260: 920–6.
9. Skalak R., Fox C., editors. NSF Workshop, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. 1988.
10. Amulya S. Tissue engineering: present concepts and strategies. *J. Indian Assoc. Ped. Surg.* 2005; 10: 14–9.
11. Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends Expert opinion on biological therapy. 2005; 5: 879.
12. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu. Rev. Biomed.* 2011; 13: 27–53.
13. Exposito J.Y., D'Alessio M., Solursh M. et al. Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2(I) collagen. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(22): 15559–62.
14. Bernard M.P., Chu M.L., Myers J.C. 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; 22(22): 5213–23.
15. Bernard M.P., Myers J.C., Chu M.L. 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; 22(5): 1139–45.
16. Badylak S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 2007; 28: 3587–93.
17. Gilbert T.W., Stewart-Akers A.M., Simmons-Byrd A. et al. Degradation and remodeling of small intestinal submucosa in canine Achilles tendon repair. *J. Bone Joint Surg.* 2007; 89(3): 621–30.
18. Dejardin L.M., Arnoczky S.P., Ewers B.J. et al. Tissue-engineered rotator cuff tendon using porcine small intestine submucosa. Histologic and mechanical evaluation in dogs. *Amer. J. Sports Med.* 2001; 29(2): 175–84.
19. Gilbert T.W., Nieponice A., Spievack A.R. et al. Repair of the thoracic wall with an extracellular matrix scaffold in a canine model. *J. Surg. Res.* 2008; 147(1): 61–7.
20. MacLeod T.M., Sarathchandra P., Williams G. 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; 30(5): 431–7.
21. Wainwright D.J. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns* 1995; 21(4): 243–8.
22. Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K. et al. Perfusion decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.* 2008; 14: 213–21.
23. Macchiarelli P., Jungebluth P., Go T. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372: 2023–30.
24. Montoya C.V., McFetridge P.S. Preparation of ex vivo based biomaterials using convective flow decellularization. *Tissue Engineering: Part C, Methods.* 2009; 15(2): 191–200.
25. Omae H., Zhao C., Sun Y.L. et al. Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering. *J. Orthop Res.* 2009; 27(7): 937–42.
26. Ozeki M., Narita Y., Kagami H. et al. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *J. Biomed. Mat. Res., Part A.* 2006; 79(4): 771–8.
27. Sellaro T.L., Ravindra A.K., Stolz D.B. et al. Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng.* 2007; 13(9): 2301–10.
28. Ott H.C., Taylor D. Decellularization and recellularization of organs and tissues. US patent application 20090202977. 2009 Aug 13.
29. Wainwright J.M., Czajka C.A., Patel U.B. et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Engineering: Part C.* 2010; 16(3): 525–32.
30. Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гилевич И.В. и др. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; VII (4): 20–7.
31. Rieder E., M.-T. Kasimir, G. Silberhumer et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J. Thor. Cardiovasc. Surg.* 2004; 127(2): 399–405.
32. Guo-feng L., Zhi-juan H.E., Da-ping Y. et al. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft. *Chin. Med. J.* 2008; 121(15): 1398–406.
33. Taylor D. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs. *Current Opinion in Biotechnology* 2009; 20:598–605
34. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011; 32: 3233–43.
35. Gilbert T.W. Strategies for tissue and organ decellularization. *J. Cell Biochem.* 2012; 113(7): 2217–22.
36. R.N. Haward. The application of non-gaussian chain statistics to ultralow density polyethylenes and other thermoplastic polymers. *Polymer* 1999; 40: 5821–32.

Поступила 14.09.2013