

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
Курапеев Дмитрий Ильич - доцент,
кандидат медицинских наук
Анисимов Сергей Владимирович –
доктор медицинских наук

Санкт-Петербург - 2016 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность исследования.....	5
Цель и задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы	9
Основные положения, выносимые на защиту	9
Степень достоверности и апробация результатов	10
Список работ, опубликованных по теме диссертации	10
Личный вклад автора.....	12
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Введение	13
1.2 Методы тканевой инженерии	14
1.3 Децеллюляризация клапанов сердца	16
1.4 Способы децеллюляризации матрикса	18
1.5 Микроструктура аортального клапана человека.....	22
1.6 Биомеханические свойства клапанов сердца	25
1.6.1 Биомеханические свойства нативного клапана аорты	25
1.6.2 Биомеханические свойства тканеинженерных клапанов сердца	27
1.7 Клеточный состав нативного аортального клапана сердца человека	28
1.8 Клетки, используемые в тканевой инженерии клапанов сердца	29
1.8.1 Клетки, полученные из донорских сосудов.....	29
1.8.2 Эндотелиальные прогениторные клетки периферической крови	29
1.8.3 Стволовые клетки.....	30
1.8.2.1 Мезенхимальные стволовые клетки красного костного мозга	31
1.8.2.2 Мезенхимальные клетки жировой ткани	32
1.8.2.3 Мезенхимальные стволовые клетки амниотической жидкости	33
1.8.2.4 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.....	33
1.9 Биореакторы в тканевой инженерии клапанов сердца	34
1.9.1 Статические биореакторы	35
1.9.2 Динамические биореакторы.....	35
1.10 Препреклинические исследования и клиническое применение	38
1.11 Заключение	41
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1 Забор материала.....	44
2.2 Выделение гомографта.....	45

2.3 Децеллюляризация створок аортального клапана и фрагментов восходящей аорты	46
2.4 Гистологическая и иммуногистохимическая оценка	48
2.4.1 Окраска гематоксилином-эозином	48
2.4.2 Окраска по Ван Гизону	48
2.4.3 Иммуногистохимия	49
2.4.4 Окраска DAPI	49
2.5 Определение остаточных ДНК и РНК в тканях	49
2.6 Биомеханические исследования	50
2.6.1 Биомеханические исследования створок аортального клапана	50
2.6.2 Биомеханические свойства восходящей аорты	52
2.6.3 Биомеханическое исследование прочности шва стенки аорты	52
2.6.4 Статистический анализ	53
2.7 Рецеллюляризация	54
2.7.1 Получение клеток для рецеллюляризации	54
2.7.1.1 Получение стволовых клеток красного костного мозга	54
2.7.1.2 Получение стволовых клеток из жировой ткани	56
2.7.2 Рецеллюляризация в статичных условиях	57
2.8 Конструкция биореактора	58
2.9 Децеллюляризация в биореакторе	59
2.10 Рецеллюляризация в биореакторе	61
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	63
3.1 Макроскопическая оценка тканей	63
3.2 Поиск эффективного способа децеллюляризации	63
3.3 Оценка результатов окраски по Ван Гизону и на эластин	70
3.4 Результаты иммуногистохимического исследования	71
3.5 Результаты использования красителя DAPI	73
3.6 Определение остаточных ДНК и РНК в тканях	73
3.7 Биомеханические тесты	74
3.8 Рецеллюляризация створок аортального клапана в статичных условиях	77
3.9 Децеллюляризация гомографта с использованием биореактора	79
3.10 Рецеллюляризация в биореакторе	81
4 ОБСУЖДЕНИЕ	83
4.1 Децеллюляризация – надежный способ получения экстрацеллюлярной матрицы створки аортального клапана	83
4.2 Поиск оптимального протокола децеллюляризации	85
4.3 Поиск универсального протокола децеллюляризации	85
4.4 Применение найденного протокола децеллюляризации не влияет на биомеханические свойства структур корня аорты	87

4.5 Необходимость репопуляции тканеинженерного гомографта стволовыми клетками	88
4.6 Применение биореатора улучшает результаты рецеллюляризации	89
4.7 Перспективы исследования	90
ВЫВОДЫ	92
БЛАГОДАРНОСТИ	93
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	94
ЛИТЕРАТУРА.....	95

ВВЕДЕНИЕ

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), не смотря 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 биодеградация (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) (таблица 1).

Таблица 1 - Свойства и характеристики имплантируемых протезов клапанов сердца

Оптимизируемое свойство	Классические протезы (механические, биопротезы)	Тканевая инженерия
Закрытие створок	Быстрое и полное	Быстрое и полное
Площадь поверхности и размер	Меньше, чем у нативных клапанов	Лучше
Механические свойства	Стабильные	Стабильные
Хирургическая имплантация	Проста и перманентна	Проста и перманентна
Риск тромбозов	Да, особенно у механических клапанов, требующих антикоагулянтной терапии, которая может служить причиной кровотечений	Нет, эндотелиальная поверхность предотвращает тромбообразование

Оптимизируемое свойство	Классические протезы (механические, биопротезы)	Тканевая инженерия
Риск структурной дисфункции	Да, более характерна для биопротезов	Устойчивы к деградации и кальцификации
Риск инфекции	Всегда присутствует	Устойчивы к инфекции
Жизнеспособность	Нет	Да, способны к репарации повреждений, ремоделированию и потенциальному росту с пациентом

Адаптировано из Mendelson K., Schoen F.J., 2006

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. Так, на VII Ежегодном Всемирном Конгрессе по Регенеративной Медицине и Стволовым Клеткам, проходившем в ноябре 2014 года в Китае, доклады, посвященные тканевой инженерии органов и тканей, были обособлены в отдельную секцию, состоявшую из 11 докладов. В то же время в России эта область медицинских исследований лишь начинает свое развитие. На I конгрессе по регенеративной медицине, прошедшем в декабре 2013 г. в Москве, среди более чем 280 докладов только 5 были посвящены тканевой инженерии кровеносных сосудов, при этом 3 из них были поданы нашей исследовательской группой. Таким образом, настоящая работа является актуальной и представляет собой одно из первых фундаментальных исследований в области тканевой инженерии клапанов сердца человека.

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 «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова». 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).

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. - No 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.

Личный вклад автора

Тема и план диссертации, ее основные идеи и содержание разработаны совместно с научными руководителями.

Автор самостоятельно обосновал актуальность темы диссертации, цель, задачи и этапы научного исследования и проведения экспериментов. Диссертант лично проводил часть забора материала в патологоанатомических отделениях (30% заборов), полностью самостоятельно производил макроскопическую оценку, хирургическую обработку материала, работу в лаборатории на этапе поиска и получения протокола децеллюляризации, самостоятельно выполнял работу со стволовыми клетками и их заселением на гомографты, работы по исследованию биофизических свойств тканей, анализ полученных результатов морфологических, молекулярных и биомеханических исследований. Автором лично разработана конструкция биореактора и методология его использования для получения бесклеточной трехмерной матрицы корня аорты, а также для процесса рецеллюляризации этой матрицы. Окраска гистологическими красителями производилась лаборантами отделения патоморфологии ФГБУ ФМИЦ им. В. А. Алмазова Минздрава России.

Личный вклад автора в изучение литературы, сбор, обобщение, анализ, обработку результатов и написание диссертации – 100%.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Введение

Тканевая инженерия имеет множество определений, среди них есть простые и комплексные. Одно из самых простых определений этого термина звучит так: «Применение научных правил для дизайна, конструкции, модификации, роста и сохранения живых тканей» (Berthiaume F. et al., 2011). Более комплексное определение было дано на конгрессе «World Technology Panel», которое проводилось Национальным Институтом Здоровья (NIH) США совместно с Федеральным Агентством по Контролю за Пищевыми Продуктами и Лекарственными препаратами (FDA) и другими правительственными структурами: «Тканевая инженерия – это использование принципов и методов инженерии и наук о жизни для достижения понимания фундаментальных причин взаимоотношения структуры и функционирования в тканях млекопитающих, и разработка биологических заменителей для восстановления, поддержания и улучшения функции тканей» (McIntire L.V., 2003).

Однако собственно история тканевой инженерии не нова. Толчком к ее развитию послужил приход в науку технологий получения клеточных культур в начале XX века (Nerem R.M., 2010). Первая ссылка на биологический подход к замещению тканей и органов содержится в книге «Культивирование органов», изданной в 1935 году биомедицинским исследователем Алексисом Каррелем и его партнером Чарльзом Линдбергом (Alexis Carrel and Charles Lindbergh) (Carrel A. et al., 1935). Первая работа, применившая основы техники тканевой инженерии, началась в Бостоне в 60-х годах XX века в Массачусетском Технологическом Университете (MIT, США). Исследователям удалось установить причины, препятствующие росту клеток млекопитающих *in vitro*, и вырастить культуру эпидермальных клеток в большом количестве (Rheinwald J.G. et al., 1974; Rheinwald J.G. et al., 1975). После этого началось изучение факторов, влияющих на рост культуры клеток (Rheinwald J.G. et al., 1976) и активная работа по культивированию эпителия и использованию его в качестве основы синтетической кожи для закрытия дефектов (Phillips T.J., 1992).

Термин «тканевая инженерия» был предложен Фунгом в октябре 1987 года в Вашингтоне на симпозиуме Национального Научного Фонда (Vesely I., 2005). А уже в 1988 году в Лейк Тахо, Калифорния, состоялся первый научный съезд под названием «тканевая инженерия».

