

На правах рукописи

ЛАВРЕШИН

Алексей Владимирович

Тканевая инженерия корня аорты человека методом децеллюляризации

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

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

Санкт-Петербург - 2016

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

кандидат медицинских наук, доцент **Курапеев Дмитрий Ильич**

доктор медицинских наук **Анисимов Сергей Владимирович**

Официальные оппоненты:

Верин Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, заведующий.

Гавриленков Владимир Иванович, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, кафедра госпитальной хирургии №2 им. акад. Ф. Г. Углова, профессор кафедры

Ведущая организация – ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Минобороны России

Защита диссертации состоится _____ в _____ на заседании диссертационного совета Д 208.054.04 на базе ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341 г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2., www.almazovcentre.ru).

Автореферат разослан «____» _____ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.054.04

доктор медицинских наук профессор

Недошивин Александр Олегович

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Заболевания сердечно-сосудистой системы занимают лидирующую роль в структуре инвалидизации и смертности населения мира (Бокерия Л.А. и др., 2004). По данным американской ассоциации сердца (American Heart Association), несмотря на снижение смертности от сердечно-сосудистых заболеваний за последние 10 лет на 16,7%, этот показатель остается высоким; на 2010 год он составил 31,9% (Go A.S. et al. 2014). Другими словами, от сердечно-сосудистых заболеваний умирает каждый третий человек на земле. Общие затраты, связанные с заболеваниями сердца, только на территории США и только в 2014 году составили 315 миллиардов долларов США.

Весомую роль среди заболеваний сердца занимает патология клапанного аппарата сердца. Так, число пациентов по всему миру, нуждающихся в протезировании клапанов сердца, в 2005 году составило 290 тысяч человек. Ожидается, что эта цифра должна утроиться к 2050 году и составить 850 тысяч человек (Yacoub M.H. et al. 2005).

Индустрия протезов клапанов сердца является современной, быстро развивающейся отраслью. Прирост рынка таких протезов составляет примерно 5% в год, при этом во всем мире продажи достигают 300 тысяч изделий в год. Финансовая сторона вопроса также является весьма существенной - мировые продажи на рынке протезов клапанов возросли с 910 миллионов долларов в 2002 году до 1 миллиарда долларов уже в 2005 году (Vesely I., 2005).

Несмотря на то, что качество, дизайн и свойства протезов клапанов сердца постоянно совершенствуются, они не могут сравниться по своим свойствам с нативными клапанами. Наиболее частыми осложнениями после имплантации механических протезов являются тромбоэмболии (профилактика которых требует проведения постоянной антикоагулянтной терапии), сопряженные с этой терапией кровотечения, неудовлетворительные гемодинамические параметры протезов и протезный эндокардит. Применение биологических протезов позволило решить некоторые из этих осложнений, однако их применение связано с развитием кальцификации и биодеградации (требующих репротезирования через 10-15 лет) и с протезным эндокардитом (Бобылев Д.О. и соавт., 2011; Mendelson K. et al., 2006). Ни один из предложенных в настоящее время типов протезов не имеет возможности роста вместе с ростом тела реципиента, что особенно актуально для детской хирургии пороков клапанов сердца, вследствие чего такие пациенты требуют реоперации через определенное время (Barili F. et al., 2009).

Необходимость устранения этих осложнений, а также максимального приближения

к структуре и функции естественных клапанов сердца, диктует потребность в осуществлении следующего шага в разработке и производстве протезов клапанов сердца. Этим логическим шагом является тканевая инженерия (Yacoub M.H. et al., 2004).

Создание клапана посредством тканевой инженерии является комбинацией сложных задач, ключом к решению которых служит полное и глубокое понимание структуры и функции клапана. Нормальный клапан состоит из специализированных клеток и внеклеточного (экстрацеллюлярного) матрикса, способных к ответу на различные механические нагрузки и воздействия и, как следствие, к ремоделированию (Rabkin-Aikawa E. et al., 2004). Открываясь и закрываясь 40 миллионов раз в год в течение всей жизни, клапан сердца от раза к разу подвергается изменениям в форме и размерах, нагрузке на створки и поддерживающие клапан структуры (Schoen F.J., 2008). Клапан сердца, изготовленный посредством тканевой инженерии, должен не только успешно адаптироваться к этим деформациям, но также обладать соответствующими гибкостью, прочностью, быть легко имплантируемым, долговечным, устойчивым к инфекции, атромбогенным и, что особенно актуально для детской кардиохирургии, обладать способностью к ремоделированию и росту вместе с ростом других структур сердца (Apte S.S. et al., 2011).

Тканевая инженерия является новой, привлекательной для инвестиций и быстро развивающейся отраслью. Мировое медицинское сообщество уделяет большое внимание этому направлению. В признанных пионерами в области медицинских исследований и разработок клиниках и лабораториях проводятся многочисленные исследования, направленные на получение тканеинженерных конструкций с оптимальными свойствами, многие исследования перешли в стадию преклинических, а некоторые достигли клинической фазы.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования явилась разработка способа получения тканемодифицированного аортального гомографта с применением методов тканевой инженерии, структура и свойства которого были бы близки к нативному корню аорты человека.

Задачи исследования:

1. Разработать эффективный протокол децеллюляризации створок аортального клапана и стенки восходящей аорты с использованием комбинированного детергентно-ферментного метода.
2. Оценить морфологические свойства полученного децеллюляризованного аортального гомографта в сравнении с нативным корнем аорты.
3. Оценить биомеханические свойства полученной бесклеточной матрицы корня аорты в сравнении с нативным корнем аорты.
4. Разработать биореактор, модулирующий ряд физиологических условий функционирования аортального клапана для рецеллюляризации децеллюляризованного аортального гомографта.
5. Разработать метод рецеллюляризации полученного бесклеточного каркаса корня аорты человеческими мультипотентными стволовыми клетками и оценить его эффективность.

Научная новизна

Разработан новый эффективный протокол децеллюляризации аортальных гомографтов и проведена его апробация.

Впервые проведена комплексная оценка биомеханических и морфологических свойств полученных по разработанному методу децеллюляризации графтов в сравнении с нативным корнем аорты. Уточнены морфологические и биомеханические свойства нативной стенки восходящей аорты и створки аортального клапана.

Выполнена оценка степени влияния разработанного протокола децеллюляризации на возможность рецеллюляризации мультипотентными стволовыми клетками человека.