С тех пор, с появлением и развитием клеточных технологий тканевая инженерия за последние четверть века расширила свои границы и приобрела рамки направления под

названием регенеративная медицина, которую в последнее время можно смело назвать индустрией (Nerem R.M. et al., 2010). Темпы развития этой индустрии стремительно нарастают с каждым десятилетием. Так, в 1994 году активность сектора тканевой инженерии составляла 24 миллиона долларов США, в этой области работало около 40 компаний с привлечением 1500 специалистов (Lysaght M.J. et al., 1995). К 2007 году финансовая активность этого направления достигла 2,4 миллиардов долларов США, а количество компаний составило 167 (Lysaght M.J. et al., 2008). Ожидается, что к 2020 году рынок клеточной регенеративной медицины составит 100-200 миллиардов долларов в год, и технологии, разработанные в рамках этой области смогут помочь 323 тысячам пациентов (Mason C. et al., 2010). Мировое сообщество полно ожиданий и открытий в области тканевой инженерии в будущем. Многие исследователи называют тканевую инженерию «великим достижением науки двадцатого века» (Nerem R.M. Et al., 2010).

Первой попыткой создать клапан сердца посредством тканевой инженерии были исследования Grimm et al. - в 1991г. (Grimm M. et al., 1992). Эта группа исследователей Венского университета (Австрия) занималась исследованием роста эндотелиальных клеток на бычьем перикарде, фиксированном в глутаральдегиде. При этом было показано, что инактивация глутарового альдегида L-глутамовой кислотой улучшает результаты роста эндотелиальных клеток на поверхности перикарда, что может служить основой для новых технологий производства биопротезов с улучшенными свойствами. И хотя дальнейшего развития эта работа не получила, последующие исследования в области тканеинженерных протезов клапанов сердца позволили достичь значительных результатов.

1.2 Методы тканевой инженерии

Классическая парадигма тканевой инженерии включает в себя следующие стадии:

1. Создание каркасной основы – матрицы
2. Заселение матрицы клетками
3. In vitro стадия – формирование ткани с использованием биореактора, моделирующего физиологические, метаболические и механические условия окружающей среды нормальных тканей, с последующей имплантацией
4. In vivo стадия роста и ремоделирования тканей (Khademhosseini A. et al., 2009).

Ключевыми физиологическими процессами, происходящими во время in vitro и in vivo стадий являются пролиферация и миграция клеток, продукция и организация экстрацеллюлярного матрикса, деградация матрицы и ремоделирование ткани. На стадии in

vivo на формирование ткани влияют воспалительные клетки реципиента. Также существует альтернативная парадигма тканевой инженерии, включающая в себя создание биосинтетической матрицы, незаселенной клетками, однако снабженной определенной «биологической информацией» (факторы роста клеток, фибронектин) для *in vivo* привлечения, адгезии и развития на своей поверхности эндогенных клеток-прекурсоров реципиента, циркулирующих в крови (Mendelson K. et al., 2006).

Создание матрицы как основы будущего трансплантата является критичным этапом тканевой инженерии клапанов сердца. Так как такой трансплантат должен полностью воспроизводить структурные и физиологические характеристики нативного клапана, трехмерная матрица должна быть полностью похожей на структуру клапана сердца, являться подходящей основой для клеток, которыми заселяют поверхность этой матрицы, и создавать физиологические условия для адекватного роста, функционирования и взаимодействия этих клеток (Акатов В.С. и соавт., 2010; Rippel R.A. et al., 2012).

Матрицы, используемые для тканевой инженерии клапанов сердца, можно разделить на биологические и синтетические. К биологическим матрицам относятся децеллюляризованные клапаны животного (ксеногенного) или человеческого происхождения. Этот метод тканевой инженерии будет рассмотрен ниже. К синтетическим матрицам относятся изготовленные на основе полигликолевой и полилактоевой кислот и на их кополимерах (Shinoka T. et al., 1995; Sodian R. et al., 2000). Концепция этого метода достаточно проста: клетки определенного фенотипа заселяются на порозный материал – матрицу, изготовленную по форме клапана, которая имплантируется реципиенту (рисунок 1).

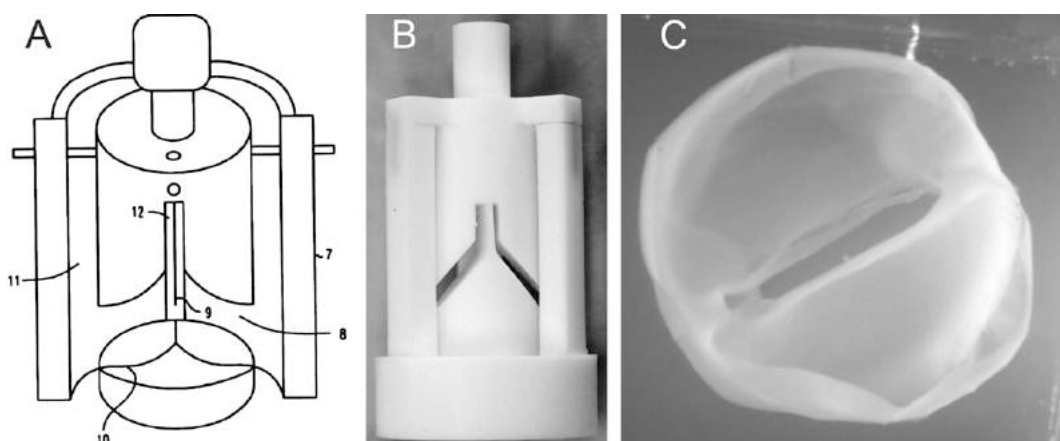


Рисунок 1 - Изготовление тканеинженерного клапана на основе биodeградируемой матрицы. А – схема и В – фотография формы для изготовления биodeградируемой матрицы клапана сердца. С – фотография клапана, изготовленного из биodeградируемого геля на основе этой формы. Адаптировано из Vesely I., 2005

Ожидается, что клетки, попав в определенное микроокружение, начинают синтезировать

новый матрикс, в то время как первоначальный синтетический матрикс со временем подвергается биодegradации. В эксперименте этот метод применяется в основном для имплантации подобных графтов (графт – фрагмент ткани или органа, подвергаемый трансплантации) в позицию клапана легочной артерии, так как биодegradируемая матрица не способна выдержать нагрузок и давления, создаваемых левым желудочком до того, как новый экстрацеллюлярный матрикс будет синтезирован клетками. Также существует альтернативный подход по созданию полимеризованных биологических экстрацеллюлярных матриц с захваченными в них клетками (Bell E. et al., 1979; Grinnell F., 1984). Этот подход основан на достаточно старом наблюдении, заключающемся в том, что клетки, помещенные в коллагеновый гель, способны упаковывать и сокращать этот гель, повышая его плотность. Создание матрицы на основе этой технологии начинается с помещения клеток в раствор, содержащий фибриллы коллагена. После нейтрализации растворимый коллаген осаждается в виде нитей, и клетки, «запутанные» в этих нитях, начинают взаимодействовать с коллагеном и сокращать матрикс, выдавливая воду (рисунок 2).



Рисунок 2 - Фотография коллагеновых конструкций во время процесса его упаковки, на которых виден процесс компактизации коллагена как на самых ранних стадиях, так и в динамике, при возрасте клеточной культуры в 2 и 8 недель. Адаптировано из Shi Y, Vesely I., 2003

Во многом, этот процесс, происходящий *in vitro*, напоминает процесс заживления ран - *in vivo* (Grinnell F., 1994).

Данная работа посвящена созданию клапанов сердца с использованием трехмерных биологических матриц, то есть с применением метода децеллюляризации.

1.3 Децеллюляризация клапанов сердца

Смысл данного подхода к реализации изготовления клапана методом тканевой инженерии заключается в том, что основную антигенную нагрузку алло- и ксенографтов несет в себе клеточный дебрис (т.е. фрагменты клеточных мембран и других структур). Несоответствие по иммуногистосовместимости более актуально для имплантируемых

ксенографтов, чем для аллогraftов (Vesely I., 2005). Кроме того, ксенографты необходимо фиксировать в глутаровом альдегиде, который является причиной развития цитотоксических и других побочных реакций. Длительность работы биопротезов, фиксированных в глутаровом альдегиде, ограничена процессами кальцификации и деградации. Клетки и клеточные мембраны ксенографтов провоцируют раннюю кальцификацию биопротеза (Schoen F.J. et al., 1985), при этом установлена прямая связь между специфическим иммунным ответом в организме реципиента посредством антител и кальцификацией (Human P., 2001). Концепция децеллюляризации направлена на то, чтобы решить эту проблему.

Человеческие аллогraftы, используемые в настоящее время в клинической практике, не проходят процедуру индивидуального подбора совместимости с реципиентом, однако демонстрируют неплохой срок службы: в течение 15-20 лет. Это объясняется возможным особым положением клапана в организме – в высокоскоростном потоке крови, при котором моноциты и другие клетки иммунной системы не могут в достаточной мере связываться с антигенами структур клапана (Vesely I., 2005). Однако многие исследования демонстрируют наличие активации анти-HLA антител у пациентов после имплантации человеческих аллогraftов (Shaddy R.E. et al., 1996; Smith J.D. et al., 1999). Децеллюляризация человеческих гомогraftов позволяет снизить антигенную нагрузку и уменьшить иммунный ответ по сравнению с обычными криоконсервированными гомогraftами (Hawkins J.A. et al., 2003). Отсутствие макрофагальной и Т-клеточной инфильтрации децеллюляризованных клапанов по сравнению с криоконсервированными способствует улучшению результатов лечения с использованием подобных клапанов в отдаленном периоде (Numata S. et al., 2004). Кроме того, децеллюляризованный клапан служит матрицей для репопуляции эндогенными клетками хозяина. Этап децеллюляризации возможно осуществить как до имплантации клапана в условиях *in-vitro* в биореакторе, так и после имплантации бесклеточной матрицы – посредством заселения ее циркулирующими прогениторными клетками (Lichtenberg A. et al., 2006). Такая заселенная матрица становится полностью «невидимой» для иммунной системы реципиента, поскольку покрывается собственными эндотелиальными клетками, идентифицируемыми как «свои», и постепенно ремоделируется, деградирует и замещается новой, синтезируемой проникающими вглубь нее интерстициальными клетками.