Разработан новый оригинальный биореактор для рецеллюляризации корня аорты. Определены оптимальные условия заселения и культивирования мультипотентных стволовых клеток на бесклеточной матрице корня аорты в условиях разработанного биореактора.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан новый эффективный протокол децеллюляризации корня аорты человека. Полученная бесклеточная матрица может быть успешно использована для дальнейшего

заселения аутологичными стволовыми клетками реципиента в условиях проточного биореактора. В дальнейшем, подобного рода модифицированные графты могут быть использованы для более эффективного хирургического лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе у детей. Протезы клапанов сердца, созданные по разрабатываемому методу, могут быть использованы в ходе таких операций, как протезирование аортального клапана, протезирование восходящей аорты клапаносодержащим кондуитом, операции Росса.

Результаты настоящей работы могут служить основой для проведения дальнейших преклинических исследований в области разработки нового вида тканемодифицированных заменителей клапанов сердца, соединяющих в себе преимущества существующих в настоящее время механических и биологических протезов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Метод децеллюляризации позволяет получить тканеинженерную трехмерную конструкцию (матрицу), которая может в дальнейшем служить основой для разработки нового вида протезов клапанов сердца.
2. Получаемая матрица не содержит клеток и клеточного дебриса, и поэтому не несет на себе антигенную нагрузку, которая при имплантации *in vivo* влияет на скорость развития дегенеративных изменений.
3. Децеллюляризованный аллогraft, полученный по авторской методике, обладает достаточными прочностными характеристиками для дальнейших преклинических испытаний *in vivo*.
4. Поверхность бесклеточной трехмерной матрицы корня аорты может являться субстратом роста и развития стволовых клеток человека и клеточных линий.
5. Моделирование параметров центральной гемодинамики при помощи биореактора улучшает рецеллюляризацию матрицы стволовыми клетками человека.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждена на основе анализа проводимых по настоящей теме исследований в мире. Анализ исследований выполнялся с использованием англоязычной текстовой базы данных медицинских и биологических публикаций PubMed, созданной Национальным центром биотехнологической

информации (NCBI) на основе раздела «биотехнология» Национальной медицинской библиотеки США. Достоверность результатов определяется репрезентативным количеством проведенных экспериментов, применением современных методов морфологического анализа, анализа биомеханических свойств и методов математической статистики. Результаты морфологических и молекулярно-генетических исследований были подвергнуты экспертному анализу с их оценкой независимыми высококвалифицированными врачами-патоморфологами и молекулярными биологами.

В работе приводятся качественные и убедительные иллюстрации полученных результатов. Полученные методики и протоколы апробированы в эксперименте с использованием трупных донорских тканей корня аорты человека и мультипотентных человеческих стволовых клеток.

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных результатов диссертаций, и 5 тезисов докладов. Материалы диссертации были представлены на собраниях проблемных комиссий института сердечно-сосудистой хирургии и института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

По теме научно-исследовательской работы диссертант стал победителем конкурса на соискание именной стипендии ОАО «Сбербанк России» и «Фонда Алмазова» (2013), проходил стажировку в г. Лейпциг (Германия).

Результаты диссертации внедрены в лекции и практические занятия по клинической кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России и ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 108 страницах текста компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания методов исследования (глава 2), результатов работы (глава 3) и их обсуждения (глава 4), выводов и списка литературы, содержащего 176 источников. Текст диссертации иллюстрирован 3 таблицами и 29 рисунками.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

Забор материала

Створки аортального клапана и участок восходящей аорты длиной 5 см забирались единым блоком с фрагментом миокарда левого желудочка. Забор осуществлялся во время проведения секционного исследования на базе патологоанатомических отделений согласно разрешению Минздравсоцразвития России и РАМН (приказ №596/76, рег. №10330 от 11.09.2007 г., приказ №223н/38 от 06.05.2008 г.). Гомографты извлекались от доноров с неработающим сердцем с давностью смерти не более 12 ч.

После изъятия сердца во время патологоанатомического исследования производилось отсечение выходного отдела левого желудочка с участком восходящей аорты длиной 5 см от окружающих тканей. Препарат обрабатывался раствором хлорида натрия (физиологический раствор) (БиоЛот, Россия) для эвакуации крови и сгустков и помещается в стерильный контейнер объемом 100 мл, содержащий фосфатно-солевой буферный раствор без ионов кальция и магния (ФСБ Ca-/Mg-) (БиоЛот, Россия) в сочетании с антибактериальными средствами (Jashari R. et al., 2005). Контейнер доставлялся в лабораторию и помещался в холодильник при +4° С на срок не менее 24 ч для стерилизации.

Выделение гомографта производилось в специальном помещении, в ламинарном шкафу 2-го класса. Для проведения исследований в биореакторе использовался цельный корень аорты, предварительно очищенный от окружающих тканей, и соответствовавший критериям включения в исследование. Для проведения исследований биомеханических свойств створок аортального клапана и участков восходящей аорты, а также для исследований на этапе поиска эффективного протокола децеллюляризации, начальных этапов рецеллюляризации производилось исследование отдельных структур корня аорты. Для этого гомографт рассекался по комиссуре между правой коронарной и некоронарной створками с использованием коронарных инструментов (пинцет и ножницы), и производилась оценка макроскопических свойств створок клапана и аорты. К критериям оценки качества гомографтов относили атеросклеротические изменения и кальциноз створок, фиброзного кольца и восходящей аорты, фиброз створок и комиссур, фенестрации и вегетации на створках, расширение синусов Вальсальвы. В случае отсутствия вегетаций и фенестраций, а также отсутствия или малой выраженности остальных признаков, гомографт признавался годным к дальнейшему исследованию. Все

створки отсекались от фиброзного кольца клапана, из восходящей аорты выкраивались 2 полоски размером 5x2 см. Оставшаяся часть гомографта утилизировалась. Створки аортального клапана и участки восходящей аорты обильно отмывались в стерильном ФСБ Са-/Mg- от крови, сгустков и инородных тел. Одна створка аортального клапана и один участок аорты забирались на гистологический контроль – помещались в контейнер объемом 25 мл со стерильным ФСБ Са-/Mg- и антибиотиками и хранились в холодильнике при +4°C, либо сразу фиксировались в формальдегиде. Остальные створки аортального клапана и участок аорты после отмывания готовы к последующим исследованиям.

Поиск протокола децеллюляризации

Методика децеллюляризации гомографтов включала в себя ряд последовательных действий, приводящих к полной элиминации клеток из тканей при условии минимального влияния на экстрацеллюлярный матрикс.