Основной задачей децеллюляризации является удаление клеток и клеточного дебриса при полном сохранении структуры экстрацеллюлярного матрикса и его биофизических свойств. Сам процесс создания бесклеточной матрицы складывается из этапа разрушения клеточных мембран и нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), и этапа их экстракции при помощи различных детергентов (Vesely I., 2005). Детергенты, используемые большинством исследователей, включают в себя анионные (SDS – додецилсульфат натрия), цвиттерионные

(SDC – дезоксихолат натрия, натриевая соль дезоксихолевой кислоты), неионные (Тритон X-100, bigCHAP), ферменты (трипсин), а также большое число других реагентов. Ферменты, добавляемые к детергентам в процессе децеллюляризации, необходимы для расщепления и удаления ДНК и РНК, являющихся частью клеточного дебриса и способных содержать компоненты вирусного генома. Из-за того, что перечисленные вещества могут повреждать матрицу, некоторые исследователи используют ингибиторы ферментов, например, ингибитор трипсина, хотя другие используют смесь трипсин-ЭДТА без ингибитора для децеллюляризации (Cebotari S. et al., 2002). Важно отметить, что используемые для экстракции клеток компоненты, могут наносить серьезный ущерб структуре экстрацеллюлярного матрикса: они могут разрушать или денатурировать матриксные протеины, являться причиной появления токсических остатков или остаточных изменений, что может значимо повлиять на механическую функцию или клеточный ответ.

Основными параметрами, которые изменяются исследователями, являются виды используемых специфических детергентов, последовательность шагов в процессе децеллюляризации, и длительность экспозиции реагентов. При этом чаще всего варьирует гистологическая морфология полученного матрикса, часто демонстрирующая наличие пористости, или наоборот – коллапса структур экстрацеллюлярного матрикса, микроразрывов или полной деградации. В настоящее время насчитываются десятки, если не сотни протоколов по созданию бесклеточного матрикса, что свидетельствует о продолжающемся поиске оптимального варианта.

1.4 Способы децеллюляризации матрикса

Додецилсульфат натрия (SDS) (рисунок 3А) во многих работах до недавнего времени описывался как эффективный детергент по удалению клеток, применяемый для обработки как сосудистых кондуитов (Allaire E. et al., 1994), так и створок клапанов сердца (Ueda Y. et al., 2006; Iwai S. et al., 2007; Narine K. et al., 2006; Wollmann L.C. et al., 2011; Caamano S. et al., 2009; Booth C. et al., 2002). Однако наряду с положительным опытом применения SDS некоторые исследования демонстрируют дестабилизирующее действие этого детергента на матрикс. По данным Samouillan V. et al., SDS дестабилизирует тройной спиральный домен коллагена и вызывает набухание сетчатой структуры эластина, разрушая таким образом экстрацеллюлярный матрикс (Samouillan V. et al., 1999). Есть данные об изменении биофизических свойств клапанов после обработки SDS: повышается их растяжимость, изменяется форма кривой эластиновой и коллагеновой фаз при тесте растяжение-сдавление

(Korossis S.A. et al., 2002). Кроме того, после обработки SDS створок клапана и попытке заселить их человеческими эндотелиальными клетками или миофибробластами происходит массивный лизис клеток спустя 24 часа после инкубации (Rieder E. et al., 2004). Интересно, что при использовании SDS для производства бесклеточных матриц сосудов многие исследователи отмечают удовлетворительные механические характеристики, хорошие результаты по удалению клеток и сохранению структуры экстрацеллюлярного матрикса (Schaner PJ et al., 2004).

Использование гипо- и гипертонических растворов сравнительно эффективно удаляет интактные клеточные элементы, однако при последующей окраске тканей антителами к anti-MHC регистрируется положительное окрашивание (Meyer S.R. et al., 2006). Положительное anti-MHC окрашивание коррелирует с интенсивностью инфильтрации Т-клетками в модели *in vivo*. Эта относительно мягкая техника децеллюляризации позволяет в большей степени сохранить структуры матрикса. Неспособность этих растворов устранять anti-MHC окрашивание скорее всего связана с тем, что водный раствор не может элиминировать связанные с мембранами антигены МНС после осмотического лизиса клеток.

Тритон X-100 (октилфенилполиоксиэтилен) (рисунок 3В) – неионный детергент, используемый в биохимических реакциях как вещество для солюбилизации мембран. Структура тритона X-100 очень похожа на структуру IGEPAL CA630, и эти два названия часто используются как синонимы. Однако молекула тритона X-100 обладает немного более гидрофильными свойствами, поэтому для многих реакций они не являются взаимозаменяемыми. Это вещество является детергентом выбора, т.к. обладает способностью мягко солюбилизовать мембраны клеток без денатурирующей активности. Для децеллюляризации используется 0,5% или 1% раствор.

Исследования эффективности децеллюляризации тритоном X-100 и его влияния на структуру и свойства матрикса многочисленны и во многом противоречивы. Китайские коллеги сообщают, что им удалось достичь полной децеллюляризации при использовании тритона X-100, однако наблюдалось серьезное изменение механических свойств по сравнению с необработанными клапанами и даже по сравнению с обработанными трипсином (Wang K.X. et al., 2005). Также тритон X-100 может способствовать обеднению губчатого слоя створок клапана, что вызывает биodeградацию клапана, повреждение складчатой структуры коллагена и повышает его пористость, изменяя механические свойства и прогноз длительности работы (Liao J. et al., 2008). Однако исследования в условиях *in vivo* сообщают о полном удалении клеточного дебриса, антигенов главного комплекса гистосовместимости и, как следствие, снижение иммуногенности обработанных тритоном тканей (Meyer S.R. et al., 2006), а Cortman et al. сообщают о противоположных описанным выше результатах, демонстрируя сохраненные

биомеханические свойства тканей, обработанных по этому протоколу (Courtman D.W. et al., 1995). Использование тритона X-100 в комбинации с SDS позволяет получить матрицу, полностью свободную от ксеногенных клеток и клеточного дебриса, которая пригодна для заселения человеческими клетками. При этом отмечается удовлетворительный рост и жизнеспособность миофибробластов и эндотелиоцитов, а также синтез миофибробластами коллагеновых волокон, которые далее включаются в структуру ксеногенного матрикса (Rieder E. et al., 2004).

Дезоксихолат натрия (SDC) (рисунок 3Б) – производное желчных кислот, в природе образуется из холиевых кислот в кишечнике при помощи энзимов кишечных бактерий. Менее половины дезоксихолиевых производных далее всасываются в кишечнике и возвращаются в печень, где проходят процесс конъюгации и поступают в желчный пузырь. В биохимических производствах применяется как водорастворимый ионный детергент, используемый для лизиса клеточных мембран (Neugebauer J.M. et al., 1995). В последнее десятилетие появилось большое количество сообщений об успешном применении этого детергента для производства бесклеточных матриц.

Впервые дезоксихолат натрия применил в практике Booth et al. Он сообщал о применении комбинации 0,03% - 1% SDS и 0,5% - 2% дезоксихолиевой кислоты как успешной технике децеллюляризации свиных клапанов сердца Booth C. et al., 2002). После этого, на фоне сообщений о недостатках применения других детергентов, использование SDC получило широкое распространение. Erdbrügger et al. успешно использовал для имплантации свиные клапаны легочной артерии в моделях на овцах и имплантации в клинической практике после обработки их 1% дезоксихолиевой кислотой (Erdbrugger W. et al., 2006). Аналогичным образом, Fang et al. успешно децеллюляризировал свиной клапан аорты по протоколу, сочетающему использование дезоксихолата натрия и тритона X-100, а затем рецеллюляризировал клапаны эндотелиальными прогениторными клетками из пупочного канатика человека (Fang N.T. et al., 2007).

Применение дезоксихолиевой кислоты выглядит обнадеживающим и с точки зрения влияния ее на механические свойства ксенографтов. Так, 4% раствор дезоксихолиевой кислоты использовался для децеллюляризации общей сонной артерии собак, при этом не наблюдалось значимых изменений в гибкости и прочности по сравнению с недецеллюляризованными образцами (Murase Y. et al., 2006). Reider et al. показал эффект децеллюляризации с использованием 0,05% дезоксихолата, 0,05% тритона X-100 и 0,05% IGEPAL CA 630 на снижение миграции моноцитов к клапану in-vivo и снижение иммунного ответа. Также было показано, что иммунная воспалительная реакция на децеллюляризованный

человеческий клапан развивается меньше, чем на ксеногенный клапан аорты, обработанный по тому же протоколу (Reider E. et al., 2005).

Множество исследований посвящены децеллюляризации на основе протоколов с использованием трипсина (рисунок 3Г). Практически все они сообщают о массивной деструкции коллагена и эластиновых элементов клапана (Reider E. et al., 2004; Meyer S.R. et al., 2006; Bader A. et al., 2000; Vesely I. Et al., 1995). Это сказывается на длительности службы клапана, а также вызывает раннюю кальцификацию его створок. Кроме того, использование трипсина негативно влияет на репопуляцию клапана клетками хозяина как *in vitro*, так и *in vivo*. В принципе, деструктивный эффект этого протокола децеллюляризации не является неожиданным: коллаген типа I составляет большую часть коллагена клапанов сердца (Cole W.G. et al., 1984), и, как минимум в своей денатурированной форме, является субстратом трипсина. Кроме того, трипсин разрушает нефибриллярные белки, гликозаминогликаны и протеоглики. Потеря гликозаминогликанов ведет к потере тургора тканей (Schenke-Layland K. et al., 2003). Использование энзиматического метода децеллюляризации демонстрирует худшие результаты, чем применение детергентов, поскольку может вызывать полную деструкцию матрикса и неудовлетворительные механические свойства протеза (Tudorache I. et al., 2007). Таким образом, дальнейшее применение трипсина для децеллюляризации требует доработки и оптимизации подобных протоколов.