На основании анализа литературы за основу нами был взят протокол децеллюляризации створок аортального клапана, описанный Erwin Rieder в 2005 году (Reider E. Etal., 2005). Этот протокол включал в себя изолированное использование дезоксихолата натрия в небольшой концентрации. Результаты, описанные в этом исследовании, не совпали с результатами, полученными в процессе его апробирования нами. Не достигнув успеха, мы приступили к поиску оптимального протокола децеллюляризации эмпирическим путем, используя различные компоненты и варьируя их концентрации. В итоге нами был получен оригинальный эффективный протокол децеллюляризации как створок аортального клапана, так и фрагментов восходящей аорты. В целом, в процессе поиска оптимального способа децеллюляризации на каждом из этапов протокола нами использовались описанные ниже реактивы.

Первый этап децеллюляризации включает обработку тканей с целью разрушения клеточных мембран при помощи комбинации детергентов (для створки аортального клапана), и при помощи комбинации детергентов и трипсина (для восходящей аорты). На этом этапе использовались следующие реагенты: трипсин (Самсон-Мед, Россия; Gibco, США) в различных концентрациях, додецилсульфат натрия (Sigma, США) в различных концентрациях, дезоксихолат натрия (Sigma, США) в различных концентрациях, 0,2% этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (БиоЛот, Россия). Все растворы готовились на основе стерильного ФСБ Са-/Mg- (БиоЛот, Россия). Этот этап децеллюляризации осуществлялся в течение 24-48 ч при +37°C в условиях постоянного перемешивания.

Второй этап децеллюляризации заключается в разрушении нуклеиновых кислот (как ДНК, так и РНК). Для этого использовались растворы ДНКазы в концентрации 150 ЕД/мл и РНКазы в концентрации 100 ЕД/мл (БиоЛот, Россия) вместе с раствором 50 Ммоль хлорида магния ($MgCl_2$) (БиоЛот, Россия), и 0,2% ЭДТА. В качестве пермеабиллизатора в раствор добавлялся 0,1% Тритон X-100 (Sigma, США). Этап разрушения нуклеиновых кислот проводился в течение 24-48 ч при $+37^{\circ}C$ в условиях постоянного перемешивания (Reider E. Etal., 2005).

Третий этап децеллюляризации – отмывание образцов тканей от реагентов и клеточного дебриса. Для этого участки аорты и створки аортального клапана последовательно помещались в 3 стерильные емкости по 50 мл с ФСБ Са-/Mg- (время экспозиции в каждой из них – 15 минут при комнатной температуре), а затем перемещались в емкость с 50 мл ФСБ Са-/Mg- на 24-72 ч при $+4^{\circ}C$ в условиях постоянного перемешивания (Reider E. Etal., 2005).

Хранение тканей производилось в растворе ФСБ Са-/Mg- с добавлением антибиотиков в комбинации, описанной выше (Jashari R. et al., 2005).

Оценка результатов производилась с помощью использования гистологических и иммуногистохимических окрасок. Для гистологического исследования использовались окраска гематоксилином-эозином и окраска по Ван Гизону. Эффект децеллюляризации оценивался по количеству ядер, оставшихся после обработки тканей, по сравнению с контрольной створкой аортального клапана или участком аорты того же донора. Также производилась оценка наличия или отсутствия повреждений, разрывов, пустот экстрацеллюлярного матрикса по сравнению с контролем. Для иммуногистохимического исследования применялись окраски к альфа-гладкомышечному актину и CD-34. Позитивная окраска тканей считалась неудовлетворительным эффектом децеллюляризации, негативная окраска свидетельствовала об эффективной и успешной децеллюляризации.

Для оценки наличия нуклеиновых кислот в образцах тканей использовалась окраска красителем DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид), тропным к ДНК и РНК фрагментов нефиксированных тканей, и визуализируемым в проходящем поляризованном свете. Отсутствие характерного свечения ядер клеток в поляризованном свете считалось удовлетворительным эффектом выполненного протокола децеллюляризации.

Для определения количества остаточных молекул нуклеиновых кислот в тканях исследуемой и контрольной группы использовались фрагменты нативных створок аортального клапана (n=5), децеллюляризованных створок (n=5), нативных участков аорты (n=5) и участков стенки восходящей аорты после децеллюляризации (n=5).

Концентрацию нуклеиновых кислот исследовали с помощью спектрофотометрии на аппарате NanoDrop 1000 (Thermo, США).

Биомеханические исследования

После того, как были найдены эффективные протоколы децеллюляризации створок аортального клапана и участков восходящей аорты, мы исследовали влияние полученных протоколов на биомеханические свойства структур корня аорты. Исследования проводили на универсальной разрывной машине Instron 5543 (Instron, США).

Исследовались две группы створок аортальных клапанов: створки аортального клапана, обработанные по протоколу децеллюляризации (исследуемая группа – 22 образца), и необработанные нативные створки (контрольная группа – 11 образцов).

В продольном и поперечном направлении, через центральную часть каждой створки, вырезалась полоска ткани длиной 17 мм и шириной 10 мм для исследования в продольном направлении и 15 мм и 10 мм соответственно для исследований в радиальном направлении. Для измерения толщины створки нами использовался цифровой микрометр (DigitalMicrometers, Великобритания). Мы измеряли толщину створки в области свободного края центральной зоны рядом с бугорком Аранци. Края полученного участка створки прошивались единичным узловым швом нитью Prolen 6/0 (Ethibond, США) с двух сторон на расстоянии 1 мм от края. С помощью швов створки расправлялись и фиксировались за края в рабочих захватах разрывной машины. После фиксации в аппарате производилось преднатяжение измеряемого образца до нагрузки 0,05 Н. В этом состоянии измерялась начальная длина (L_0) тестируемого участка створки, и обнулялись показания разрывной машины. После этого производилось растяжение образца со скоростью 1 мм/с до полного его разрушения.

Во время испытания автоматически фиксировалась удельная сила, прилагаемая к образцам, необходимая для их растяжения (F , Н). После разрушения аппарат фиксировал расстояние между рабочими захватами (L) и автоматически рассчитывал деформацию створки при растяжении (ΔL) по формуле:

$$\Delta L = \frac{L}{L_0}$$

Результаты исследований обеих групп регистрировались и обрабатывались на компьютере с помощью прилагаемого программного обеспечения Bluehill2. На основании полученных данных рассчитывалось напряжение и модуль Юнга.

Напряжение (σ , МПа) – физическая величина, равная удельной силе, приложенной к

площади поперечного сечения створки. Вычислялось по формуле:

$$\sigma = \frac{F}{S}$$

По полученным данным строились кривые зависимости напряжения/деформации растяжения, для линейной части которых был рассчитан модуль Юнга (Е, МПа):

$$E = \frac{\sigma}{\Delta L}$$

Модуль Юнга (модуль упругости) является величиной, комплексно оценивающей упруго-эластические свойства исследуемых тканей.

Биомеханические свойства восходящей аорты исследовались аналогичным образом. На разрывной машине изучались участки восходящей аорты контрольной (20 образцов) и исследуемой (20 образцов) групп длиной 3 см и шириной 1 см.

Для исследования прочности шва стенки аорты использовались участки восходящей аорты, иссеченные продольно, тех же размеров, что и для теста свойств стенки аорты: длина образца 3 см, ширина – 1 см. Контрольную и исследуемую группы составили по 10 образцов. С применением стандартного хирургического инструментария все образцы прошивались швом нитью Prolen 4/0 (Ethibond, США) на расстоянии 2 мм от края с двух сторон. Нити фиксировались в зажимах разрывной машины у края образца. Дальнейшее исследование проводилось по протоколу, описанному выше. Регистрировались относительное удлинение, максимальная сила, максимальное напряжение, рассчитывался модуль Юнга. Приведенные показатели исследуемой группы сравнивались с аналогичными показателями группы контроля. Степень достоверности межгрупповых различий средних значений оценивалась с помощью непарного t-теста Стьюдента с двухсторонним распределением.

Конструкция биореактора

Для проведения исследований на цельном корне аорты нами был сконструирован простой в своем исполнении оригинальный биореактор. Это устройство предназначено для проведения как децеллюляризации, так и рецеллюляризации. Исследования проводились в динамических условиях с возможностью управления скоростью потока, давления в системе и модулирования пульсирующего потока. Непрерывно контролировалась температура и концентрация углекислого газа в окружающем воздухе.

Конструкция биореактора представляла собой замкнутую систему, по которой циркулирует жидкость. Основными звеньями этой системы являлись контейнер-резервуар

со средой, контур, контейнер с помещенным внутрь него корнем аорты донора, водяная баня (для этапа децеллюляризации) и насос, с помощью которого осуществлялась перфузия.

Для осуществления перфузии применялась роликовая помпа от аппарата искусственного кровообращения (Stockert, Германия). Помпа обладала возможностью регулирования объемной скорости потока. За счет свойств роликовой помпы, а также за счет создания периферического сопротивления потоку с помощью уменьшения диаметра выводной трубки петли (при помощи наложения зажима на нее) во время мониторингирования отмечалась характерная для пульсирующего потока кривая, что позволяет говорить о том, что исследования проводились в условиях пульсирующего потока жидкости. Для мониторингирования параметров перфузии к системе подключался многопараметрический анестезиологический портативный монитор (Datex, Великобритания). Контролировалось давление в системе, оценивался характер кривой давления.

Из контейнера-резервуара, крышка которого оснащена входным и выходным отверстиями жидкость с помощью насоса забиралась в контур, который проходил через водяную баню (Thermo, США) и соединялся с пластиковым контейнером, внутри которого был фиксирован гомографт. Далее по контуру жидкость возвращалась в контейнер-резервуар. Кроме отверстий для входа и выхода жидкости крышка контейнера оснащалась двумя отверстиями для вентиляции, со встроенными в них бактериальными воздушными фильтрами (IntAirMedical, Франция).

Децеллюляризация в биореакторе

С использованием биореактора возможно проведение децеллюляризации цельного корня аорты.

Перед началом работы производится стерилизация контура, резервуара и контейнера с помощью 96% спирта. Контур промывался раствором спирта на небольших оборотах насоса в течение 60 минут. После этого спирт сливался, а контур дважды отмывался стерильной дистиллированной MilliQ водой (Millipore, США).

После этого в стерильных условиях в ламинарном шкафу 2-го класса (KojAir, Финляндия) с использованием стандартного хирургического инструментария (Aescular, Германия) и нити Prolen 4-0 (B. Braun, Германия) донорский гомографт непрерывным обвивным швом подшивался к стерильной ПВХ-манжете, закрепленной на внутренней поверхности крышки контейнера. Одна створка и участок восходящей аорты отсекались и

консервировались для контроля. Контейнер включался в петлю, после чего начинался процесс децеллюляризации.

Вначале производилось трехкратное отмывание гомографта в Milli-Q воде по 30 минут при комнатной температуре со скоростью 1-1,2 л/минуту. Далее вода сливалась, после чего начиналась перфузия раствором детергентов, содержащим 0,075% раствор додецилсульфат^г натрия (SDS), 0,075% раствор дезоксихолата натрия (SDC) и 0,02% ЭДТА. Скорость перфузии составляла 1,5-1,7 л/минуту, при +37°C в течение 24 часов, и при давлении жидкости в контуре 50-60/0–10 мм рт. ст.

Спустя сутки раствор детергентов сливался, гомографт трижды по 45 минут отмывался водой при комнатной температуре со скоростью 2 л/минуту. После этого контур снова заполнялся раствором детергентов, и обработка гомографта повторялась вновь при указанных условиях в течение 24 часов. После второго этапа обработки детергентами повторялось трехкратное отмывание в воде. Далее контур заполнялся питательной средой М-199 (Gibco, США), содержащей ДНКазу (БиоЛот, Россия) в концентрации 200 ЕД/мл, РНКазу (БиоЛот, Россия) 100 ЕД/мл, 0,1% тритон Х-100 (Sigma, США), 1% пенициллин/стрептомицин (Gibco, США). Перфузия этим раствором проводилась в течение 24 часов при +37°C с объемной скоростью 2 л/мин и давлением в системе 60/10 мм рт. ст. Спустя сутки, трижды по 45 минут при комнатной температуре производилось отмывание гомографта стерильным раствором фосфатно-солевого буферного раствора (БиоЛот, Россия), после чего он помещался на хранение в фосфатно-солевой буферный раствор с антибиотиками.

Рецеллюляризация структур корня аорты

Процесс рецеллюляризации производили с использованием мультипотентных стволовых клеток красного костного мозга или жировой ткани, первичные культуры которых были установлены из образцов, взятых у пациентов ФГБУ ФМИЦ.

Стволовые клетки красного костного мозга получали из антикоагулированного при помощи К₂-ЭДТА аспирата с использованием метода центрифугирования в градиенте плотности. Жировую ткань подвергали ферментации равным объемом 0,075% раствора коллагеназы III и гиалуронидазы (Sigma, США), суспензию клеток отмывали центрифугированием, клеточный осадок ресуспензировали в питательной среде и инкубировали 24 часа. После этого производили отмывание и подсчет МСК. Инкубирование клеток производилось в стандартных условиях. После формирования культивируемыми клетками субконфлюэнтного монослоя, производили пассажи клеток

до достижения необходимого для рецеллюляризации количества МСК. В экспериментах использовали культуры 3-4 пассажей (P3–P4).