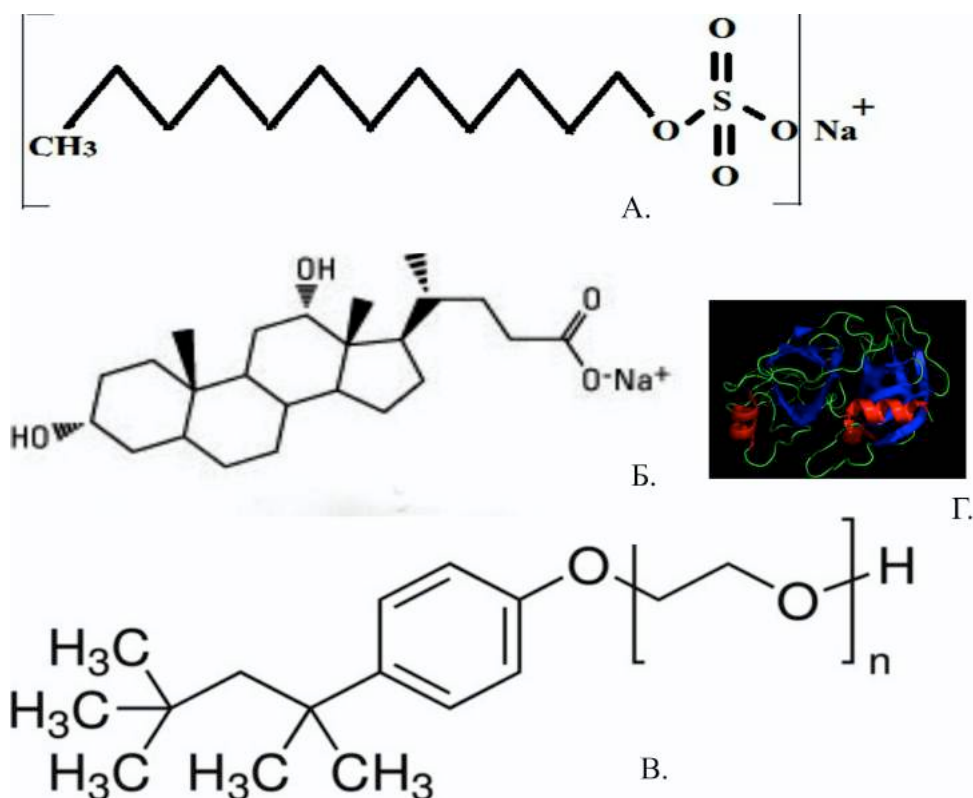


Рисунок 3 - Средства, используемые для тканевой инженерии клапанов сердца методом децеллюляризации. А – формула додецилсульфата натрия, Б – формула дезоксихолата натрия, В – формула тритона X-100, Г – молекула трипсина

1.5 Микроструктура аортального клапана человека

Аортальный клапан человека в норме является структурой, состоящей из трех полулунных створок, препятствующих обратному току из аорты в левый желудочек. Створки аортального клапана вместе с фиброзным кольцом аортального клапана, межстворчатыми треугольниками Генле, устьями коронарных артерий, синусами Вальсальвы, вентрикулоаортальной и синотубулярной зонами входят в состав корня аорты (Anderson R.H. et al., 2007) (рисунок 4).

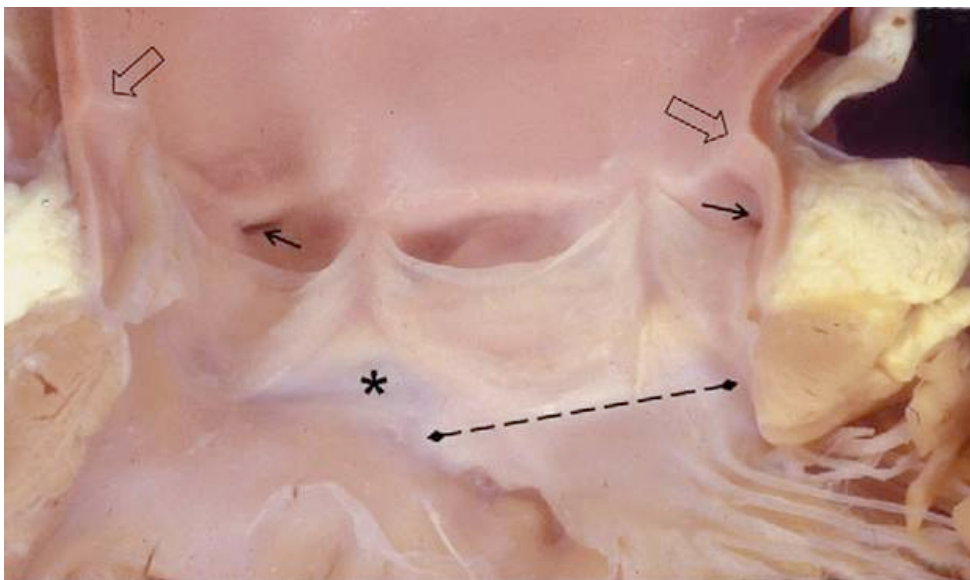


Рисунок 4 - Корень аорты. Маленькие стрелки – устья коронарных артерий, объемные стрелки – зона синотубулярного сочленения, звездочки – треугольник Генле, пунктирная линия – зона митрально-аортального контакта. Адаптировано из Smith A. et al., 1989

Створки аортального клапана состоят из четырех основных компонентов: комиссуральная область, тело створки и луны с бугорком Аранци (Misfeld M. et al., 2007). Поперечный срез створки представляет собой сложную, тонкую, гибкую структуру, которая может быть разделена на три слоя: фиброзный, губчатый и желудочковый (Cox MA et al., 2010) (рисунок 5).

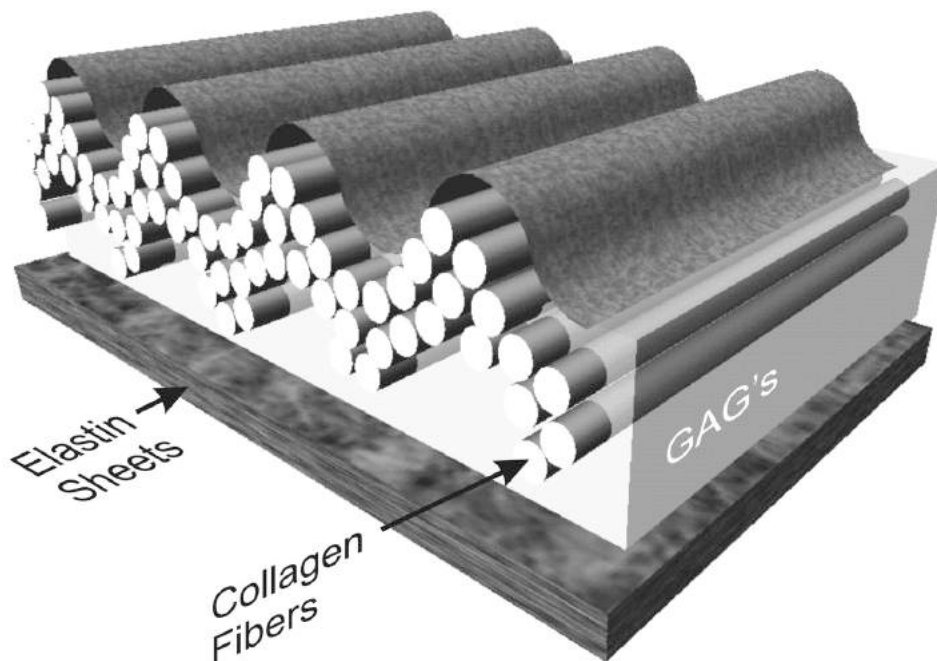


Рисунок 5 - Схематическое изображение структуры створки аортального клапана.

Адаптировано из Vesely I., 2005. Пояснения в тексте

Самым толстым слоем является фиброзный. Он состоит из переплетающихся между собой волокон коллагена-I, образующих плотную сеть, ориентированную преимущественно в продольной направлении, и в меньшей степени – в радиальном направлении (Misfeld M. et al., 2007). Эластин в составе фиброзного слоя представляет собой высокоорганизованную сеть филаментов, располагающихся радиально от центральной области к зоне крепления створки. Плотные эластиновые пластины окружают коллагеновые пучки. Эластин, высокоэластичный белок, принимает энергию во время нагрузки на створку, и передает ее во время разгрузки на пучки коллагена, позволяя, таким образом, створке вернуть прежнюю форму (Adham M. et al., 1996; Isenberg B.C. et al., 2006). Спонгиоза (губчатый слой) состоит из высокогидратированных гликозаминогликанов и протеогликанов. Этот слой выступает в роли своеобразной буферной зоны между желудочковым и фиброзным слоями, позволяя им смещаться друг относительно друга во время нагрузок и разгрузок и демпфировать гемодинамический удар. Желудочковый слой является самым тонким из трех. Он состоит из пучков коллагена и пластов эластина, ориентированных продольно. Функции каждого из трех слоев распределяются соответственно их структуре. Фиброзный слой выполняет роль слоя, который берет на себя основную гемодинамическую нагрузку. Губчатый слой выполняет роль «подушки», «смазки» между фиброзным и желудочковым слоями. Желудочковый слой помогает снизить нагрузки в радиальных направлениях во время высокоскоростного потока крови через клапан в полностью открытом состоянии. Трехслойная структура матрикса помогает обеспечить высокую растяжимость для успешного противостояния трансклапанным нагрузкам, и низкую жесткость при сгибании, - что требуется для нормального открытия клапана (Sacks MS et al., 1998). Все слои створки состоят из сети коллагеновых и эластиновых волокон, которые имеют в своем составе молекулы воды.