Рецеллюляризация выполнялась в статичных условиях и при помощи биореактора. В статичных условиях для исследования исследовалась возможность рецеллюляризации только створок аортального клапана, в экспериментах с биореактором мы исследовали цельный децеллюляризованный корень аорты.

Для рецеллюляризации в статичных условиях использовали по две створки каждого образца, причем одну из них – в качестве контроля. Рецеллюляризацию осуществляли простым методом нанесения с помощью серологической пипетки суспензии клеток в 2 мл питательной среды на поверхность створки, помещенной в лунку 6- или 12-тилуночного планшета (Falcon, США). Для рецеллюляризации использовали разное количество клеток – 4 створки были заселены МСК в количестве 200 тыс. клеток каждая, 4 створки – 400 тыс. клеток на каждый образец, еще 4 створки были рецеллюляризованы клетками в количестве 800 тыс. клеток на каждый образец, и еще 2 створки были заселены по 1600 тыс. клеток каждая. Планшеты помещали в инкубатор в стандартные для культивирования клеток условия. Образцы, заселенные 200 тыс., 400 тыс. и 800 тыс. клеток фиксировали в формалине и отправляли на гистологическое исследование на 5-й, 8-й, 10-й и 15-й день культивирования. 2 створки, которые были заселены 1600 тыс. клеток каждая, были отправлены на гистологическое исследование на 8-й и 15-й день.

Для повышения адгезии клеток на поверхность створки и увеличения вероятности проникновения МСК внутрь структуры створки аортального клапана для 3 образцов был применен метод центрифугирования. Для этого планшеты, содержащие 3 нулевых контроля, 3 контрольных створки аортального клапана (после децеллюляризации) и 3 створки с нанесенными клетками в количестве 400 тыс. клеток на каждую створку помещали в центрифугу (Thermo, США) и центрифугировали в течение 7 минут при +25°C 1300 об/мин. После этого планшеты помещали в инкубатор на 7 суток. По истечении этого времени образцы фиксировали в формалине и отправляли на гистологическое исследование.

Для рецеллюляризации в биореакторе нами использовался цельный корень аорты. После проведения процедуры децеллюляризации по разработанному протоколу, гомографт длительное время отмывался в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением комбинации антибиотиков, описанной выше. Раствор менялся 6 раз каждые 12 часов, отмывание проводилось в условиях постоянного перемешивания с использованием шейкера (Terumo, Бельгия). После отмывания гомографт на 24 часа помещался в питательную среду, содержащие все необходимые компоненты для роста

мультипотентных стволовых клеток (см. выше).

Далее в условиях стерильности в ламинарном шкафу гомографт подшивался к ПВХ-манжете биореактора непрерывным швом нитью Prolen 3/0 (B.Braun, США), контейнер встраивался в петлю циркуляции. Контейнер с гомографтом, контейнер-резервуар, заполненный 700 мл питательной средой для роста мультипотентных стволовых клеток, большая часть петли помещались в CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония) с возможностью контроля параметров температуры (+37°C) и концентрации углекислого газа (5%). Контейнер с гомографтом внутри закреплялся на штативе в вертикальном положении. Контур заполнялся питательной средой. Далее в асептических условиях капельным способом выполнялось нанесение мультипотентных стволовых клеток красного костного мозга или жировой ткани на створки гомографта в количестве 500 тыс. клеток на каждую створку. После этапа заселения гомографт находился в статичных условиях без циркуляции среды в инкубаторе в течение 12 часов для увеличения степени адгезии стволовых клеток к поверхности створок клапана. После этого включался насос.

Результаты

Поиск протокола децеллюляризации

После проведения процесса децеллюляризации в течение 48 часов по найденному протоколу створки аортального клапана и стенка восходящей аорты становились белесыми, теряя свой первоначальный цвет. Консистенция тканей, как правило, не менялась, иногда они приобретали более «нежную» желеобразную структуру, при захвате пинцетом могли оставаться следы его рабочих поверхностей. При децеллюляризации цельного корня аорты ткани хорошо сохраняли свою форму, при прошивании основания гомографта (например, при подшивании его к силиконовой или ПВХ манжете биореактора) степень устойчивости к прорезыванию нитью тактильно не отличалась от таковой при работе с нативным корнем аорты.

В процессе работы стало очевидно, что часто описываемые в литературе протоколы децеллюляризации, основанные на использовании детергентов (Cebotari S. et al., 2002; Fang N.T. et al., 2007; Rieder E. et al., 2005) (первый этап), не способны полностью устранить клетки из структур створки клапана и стенки аорты. В поисках эффективного протокола децеллюляризации мы проводили определение минимально необходимых концентраций и времени воздействия реагентов для достижения эффекта децеллюляризации и оценивали клеточный состав тканей путем подсчета оставшихся ядер

клеток при их окраске гематоксилином-эозином и с использованием других методов, описанных выше.

За основу была взята методика, описанная Erwin Rieder в 2005 году (Rieder E. et al., 2005). В этом исследовании на первом этапе децеллюляризации створки аортального клапана и участка аорты использовался только 0,05% раствор дезоксихолата натрия. Мы апробировали данную методику, однако полученные результаты показали, что в структуре створки аортального клапана и участках аорты сохранялось до 90% ядер клеток, что является неудовлетворительным результатом. Поэтому была проведена модификация протокола децеллюляризации.

Итоговый эффективный протокол децеллюляризации створки аортального клапана выглядит следующим образом:

Первый этап (разрушение клеточных мембран): 0,1% додецилсульфат натрия + 0,1% дезоксихолат натрия + 0,2% ЭДТА в течение 48 ч при +37°C в условиях постоянного перемешивания.

Второй этап (элиминация нуклеиновых кислот): ДНКаза 150 мкг/мл + РНКаза 100 мкг/мл + 0,2% ЭДТА + 50 ммоль $MgCl_2$ + 0,1% Тритон X-100 в течение 24 ч при +37°C в условиях постоянного перемешивания.

Третий этап (отмывание матрицы от детергентов и клеточного дебриса): отмывание тканей в 3 стерильных емкостях с 50 мл с ФСБ Ca^{2+}/Mg^{2+} (время экспозиции в каждой из них – 15 минут при комнатной температуре), а затем перемещение в емкость с 50 мл ФСБ Ca^{2+}/Mg^{2+} на 24 часа при +4°C в условиях постоянного перемешивания.

Хранение гомографта после децеллюляризации производилось в растворе ФСБ Ca^{2+}/Mg^{2+} с добавлением антибиотиков при +4°C.

Далее мы апробировали полученный эффективный протокол децеллюляризации створок аортального клапана для обработки участков восходящей аорты. При окраске гематоксилином-эозином препаратов стенки аорты, обработанной таким способом, была выявлена сохранность ядер всех слоев стенки аорты. Учитывая тот факт, что минимально достаточные для децеллюляризации створки аортального клапана концентрации и комбинации детергентов не способны устранить клетки из структуры стенки восходящей аорты, мы приняли решение отказаться от единого протокола децеллюляризации створок аортального клапана и аорты, и проводить децеллюляризацию этих тканей по разным протоколам.

После проведенных исследований мы выявили, что итоговый протокол

децеллюляризации аортальной стенки отличается от протокола децеллюляризации створок аортального клапана необходимостью предварительной обработки тканей 0,5% трипсином и 0,2% ЭДТА в течение 5 ч.

Первый этап (разрушение клеточных мембран): А. 0,5% трипсин + 0,2% ЭДТА в течение 5 ч при +37°C в условиях постоянного перемешивания.

Б. 0,1% додецилсульфат натрия + 0,1% дезоксихолат натрия + 0,2% ЭДТА в течение 48 ч при +37°C в условиях постоянного перемешивания.

Второй этап (элиминация нуклеиновых кислот): ДНКаза 150 мкг/мл + РНКаза 100 мкг/мл + 0,2% ЭДТА + 50 ммоль MgCl_2 + 0,1% Тритон X-100 в течение 24 ч при +37°C в условиях постоянного перемешивания.

Третий этап (отмывание матрицы от детергентов и клеточного дебриса): отмывание тканей в 3 стерильных емкостях с 50 мл ФСБ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (время экспозиции в каждой из них – 15 минут при комнатной температуре), затем перемещение в емкость с 50 мл ФСБ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ на 24 ч при +4°C в условиях постоянного перемешивания.

Хранение тканей производилось в растворе ФСБ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ с добавлением антибиотиков при +4°C.

Нативные створки аортального клапана и восходящей аорты до обработки (контроль) и после обработки по найденным протоколам после окраски по Ван Гизону и на эластин не выявили никаких значимых различий. Это можно трактовать как отсутствие влияния децеллюляризации на структуру соединительной ткани створок аортального клапана и стенки восходящей аорты.

Окраска препаратов створки аортального клапана и стенки аорты, обработанных по нашим протоколам, на альфа-гладкомышечный актин и маркер CD34, демонстрировало отсутствие окрашивания исследуемых образцов тканей по сравнению с контролем, что указывает на устранение из структуры тканей гладкомышечных волокон и эндотелиальных клеток.

Окрашивание створок аортального клапана красителем DAPI, тропным к нуклеиновым кислотам, показало, что створка, подвергнутая процессу децеллюляризации, окрашивается негативно. При этом в контрольной нативной створке определяется характерное свечение ядер в поляризованном свете.

После децеллюляризации детергентным способом и последующей обработки нуклеазами в течение 24 часов при спектрофотометрии исследуемых образцов определяется отсутствие или следовые количества (5%) нуклеиновых кислот по

сравнению с контрольными необработанными образцами. Это свидетельствует о полном и глубоком очищении экстрацеллюлярного матрикса не только от клеток, но и от клеточного дебриса, ядер и цепей нуклеиновых кислот.

Результаты биомеханических тестов

Удаление клеточных элементов из структуры стенки восходящей аорты и створки аортального клапана не значительно влияет на толщину стенки. Так, этот показатель для створки аортального клапана в контрольной группе составил $0,36 \pm 0,11$ мм, в исследуемой группе $0,31 \pm 0,09$ мм ($p=0,47$). Толщина стенки аорты составила для нативной ткани $1,41 \pm 0,24$ мм, толщина стенки восходящей аорты после децеллюляризации $1,34 \pm 0,18$ мм ($p=0,16$).

Исследование биомеханических свойств аортального клапана выполнялось в двух направлениях: продольном и радиальном. При растяжении фрагментов створок аортального клапана в продольном направлении относительная деформация растяжения в контрольной группе составила $29,18\% \pm 9,94\%$, в исследуемой группе – $25,57\% \pm 7,78\%$. При этом максимум нагрузки в контрольной группе составил $4,73 \pm 2,35$ Н, в исследуемой группе после децеллюляризации $5,96 \pm 4,1$ Н, групповые различия были статистически не значимы ($p=0,09$ и $p=0,32$ соответственно). Также не значимыми являлись различия модуля Юнга для контрольной группы ($E=4,34 \pm 2,18$ МПа) и для створок аортального клапана после децеллюляризации ($6,15 \pm 3,91$ МПа).

Растяжение створок аортального клапана в радиальном направлении также не выявило статистически значимых различий показателей биомеханических свойств ткани ($p>0,05$). При этом показатель относительного удлинения составил в контрольной группе $33 \pm 14,15\%$, в исследуемой группе $30,67 \pm 15,88\%$. Максимальная нагрузка для разрыва створки в радиальном направлении составила в контрольной группе $1,45 \pm 0,79$ Н, в исследуемой группе – $1,41 \pm 0,49$ Н. Модуль Юнга для нативных створок клапана аорты при их растяжении в радиальном направлении составил $1,32 \pm 0,68$ МПа, для створок после децеллюляризации – $1,76 \pm 0,75$ МПа.

При исследовании биомеханических свойств стенки восходящей аорты выявлены следующие результаты. При растяжении аорты в продольном направлении относительное удлинение ткани в контрольной группе составило $55 \pm 10,8\%$, в исследуемой группе – $53,33 \pm 10,82\%$. Максимум нагрузки при растяжении нативной стенки аорты составил $5,45 \pm 1,57$ Н, для стенки аорты после децеллюляризации – $3,7 \pm 1,99$ Н. Модуль Юнга составил $0,36 \pm 0,19$ МПа и $0,31 \pm 0,23$ МПа соответственно. Все межгрупповые различия

статистически не значимы ($p > 0,05$).

При тестировании прочности шва аорты нитью Prolen 4/0 отмечалось разрушение всех образцов в месте прошивания, то есть прорезывание шва. При этом выявлены статистически значимые различия между исследуемой и контрольной группами при сравнении всех биомеханических показателей ($p < 0,05$). Так, относительное удлинение образцов в контрольной группе составило $38,33 \pm 14,75\%$, а в исследуемой группе $60,33 \pm 22,58\%$. Максимальная нагрузка при разрыве составила в группе нативной аорты $2,23 \pm 0,62$ Н, в группе после децеллюляризации $2,63 \pm 1,63$ Н. Модуль Юнга составил $0,56 \pm 0,24$ МПа и $0,31 \pm 0,14$ МПа соответственно.