Микроструктура аортального клапана сердца определяет нелинейный характер кривой во время выполнения теста на напряжение при растяжении. При относительно небольшом начальном растяжении волнистые коллагеновые и эластиновые волокна могут быть растянуты небольшой силой воздействия, в то время как структуры, состоящие из прямых волокон, намного жестче. Это объясняет выраженное увеличение напряжения, необходимого для растяжения ткани. Кроме того, коллагеновые волокна по весу на 60-70% состоят из воды, что определяет вязкостные характеристики ткани створки клапана, и делают эту ткань практически несжимаемой (Misfeld M. et al., 2007).

1.6 Биомеханические свойства клапанов сердца

1.6.1 Биомеханические свойства нативного клапана аорты

Первоочередной задачей клапанов сердца является обеспечение однонаправленного тока крови во время сердечного цикла. Клапан сердца считается пассивной структурой, управляемой потоком крови. Эти структуры существуют в среде с постоянными нагрузками растяжения, сгиба и давления, причем цикличность этих нагрузок приближается к 40 миллионам раз в год (Butcher J.T. et al., 2011). Во время сердечных циклов, сердце выталкивает от 3 до 5 литров крови в минуту. Кровь протекает через аортальный клапан со скоростью $1,35 \pm 0,35$ м/с и средним давлением около 80 мм рт. ст. (Butcher J.T. et al., 2011; Otto C.M. et al., 2001). Механическое напряжение, возникающее на створке клапана во время сердечного цикла *in vivo* (напряжение сдвига), точно не известно, но предполагается, что оно достигает 10-80 дин/см² (Weston M.W. et al., 1999). Некоторые исследователи сообщают, что максимальная величина этого показателя может достигать 1500 дин/см², что может наблюдаться при некоторых патологических состояниях, например стенозе клапана (Weston M.W. et al., 1999; Nandy S. et al., 1987). Подсчитано, что в условиях *in vivo* растяжение створки аортального клапана в продольном направлении во время сердечного цикла составляет 40%, в радиальном направлении – 10%, в то время как стенка восходящей аорты растягивается и в продольном, и в радиальном направлении на величину около 5% (Brewer R.J. et al., 1977; Missirlis Y.F. et al., 1976; Thubrikar M. et al., 1980). Максимальные величины напряжения и растяжения наблюдаются на створках аортального клапана во время конечно-диастолической фазы сердечного цикла, минимальные – во время начала сокращения наполненных кровью желудочков (Butcher JT et al., 2001). Суммируя деформации на клапане во время систолы и диастолы, можно обозначить их равными 50 и 500 кПа соответственно (Thubrikar M. et al., 1980). По данным других исследователей, эти значения приближаются к 200 и 400 кПа соответственно (Lee J.M. et al., 1984; Christie G.W. et al., 1992). Модуль упругости (модуль Юнга) во время начальной фазы нагрузки в радиальном и продольном направлениях варьируется в пределах 2-10 кПа и 20-100 кПа соответственно, в то время как в фазу изоволюмического расслабления эти параметры составляют 1-2 МПа и 8-12 МПа для радиального и продольного направления соответственно (Leeson-Dietrich J. et al., 1995). Эти значения могут быть взяты за основу в качестве целевых при проектировании протезов клапанов сердца посредством тканевой инженерии. Другими словами, при проектировании тканеинженерных клапанов сердца значения напряжения и растяжения должны быть максимально высокими и обеспечивать достаточные механические свойства для функционирования протеза клапана сердца (Hasan A. et al., 2013).

Количество исследований, посвященных аортальным клапанам человека в сфере биомеханики, не так велико, количество исследований, посвященных аналогичным исследованиям на клапанах животных (в основном свиньи и овцы) (Anssari-Benam A. et al., 2011; Carew E.O. et al., 2003; Christie G.W. et al., 1995; Lewinsohn A.D. et al., 2011; Merryman W.D. et al., 2006; Mirnajafi A. et al., 2006; Stella J.A. et al., 2007; Stella J.A., Sacks M.S., 2007). Это объясняется ограниченной доступностью трупного человеческого материала (Stradins P. et al., 2004; Clark R.E. et al., 1973; Balguid A. et al., 2007). Некоторые исследования посвящены совместному изучению створок клапанов животного и человеческого происхождения (Auger F.A. et al., 2013; Mavrilas D., 1991). Однако каждое из этих исследований фокусируется на определенном специфичном параметре. Например, Balguid et al. исследовал 9 трупных клапанов аорты от пациентов, погибших от причин, не связанных с нарушением функции сердца (Balguid A. et al., 2007). Основной целью этого исследования явилось изучение взаимосвязи биомеханических свойств клапана с состоянием сети коллагеновых волокон. Однако из биомеханических свойств были протестированы только униаксиальные тесты на растяжение. Этим же исследованиям были посвящены работы Stradins et al. (Stradins P. et al., 2004), который изучал биомеханические свойства аортальных клапанов на 11 корнях аорты трупов возрастом от 20 до 50 лет.

Вообще униаксиальное исследование растяжимости является наиболее общим и широко распространенным способом исследования биомеханических свойств клапанов сердца (Grashow J.S. et al., 2006). Итогом проведения теста подобного рода является построение кривой, отражающей взаимосвязь напряжения при растяжении и деформации растяжения. Характер этой взаимосвязи является строго нелинейным. Напряжение обозначают δ , и $\delta = F/A$, где F – приложенная в эксперименте сила, а A – площадь поперечного сечения образца в свободном состоянии. Деформация при растяжении, ϵ , определяют как $\epsilon = \Delta L/L_0$, где ΔL – изменение длины образца, а L_0 – его начальная длина. Модуль упругости, который также называется модулем Юнга, E , равен отношению напряжения растяжения к деформации при растяжении, $E = \delta / \epsilon$.

Кривая напряжения/растяжения ткани аортального клапана имеет нелинейный характер, и может быть разделена на несколько участков, или фаз, характеристики которых могут быть взаимосвязанными с некоторыми физиологическими процессами (Mavrilas D. et al., 1991). К основным фазам этой зависимости относят:

1. линейную предпереходную упругую фазу низкого напряжения - низкого растяжения, которая может быть связана с распрямлением складчатой структуры коллагена и удлинением эластиновых волокон

2. высоко нелинейную переходную фазу, которая может быть связана с перераспределением нагрузки с эластиновых волокон на коллагеновые

3. постпереходную линейную фазу упругости, связанную с удлинением эластиновых и коллагеновых волокон

4. нелинейную фазу быстрого падения напряжения, связанную с разрывом коллагеновых и эластиновых волокон и полным разрушением образца.

При сравнении модуля Юнга разных структур аортального клапана и клапана легочной артерии было показано, что ткани корня аорты обладают большей эластичностью (Auger F.A. et al., 2013). В литературе существует большой разброс данных о биомеханических свойствах аортального клапана (Stradins P. et al., 2004; Clark R.E. et al., 1973; Balguid A. et al., 2007; Sodian R. et al., 2000; Tan A.J. et al., 1976; Sauren A.A. et al., 1983). Причиной тому частично является биологическая вариабельность параметров, а частично – варианты проведения экспериментов. Вариабельность лабораторных данных связана с отсутствием единых стандартов и протоколов проведения измерений, отсутствием единых условий проведения эксперимента, различия в препарировании образцов и различия в их размерах, целевых нагрузках и т.д. Кроме того, еще одной причиной разброса показателей биомеханических тестов является несопоставимость методов получения данных из крайне нелинейной зависимости параметров напряжения и растяжения (Karimi R. et al., 2008). Поэтому сравнение литературных данных должно производиться с аккуратностью и осторожностью.

Кроме того, очевидно, что модуль Юнга в продольном направлении больше, чем в радиальном направлении. Таким образом, клапаны сердца по своей природе являются высоко анизотропными. Также сравнение модулей упругости человеческих и животных клапанов сердца демонстрирует значимые различия между ними. При этом клапаны животного происхождения являются более слабыми, чем аллографты, что делает их менее предпочтительными для имплантации (Rousseau E.P. et al., 1983).

1.6.2 Биомеханические свойства тканеинженерных клапанов сердца

К исследованиям биомеханических свойств тканеинженерных клапанов сердца относятся работы Driessen et al. (2007), Balguid et al. (2007), Engelmayer et al. (2005, 2006), Sodian et al. (2000a) и Hoerstrup et al. (2000).

Driessen et al. (Driessen N.J. et al., 2007) для получения тканеинженерного клапана использовал матрицу из полигликолевой кислоты, покрытую полигидроксibuтиратом. Матрицы, заселенные клетками из большой подкожной вены человека, помещались в биореактор с диастолическим пульсдупикатором. Характеристика створок производилась в in

in vitro эксперименте, была выполнена оценка биомеханических свойств в радиальном и продольном направлениях.