Рецеллюляризация створок аортального клапана в статичных условиях

После этапа децеллюляризации и отмывания реагентов створки аортального клапана заселялись мультипотентными стволовыми клетками красного костного мозга и жировой ткани. В экспериментах варьировалось количество заселяемых клеток (от 200 тыс. до 1200 тыс. клеток на одну створку), время инкубации и использование режима применения центрифугирования тотчас после заселения.

Необходимо отметить, что результаты экспериментов по рециеллюляризации створок аортального клапана в статичных условиях нельзя назвать полностью удовлетворяющими цели получить заселенную стволовыми клетками створку аортального клапана после децеллюляризации. Рецеллюляризация створок клетками в количестве 1600 тыс. клеток на одну створку привела к появлению в структуре створки участков, в которых имелись протяженные зоны, подобные монослою. Однако получить слой клеток, полностью покрывающий поверхность створки клапана, а тем более прорастающий в его толщу, не удалось. При этом срок инкубации клеток на результат не повлиял.

Также не оказало выраженного положительного эффекта применение центрифугирования сразу после рециеллюляризации. Мы предполагали, что использование центробежной силы поможет клеткам устремиться вглубь структуры ткани и закрепиться в ней, однако никаких различий в росте клеток по сравнению с обычным статичным заселением мы не увидели.

Децеллюляризация гомографта с использованием биореактора

Использование биореактора для децеллюляризации корня аорты является пригодным методом для очищения экстрацеллюлярного матрикса створок аортального клапана и его эффективного отмывания от использованных детергентов и реактивов, так как при этом применяется непрерывный поток жидкости с регулируемым давлением в контуре. Предполагая более эффективным воздействие детергентов в условиях циркуляции жидкости под давлением мы снизили концентрацию детергентов до 0,075%, и такой концентрации оказалось достаточно для успешной децеллюляризации створок.

Гистологические и иммуногистохимические исследования створок аортального клапана после этапа децеллюляризации с применением биореактора показали полное и эффективное удаление клеточных структур и клеточного дебриса из матрицы.

Рецеллюляризация в биореакторе

Применение биореактора для рецеллюляризации аортального клапана является эффективным способом получения матрицы, заселенной стволовыми клетками реципиента. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что использование биореактора в дальнейших преклинических и клинических испытаниях по получению тканеинженерного гомографта является необходимым условием.

При гистологическом исследовании створок аортального клапана, рецеллюляризация которых проводилась с использованием МСК красного костного мозга количеством 500тыс. клеток на створку с использованием биореактора, выявлено формирование монослоя клеток, покрывающих поверхность створки. Формирование монослоя отмечалось на всех створках клапана и во всех успешных случаях применения биореактора.

При этом в ряде случаев отмечалось проникновение клеток вглубь структуры створки аортального клапана. Справедливо отметить, что нам не удалось достичь результата в виде устойчивого проникновения стволовых клеток вглубь структуры створки, однако этот результат вероятно достигим при увеличении числа исходно используемых клеток и/или увеличения времени перфузии и роста клеток в биореакторе. При этом образование конфлюэнтного монослоя клеток на поверхности децеллюляризованной створки аортального клапана можно считать успешным результатом проведенного эксперимента.

Обсуждение

Нами разработаны оригинальные способы децеллюляризации как створок аортального клапана, так и восходящей аорты. Комбинация детергентов и ферментов, использованных для децеллюляризации, не является новой, однако описанный нами состав, последовательность и длительность применения компонентов, использованных в протоколах, их более низкой концентрации, использование динамических условий децеллюляризации в биореакторе позволило достичь успешного результата на этом этапе исследования.

Использование биореактора для децеллюляризации цельного корня аорты позволяет оптимизировать условия обработки гомографта. В литературе нам не встречалось описания подобного применения биореактора для обработки тканей. Применение динамичных условий, использование непрерывного потока раствора детергентов через гомографт позволяет снизить минимально эффективную концентрацию реагентов до 0,075%, и, как следствие, их негативного влияния на экстрацеллюлярную матрицу створки аортального клапана.

Нам не удалось разработать единый протокол децеллюляризации как створок аортального клапана, так и участков восходящей аорты. Это объясняется выраженным различием в гистологической структуре створок клапана и стенки восходящей аорты. Опробовав множество вариантов комбинации реагентов и длительности их воздействия, нами был сделан вывод о том, что для достижения эффекта полной децеллюляризации восходящей аорты к протоколу децеллюляризации створок аортального клапана требуется добавить 0,5% раствор трипсина. Трипсин приводит к отделению клеток от матрикса и «разрыхлению» его микроструктуры, способствует глубокому проникновению детергентов и улучшению удаления клеток из толщи сосудистой стенки на дальнейших этапах децеллюляризации. При этом действие трипсина на структуру матрикса створок аортального клапана губительно и приводит к выраженному нарушению ее микроструктуры, поэтому использование ферментов для децеллюляризации стенки аорты возможно лишь при ее отдельной обработке от створок клапана. Стоит отметить, что в литературе нам не встречалось работ, описывающих универсальный протокол децеллюляризации структур корня аорты.

Таким образом, нами был получен эффективный способ децеллюляризации, позволяющий получить матрицу корня аорты с полностью бесклеточной структурой створок аортального клапана и лишенной клеток интимы аорты. Этот метод подразумевает использование биореактора. Эффективность метода достигнута в серии из

40 экспериментов, при этом получены воспроизводимые результаты. Дальнейшие биомеханические тесты подтвердили сохранность экстрацеллюлярного матрикса структур корня аорты.

Использованные биаксиальные методы оценки прочности биологических тканей на растяжение являются стандартными, в том числе и в экспериментах с корнем аорты (Merryman W.D. et al., 2006; Auger F.A. et al., 2013). Применение разработанных нами протоколов децеллюляризации не выявило значимого влияния на биомеханические свойства створок клапана и восходящей аорты по сравнению с нативными тканями. Можно отметить небольшое, статистически незначимое увеличение эластичности створок аортального клапана в продольном направлении и снижение – в радиальном направлении. Такие параметры, как максимальная нагрузка при разрыве, напряжение при растяжении и модуль упругости створок аортального клапана и участков восходящей аорты не отличались от таких же параметров необработанных тканей. Удовлетворительные результаты этих тестов позволяют предположить минимальное воздействие предложенного протокола на структуру экстрацеллюлярного матрикса и относительную механическую стабильность гомографта. В связи с этим мы небезоснованно можем надеяться на то, что обработанный по нашей методике гомографт после имплантации сможет выполнять свою функцию и успешно противостоять гемодинамическим нагрузкам в физиологических условиях до тех пор, пока не произойдет полного замещения структур экстрацеллюлярного матрикса на собственные структуры реципиента.