Balguid et al. также использовал матрицы на основе полигликолевой кислоты с полигидроксibuтиратным покрытием для получения клапана методом тканевой инженерии. Заселение производилось человеческими миофибробластами венозной стенки. Одна группа клапанов культивировалась в статических условиях, другая – спустя 5 дней культивации в статических условиях была переведена в динамические условия в виде динамического растяжения с частотой 1 Гц в течение 3 недель. После этого было выполнено исследование биомеханических свойств всех образцов. Динамическое preconditionирование конструкций явилось предпосылкой для более высоких показателей модуля упругости и растяжимости тканей.

Работы Sodian et al. (2000) (Sodian R. et al., 2000), Shinoka et al. (1996) (Shinoka T. et al., 1996) и Hoerstrup et al. (2000) (Hoerstrup S.P. et al., 2000) посвящены in vivo исследованиям тканеинженерных клапанов сердца на основе биodeградируемых матриц в эксперименте на овце и демонстрируют неплохие показатели сохранности функции таких клапанов спустя 20 недель после имплантации.

1.7 Клеточный состав нативного аортального клапана сердца человека

Клеточный состав клапанов сердца представлен несколькими типами клеток: эндотелиальные клетки и интерстициальные клетки (фибробласты, миофибробласты, гладкомышечные клетки и нервные клетки). Эндотелиальные клетки создают тромбогенную поверхность клапана и контролируют иммунные и воспалительные реакции. Клапанные эндотелиальные клетки отличаются от сосудистых реакцией на механический стресс – в сосудах клетки эндотелия залегают параллельно потоку крови, в клапанах – перпендикулярно (Butcher J.T. et al., 2004). Кроме того, эндотелиальные клетки способны модулировать функцию интерстициальных клеток (Schoen F.J., 2008). Интерстициальные клетки – наиболее многочисленная группа клеток. Они синтезируют экстрацеллюлярный матрикс и ферменты, разрушающие его (матриксные металлопротеиназы - ММП), и их ингибиторы, осуществляя таким образом ремоделирование матрикса. Интерстициальные клетки являются динамической популяцией, включающей различные фенотипы – от фибробластов до миофибробластов, и эти фенотипы регулируются и определяются условиями окружающей среды (Taylor P.M. et al., 2003). Фибробласты являются фенотипом, экспрессирующимся в спокойном состоянии у здоровых взрослых людей. Они характеризуются наличием виментина и низким содержанием

альфа-гладкомышечного актина, ММП-13 и немышечного миозина тяжелых цепей (Smemb) (Mulholland DL et al., 1996). Миофибробласты являются фенотипом интерстициальных клеток, которые присутствуют во время развития и созревания клапана, при некоторых заболеваниях (миксоматозные дегенерации митрального клапана), а также в клапанах, изготовленных методом тканевой инженерии. Клетки этого фенотипа способны активно синтезировать и ремоделировать матрикс и участвует в процессе репарации повреждений (Aikawa E. et al., 2006). Оба этих фенотипа вместе обеспечивают стабильность и целостную структуру клапана и вовлечены в синтез и ремоделирование клапанного экстрацеллюлярного матрикса.

1.8 Клетки, используемые в тканевой инженерии клапанов сердца

1.8.1 Клетки, полученные из донорских сосудов

Исходно для тканевой инженерии клапанов сердца использовались культуры изолированных клеток, полученных из донорских сосудов, включая периферические артерии (Weber B. et al., 2012). К такого рода клеткам относятся два типа клеточных линий: эндотелиальные клетки, способные формировать конфлюэнтный слой с антитромбогенными свойствами на поверхности створки клапана, и миофибробласты, ответственные за продукцию протеинов экстрацеллюлярного матрикса и его биомеханические свойства (Weber B. et al., 2012). В то время как выделение этих клеток технически просто, а сами они неоднократно демонстрировали возможность к формированию тканей *in vitro*, использование клеток, полученных из сосудов, связано с серьезными недостатками. Получение подобной культуры клеток перед их заселением на матрикс связано с необходимостью наличия интактного сосуда донора, что существенно ограничивает использование этих клеток в педиатрии. Кроме того, такие сопутствующие заболевания, как сахарный диабет и атеросклероз могут вызывать дисфункцию клеток эндотелия, влияя на конфлюэнтность слоя клеток, полученных из сосудов при их заселении (De Vriese A.S. et al., 2002). Чтобы избежать нежелательных хирургических воздействий на реципиента, в тканевой инженерии клапанов сердца используются разные типы стволовых клеток.

1.8.2 Эндотелиальные прогениторные клетки периферической крови

Многие исследования показали, что присутствие эндотелия на поверхности тканей сердечно-сосудистой системы существенно снижает риск осложнений, связанных с тромбообразованием и воспалением, а также играет весомую роль для правильного

функционирования клапана в целом (El-Hamamsy I. Et al., 2009). Поэтому, для улучшения функциональных возможностей, створки аортальных клапанов, полученные методом тканевой модификации, часто покрывают слоем аутологичных эндотелиальных клеток (Kasimir MT et al., 2005). Зрелые эндотелиальные клетки могут быть успешно выделены и используются для получения клапанов сердца посредством тканевой инженерии. Однако зрелые эндотелиальные клетки имеют ряд недостатков, к которым в том числе относятся низкая воспроизводимость и низкие темпы роста (Alsberg E. et al., 2006), а также необходимость проведения инвазивного оперативного вмешательства для их получения, о котором говорилось выше. Эндотелиальные прогениторные клетки, впервые открытые в периферической крови Asahara et al. (Asahara T. et al., 1997), исследуются в качестве возможной альтернативы зрелым эндотелиальным клеткам. Исследования Schmidt et al. демонстрируют успешный опыт применения клеток этого типа как единственного клеточного ресурса для получения клапана посредством тканевой инженерии *in vivo* в модели на овцах (Schmidt D. et al., 2007). Однако считается, что их число в периферической крови весьма невелико.

1.8.3 Стволовые клетки

К определяющим свойствам стволовых клеток относят:

1. Самовоспроизводимость в клоногенных условиях
2. Возможность дифференцироваться в несколько линий (Weiner L.P. et al., 2008) [109].

Их применение сопряжено с рядом преимуществ:

1. Эти клетки способны дифференцироваться в различные клеточные линии *in vivo* под воздействием определенных биохимических и механических стимулов
2. Этим клеткам присущи уникальные иммунологические свойства, позволяющие им существовать в аллогенной среде и привлекать репаративные иммунные и/или прогениторные клетки хозяина.
3. Они демонстрируют высокую способность к пролиферации *in vitro* (Weber B. et al., 2012; Schmidt D. et al., 2007).

Стволовые клетки могут быть использованы в качестве субстрата заместительной и восстановительной клеточной терапии широкого спектра заболеваний, в том числе считавшихся ранее неизлечимыми. Кроме того, изучение фундаментальных механизмов, лежащих в основе пролиферации и дифференцировки стволовых и прогениторных клеток, имеет огромное значение для раскрытия принципов роста, развития, адаптации, регенерации и их нарушения на фоне патологических состояний (Анисимов С.В., 2012).

Среди большого количества разновидностей стволовых клеток, наибольшее применение в тканевой инженерии нашли фетальные стволовые клетки (клетки пупочного канатика и амниотической жидкости), мезенхимальные стволовые клетки (красного костного мозга, жировой ткани), эндотелиальные прогениторные клетки периферической крови, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (рисунок 6).

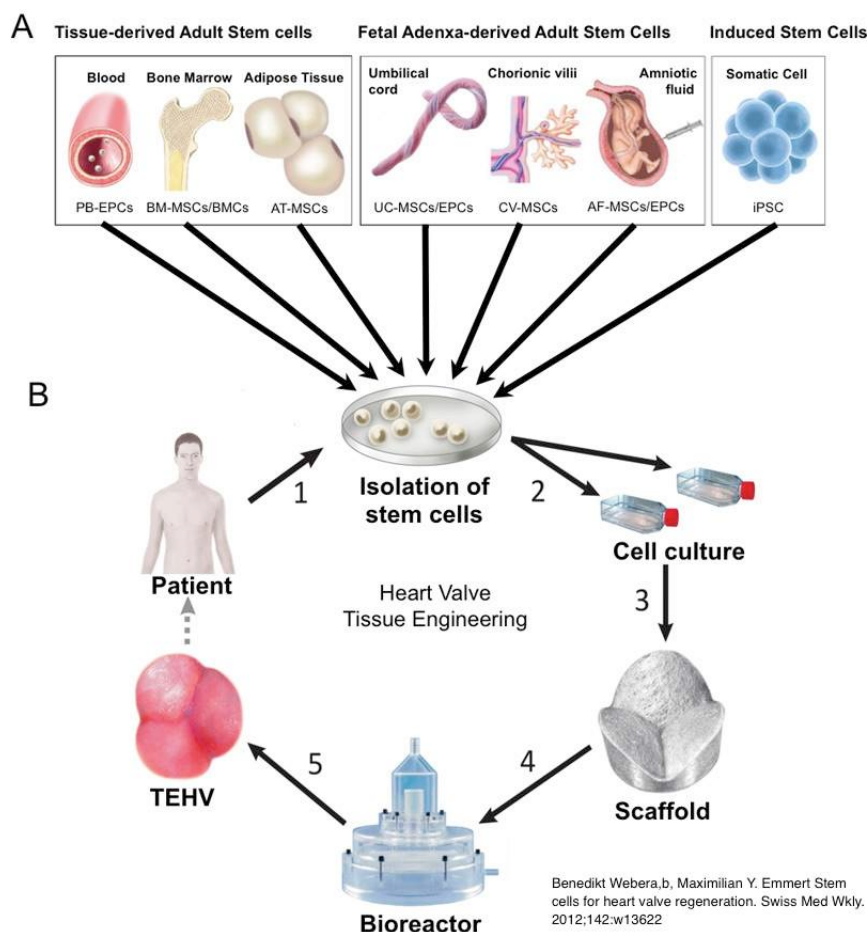


Рисунок 6 - Типы стволовых клеток, используемых в тканевой инженерии клапанов сердца.

Адаптировано из Weber B. et al. 2012

1.8.2.1 Мезенхимальные стволовые клетки красного костного мозга

Использование мезенхимальных стволовых клеток имеет ряд преимуществ перед клетками, полученными из сосудов:

1. Легкость получения путем несложной процедуры пункции костного мозга. При этом нет необходимости в хирургическом вмешательстве, целью которого является иссечение здорового сосуда донора.

2. Мезенхимальные стволовые клетки красного костного мозга способны дифференцироваться в различные клеточные линии мезодермального ростка: жировые, костные и хрящевые, стромальные (Шахпазян Н.К. и соавт., 2012; Prockop D.J. et al., 1997). Мезенхимные стволовые клетки обладают относительной высокой пролиферативной активностью и высоким уровнем пластичности и могут быть дифференцированы не только в клетки мезенхимного ряда, но и в нейроны (Анисимов С.В. и соавт., 2013). Этот тип клеток активно исследуется в качестве источника для получения тканеинженерных клапанов сердца (Kadner A. et al., 2002). Hoerstrup et al. смог получить *in vitro* трехстворчатый клапан с использованием клеток этого типа (Hoerstrup S.P. et al., 2002), а Sutherland et al. продемонстрировал эффективность их применения на *in vivo* модели клапана легочной артерии (Sutherland F.W. et al., 2005). Недавно на *in vivo* модели с овцой была испытана новая конструкция на основе тканеинженерного клапана аорты с применением мезенхимальных стволовых клеток красного костного мозга и устройства для миниинвазивной эндоваскулярной имплантации (Schmidt D. et al., 2007).

1.8.2.2 Мезенхимальные клетки жировой ткани

Было показано, что жировая ткань (как подкожная, так и висцеральная) содержит мезенхимальные стволовые клетки, способные к дифференцировке в различные фенотипы *in vitro* (Pansky A. et al., 2007). Благодаря своей высокой доступности и простому способу получить их в практически неограниченном количестве с помощью малоинвазивных способов (липосакция), мультипотентные стволовые клетки жировой ткани в будущем станут альтернативой мезенхимальным стволовым клеткам красного костного мозга (Zuk PA et al., 2001). Кроме того, что эти клетки обладают фенотипом мезенхимальных тканей, некоторые исследования показали, что стволовые клетки жировой ткани имеют признаки эндотелиальных прогениторных клеток, экспрессируют специфические эндотелиальные маркеры при культивировании с фактором роста эндотелия сосудов *in vitro*, и сохраняют способность к дифференцировке в эндотелиальные клетки *in vivo*, что является немаловажным фактом для их использования в тканевой инженерии клапанов сердца (Colazzo F. et al., 2010). Стволовые клетки жировой ткани кроме всего прочего имеют более высокую пролиферативную активность по сравнению со стволовыми клетками костного мозга. Colazzo et al. сообщает об успешных и многообещающих результатах использования стволовых клеток жировой ткани в своих исследованиях (Colazzo F. et al., 2011).

1.8.2.3 Мезенхимальные стволовые клетки амниотической жидкости

Амниотическая жидкость является привлекательным ресурсом клеток, особенно для детской кардиохирургии и педиатрии, так как предоставляет возможность доступа к фетальным клеткам всех трех ростков путем простой процедуры низкого риска – пункции амниотического мешка (Parolini O. et al., 2009). В 2007, Schmidt et al. продемонстрировал осуществимость получения жизнеспособных аутологичных створок аортального клапана *in vitro* с использованием стволовых клеток амниотической жидкости как единственного клеточного ресурса (Schmidt D. et al., 2007). Этот эксперимент показал, что стволовые клетки амниотической жидкости, как из культуры, так и после заморозки (Schmidt D. et al., 2008) могут быть успешно использованы для создания эндотелизированного тканеинженерного клапана сердца. Не смотря на эти многообещающие результаты, многие проблемы, такие как потенциальная канцерогенность и долгосрочная способность к экспансии, должны быть исследованы в будущих работах (Weber B. et al., 2012).

1.8.2.4 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Эмбриональные стволовые клетки являются «золотым стандартом» для исследований в области регенеративной медицины, так как обладают высоким потенциалом к дифференцировке и способны дифференцироваться во все три ростка. Однако проблемы этического характера, связанные с возможностью повреждения эмбриона, возможность индукции образования опухолей и развитие реакций иммунного отторжения *in vivo* не позволяют использовать клетки этого типа в клинической практике (Forsberg M. et al., 2012). При изучении этих клеток Takahashi et al. встраивал в фибробласты мышинных эмбрионов различные комбинации генов, ответственных за дифференцировку клеток эмбриона, и определил факторы, необходимые для воспроизведения клеток с потенциалом дифференцировки во все три ростка (Takahashi K. et al., 2006). Основными из этих факторов являются транскрипционные белки OCT-3/4, Sox-2, c-мус и KLF-4. Они требуются для пролиферации индуцированных плюрипотентных клеток. Основная идея этого процесса репрограммирования заключается в том, что даже зрелые дифференцированные клетки, например фибробласты кожи, можно снабдить свойствами плюрипотентных стволовых клеток, в том числе к перерождению в любой из трех ростков тела. В отличие от плюрипотентных стволовых клеток эмбриона, применение индуцированных стволовых клеток не связано с этическими проблемами исследований на эмбрионах и проблемами

иммунологического отторжения. Впервые в области тканевой инженерии эти клетки были применены Hibino et al. (Hibino N. et al., 2012). Он использовал их пласты клеток этого типа для создания сосудов. Не смотря на большие надежды, связанные с этими исследованиями, нестабильность генома, и ассоциированная с этим высокая потенциальная канцерогенность этих клеток остается основным препятствием для их клинического применения (Anisimov S., 2010).

1.9 Биореакторы в тканевой инженерии клапанов сердца

В физиологических условиях транспорт кислорода и питательных веществ к тканям и продуктов обмена из тканей решается за счет наличия капилляров. Трехмерные клеточные конструкции, синтезированные *ex vivo*, в большинстве случаев не имеют сосудистой сети, представленной в нативных тканях. Поэтому обмен питательными веществами и газами зависит напрямую от процесса диффузии веществ. В статических условиях, где не происходит смешивания среды, формируются большие градиенты диффузии между клеточными конструкциями и окружающей средой, таким образом клетки в центре конструкции получают меньше питательных веществ, чем необходимо, а устранение продуктов обмена происходит медленнее, - что в конце концов приводит к гибели клеток. Транспорт кислорода считается основным лимитирующим фактором обмена веществ при культивировании клеточных культур (Wang X., 2012; Shachar M. et al., 2003). Кроме того, давно известно, что механические сигналы регулируют развитие нормальных тканей. Успешный процесс получения клапанов сердца посредством тканевой инженерии напрямую связан с необходимостью применения механических стимулов. Структурная организация, состав и функция тканей сердца может подвергаться регуляции посредством изменения физиологических режимов циклического растяжения (Kada K. et al., 1999). Возможность биореакторов модулировать физиологический поток и параметры давления является определяющей для оптимизации клеточно-клеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, ведущих к пролиферации тех же генов, что и в условиях *in vivo* (Gandaglia A. et al., 2011).

Термин «биореактор» в контексте тканевой инженерии клапанов сердца может быть определен как устройство, способное воспроизвести биологические и физиологические условия сердечно-сосудистой системы (Cartier R.L. et al., 1999). Функциональные биореакторы должны поддерживать жизнеспособность тканей, модулируя как механические, так и биохимические условия. Идеальная конструкция биореактора должна позволять контролировать условия физико-химического окружения (pO_2 , pH , pCO_2), обеспечивать

асептические условия для питания и развития тканей и максимизировать условия для увеличения репродукции клеток (Carrier R.L. et al., 1999). В настоящее время существует две разновидности биореакторов: статические и динамические.

1.9.1 Статические биореакторы

Представлены простыми или модифицированными чашками Петри, на которых матрица после засева клетками культивируется в статичных условиях. Также в некоторых исследованиях были апробованы тесты с культивированием клеток в условиях микрогравитации или нулевой гравитации с использованием специальных биореакторов для исследования активности пролиферации микроорганизмов (Hoehn A. et al., 2004; Versari S. et al., 2007). В статических биореакторах определяющим фактором для пролиферации клеток являются диффузия веществ и газов. При этом аэрация происходит путем диффузии газов через поверхность питательной среды, а обмен веществ осуществляется путем диффузии молекул, так как в биореакторах подобного типа нет потока жидкости на поверхности тканевых конструкций (Freed L.E. et al., 2006).

1.9.2 Динамические биореакторы

Неудовлетворенность исследователей результатами статичного засева клеток привела к разработке целого ряда способов, основанных на ускоренной доставке клеток при действии разницы давлений, центробежных, электростатических, магнитных сил и их комбинаций. При этом значительно повышается эффективность использования клеток, однородность и глубина внедрения их в структуру носителя.