Применение биореатора нашей конструкции позволило получить устойчивый рост клеток в виде конфлюэнтного монослоя на поверхности створок клапана и восходящей аорты тканеинженерного гомографта. Образование такого слоя может снизить тромбогенные свойства графта при его дальнейшем использовании в преклинических исследованиях. Однако следует отметить, что полученный результат не является оптимальным, так как нам не удалось достичь устойчивого воспроизводимого эффекта миграции стволовых клеток вглубь структуры матрикса. Это явление является важным с точки зрения дальнейшего ремоделирования гомографта, репарации и реструктуризации компонентов экстрацеллюлярной матрицы. В единичных случаях было отмечено наличие клеток в толще структуры клапана. Возможно, модификация условий рецеллюляризации в дальнейших экспериментах позволит добиться более отчетливого эффекта репопуляции стволовыми клетками. Например, потенциально благоприятными могут стать увеличение количества используемых для рецеллюляризации клеток, длительности перфузии, улучшение степени отмывания графта от реагентов, снижение концентрации используемых антибактериальных препаратов, профилактика бактериальной инфекции.

Несмотря на фундаментальный характер проведенного диссертационного исследования, оно имеет большое практическое значение. Тканеинженерные децеллюляризованные гомографты, заселенные аутологичными клетками реципиента, могут стать альтернативой используемым в настоящее время в сердечно-сосудистой хирургии протезам клапанов сердца. Их применение возможно во время таких операций, как протезирование аортального клапана, протезирование восходящей аорты и аортального клапана клапаносодержащим кондуитом (Операция Бенталла), операции Росса и других реконструкций выходного отдела левого желудочка, надкоронарного протезирования аорты.

Все описанные выше свойства конструируемого гомографта являются важными для нормального долговечного функционирования протеза клапана сердца. Нарушение любого из этих свойств может привести к нарушению нормального функционирования протеза и возможным критическим последствиям для реципиента. Тщательный, взвешенный подход к производству и оценке качества продукта вряд ли нужно мотивировать.

Очевидно, что для дальнейших испытаний необходимо проведение длительных преклинических исследований, которые способны комплексно оценить все качества разрабатываемого графта. Испытания в условиях *in vivo* являются определяющими для оценки перспективности данного направления. Организм животного является идеальным биореактором, в котором можно длительное время наблюдать за поведением и изменениями, происходящими с имплантированным клапаном. Однако накопленный к настоящему времени опыт, а также выполненные исследования и испытания разработанного тканеинженерного протеза позволяют надеяться на то, что успех дальнейших экспериментов достигим в ближайшей перспективе.

Выводы

1. Применение разработанного комбинированного детергентно-ферментного метода децеллюляризации позволяет эффективно удалить клетки и нуклеиновые кислоты из структур аортального клапана и стенки восходящей аорты.
2. Использование оригинального биореактора позволяет снизить минимально необходимую концентрацию детергентов для получения бесклеточной трехмерной матрицы аортального клапана.
3. Разработанный протокол децеллюляризации позволяет сохранить естественную структуру экстрацеллюлярного матрикса створки аортального клапана и восходящей аорты.
4. Разработанный протокол децеллюляризации достоверно не влияет на биомеханические свойства стенки аорты и створки аортального клапана.
5. Применение разработанного биореактора собственной конструкции позволяет улучшить адгезию и стимулирует рост стволовых клеток на поверхности створок тканеинженерного аортального клапана.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Лаврешин, А.В. Тканевая инженерия клапанов сердца: децеллюляризация алло- и ксенографтов / А.В. Лаврешин, Д.И. Курапеев, С.В. Анисимов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2012. - Т. VII. - № 1. - С. 34-39.
2. Лаврешин, А.В. Децеллюляризация аортальных гомографтов и их морфологическая оценка / А.В. Лаврешин, А.С. Насрединов, Д.И. Курапеев, С.В. Анисимов, Л.Б. Митрофанова, О.В. Бещук // Гены&Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). - 2014. – Т. IX. - No 1. – С. 64-71.
3. Насрединов, А.С. Децеллюляризованные артерии пуповины человека как основа тканеинженерных кровеносных сосудов малого калибра / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов, Д.И. Курапеев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2013. – Т. VIII. - No 1. – С. 66-71.
4. Насрединов, А.С. Тканевая инженерия кровеносных сосудов: способы совмещения клеток и носителя / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин // Гены & Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). - 2014. – Т. IX. - No 1. – С. 23-34.
5. Насрединов, А.С. Артерии пуповины человека сохраняют свои биомеханические

- свойства после децеллюляризации / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, Е.А. Лебедева, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов, Д.И. Курапеев // Гены & Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). - 2014. - Т. IX. - № 2. - С. 80-86.
6. Насрединов, А. С. Способ получения экстрацеллюлярных матриксов кровеносных сосудов малого калибра методом децеллюляризации и их морфологическая оценка / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов, Д.И. Курапеев // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2013. – Т. 14. - № 6. - Приложение «Сборник докладов и сообщений 19 Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов, Москва, 24-27 ноября 2013г.». - С. 250
7. Насрединов, А.С. Рецеллюляризация сосудистого кондуита мезенхимными стволовыми клетками / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов, Д.И. Курапеев // Материалы I Национального Конгресса по регенеративной медицине. - М.: «Меди Экспо», 2013. – С. 182.
8. Насрединов, А.С. Способ получения внеклеточных матриксов артерий малого калибра и их морфологическая оценка / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов, Д.И. Курапеев // Материалы I Национального Конгресса по регенеративной медицине. - М.: «Меди Экспо», 2013. – С. 183.
9. Насрединов, А.С. Биоинженерный кровеносный сосуд малого калибра на основе артерии пуповины человека / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов, Д.И. Курапеев // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI. – Приложение «Материалы VII Всероссийского съезда трансплантологов, Москва, 28-30 мая 2014г.». – С. 282.
10. Насрединов, А.С. Использование проточного биореактора улучшает результаты рецеллюляризации биоинженерных сосудистых кондуитов / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов, Д.И. Курапеев // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI. – Приложение «Материалы VII Всероссийского съезда трансплантологов, Москва, 28-30 мая 2014г.». – С. 251.