Первой попыткой использования биореактора для тканевой инженерии клапанов сердца в начале нового столетия было исследование Sodian et al. (Sodian R. et al., 2000). Используя простую систему с пульсирующим потоком, спроектированную для модулирования различных видов и условий потока и давления, авторам удалось увеличить уровень пролиферации клеток по сравнению со статическим культивированием. Также им удалось получить синтез нового аутологичного матрикса, который начал синтезироваться клетками на основе использованного первоначального биополимерного матрикса из полигидроксиалканата. Гетерогенную клеточную линию, полученную из каротидной артерии овцы, вначале статично заселяли на конструкцию, а затем помещали в биореактор. Самым интересным наблюдением этого исследования было то, что клетки на поверхности

матрикса выравниваются согласно потоку жидкости, формируя конфлюэнтный слой, и начинают секретировать коллаген и гликозаминогликаны. К сожалению, клетки, которые были способны к миграции внутрь пористой конструкции, не секретировали эластин; также в исследовании не приводится данных касательно изменения фенотипа клеток. С тех пор множество исследователей использовали биореакторы с пульсирующей струей для создания интактного тканеинженерного клапана (рисунок 7). Hoerstrup et al. создал один из первых компактных биореакторов для тканевой инженерии клапана сердца (Hoerstrup S.P. et al., 2000) (рисунок 7-1). Он состоял из воздушной камеры, камеры с питательной средой и перфузионной камеры, где был закреплен клапан сердца. Пульсирующий поток жидкости генерировался силиконовой пневматической мембраной, находившейся между воздушной камерой и камерой с питательной средой. Это устройство позволяло создавать поток жидкости в пределах от 50 до 2000 мл/мин, и давление в пределах от 10 до 240 мм рт. ст. В более поздних исследованиях Hoerstrup et al. (Hoerstrup S.P., Sodian R. et al., 2000) использовал конструкции из полигликолевой кислоты как матрицу для создания клапана сердца, и засеивал ее эндотелиальными клетками и миофибробластами каротидной артерии. В *in vivo* эксперименте все клапаны успешно функционировали спустя 20 недель после имплантации. Были выявлены повышенная продукция коллагена и ДНК, а также механические свойства, идентичные нативному клапану. Другой биореактор, созданный Zeltinger et al. (Zeltinger J. et al., 2001) (рисунок 7-3), включал резервуар с питательной средой, пневматическую камеру давления с эластомерным пузырем, таймер и устройство для контроля и создания различных режимов давления, и камеру, внутри которой был закреплен аортальный клапан. Пузырь помещался под клапаном и с помощью отрицательного давления создавал обратный поток жидкости, за счет которого происходило закрытие клапана. Schenke-Layland et al. (Schenke-Layland K. et al., 2003) создали систему (рисунок 7-3), схожую с биореактором Zeltinger et al. (Zeltinger J. et al., 2001), которая включала в себя вакуумную систему контроля пузыря, который в свою очередь контролировал давление и поток жидкости. В отличие от исследования Zeltinger, клапан сердца располагался под пузырем. Этот биореактор исследовали при потоке жидкости 3 л/мин и давлении 60/40 мм рт. ст. Weston et al. создал тубулярный биореактор с пульсирующим потоком жидкости, предназначенный для тестирования отдельных створок клапана, закрепленных швами на трубках биореактора (Weston M.W. et al., 2001). Насосы использовались для создания ламинарного и пульсирующего потоков по закрытой петле. Фильтр для диффузии газов и устройство для обмена тепла, находившиеся снаружи инкубатора, позволяли приблизить функционирование устройства к физиологическим условиям. Mol et al. (Mol A. et al., 2005) создали диастолический пульсдубликатор, который состоял из емкости с клапаном и емкости с

питательной средой. Он имел магнитный клапан, контролировавший подачу воздуха в цилиндр, который сжимал и разжимал трубки, создавая разность давлений. За счет разности давлений формировался пульсирующий поток жидкости. Также эта система имела подсоединенный в качестве «секции комплайнса» шприц, наполовину заполненный жидкостью, и наполовину воздухом. Было показано, что эта система настолько компактна, что на стандартной полке инкубатора может разместиться еще 5 таких систем. Lichtenberg et al. (Lichtenberg A. et al., 2006) спроектировал биореактор, состоявший из резервуара со средой, резервуара с клапаном, пульсирующей помпы и емкости для оксигенации (рисунок 7-5). Эта система позволяла напрямую контролировать уровень потока. Преобразователи давления, потока и температуры подсоединялись к биореактору. Устья магистралей для клеточной суспензии находились над и под клапаном. Роликовый насос контролировал ламинарный поток воздуха через камеру оксигенации. Эта система использовалась для подготовки клапана к клиническим условиям. Не так давно Karim et al. (Karim N. et al., 2006) спроектировал очень компактный биореактор, представлявший собой закрытую петлю и состоявший из наружного стеклянного цилиндра и внутреннего устройства для закрепления аортального клапана. Вход и выход цилиндра соединялся с помпой и резервуаром с питательной средой. Благодаря цилиндрической форме, этот биореактор можно вращать для равномерного распределения клеток на поверхности клапана. Dumont et al. (Dumont K. et al., 2002) спроектировал макет замкнутой системы, имитирующий строение левых камер сердца. Биореактор включал в себя камеру левого желудочка, «секцию комплайнса», резервуар для клапана, механический клапан и аэратор (рисунок 7-2). Эта система позволяла контролировать ударный объем, резистентность и частоту ударов. Наконец, биореактор Hildebrand et al. (Hildebrand D.K. et al., 2004) включал в себя полость левого предсердия, полость левого желудочка, переменный резистор, шаговый мотор и сенсоры давления и потока (рисунок 7-4). Система позволяла автоматически контролировать среднее давление, средний поток, частоту сокращений, ударный объем и форму кривой давления.

Syedain и Tranquillo в 2009 году испытали биореактор с пульсирующим током жидкости для рецеллюляризации клапана, изготовленного на основе фибриновых нитей, и отметили удовлетворительные результаты в виде улучшения структурных и механических свойств (Syedain Z.H., Tranquillo R.T., 2009). Клапаны заселялись фибробластами кожи и помещались в латексные трубки, которые подвергались циклическому сжатию в течение 3 недель. Доставка питательных веществ осуществлялась за счет медленной перфузии питательной среды.

В 2009 году, Vismara et al. (Vismara N. et al., 2009) создал устройство, специально предназначенное для производства жизнеспособных графтов из трупных клапанов сердца. За счет использования трансклапанного давления создавалась так называемая диастолическая

пульсовая стимуляция, сохранявшая клапан в закрытом состоянии. Биореактор имел возможность оценивать клапанный комплайнс, важный показатель биомеханического статуса и степени старости конструкции. Мониторинг комплайенса, основанный на измерении смещения диаметров, был впервые предложен Webb (Webb A.R. et al., 2007) для оценки поведения клапана в реальном времени.

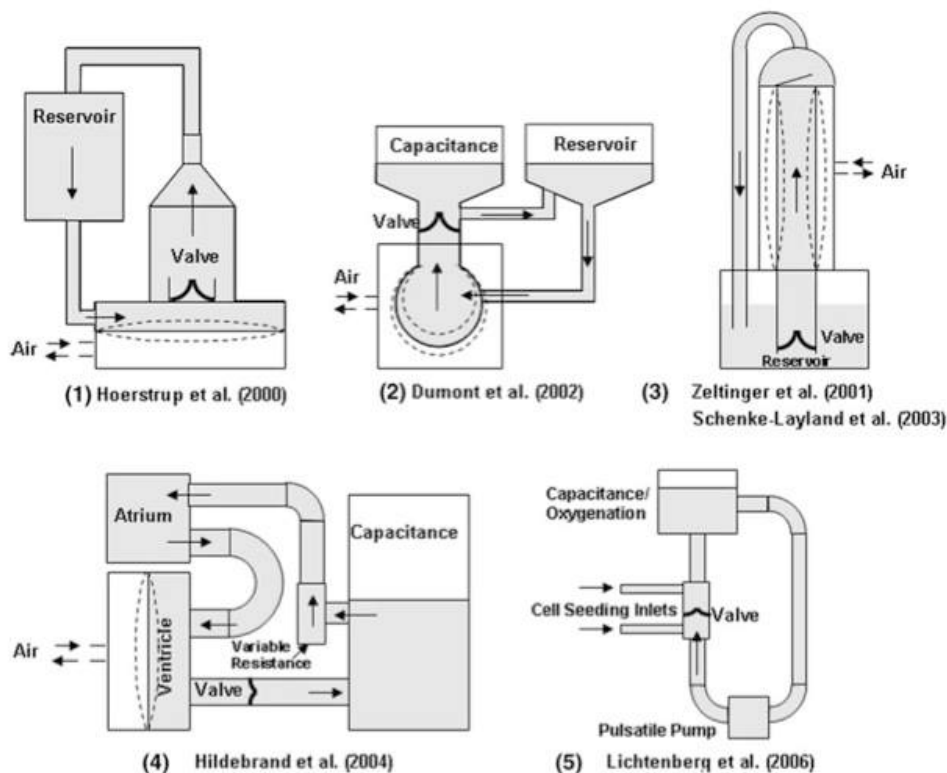


Рисунок 7 - Схематические изображения биореакторов для получения тканеинженерных клапанов сердца, используемых в мировой практике. Адаптировано из Berry J.L. et al. 2010

Благодаря способности изготовленных посредством тканевой инженерии клапанов сердца к росту и ремоделированию, превосходящим таковые у механических и биологических протезов, у кардиохирургов появилась альтернативная возможность использовать в своей практике современные заменители клапанов сердца (Huh J. et al., 2006; Mertsching H. et al., 2009).

1.10 Преклинические исследования и клиническое применение

Количество исследований, которые дошли до стадии *in vivo* модели на животных, невелико. В 2000 году рабочая группа Mayer (Mayer J.E. et al., 2000) сообщила о результатах имплантации 6 тканеинженерных клапанных конструкций в выносящий тракт правого желудочка овец. Было показано, что через 20 недель формируется ткань, состоящая из

собственного коллагена животных-реципиентов, который покрывается конфлюэнтным слоем эндотелиоцитов. Полная деградация биосинтетической матрицы происходит спустя 8 недель.

Stock и коллеги (Stock U.A. et al., 2000), а позже Sutherland и коллеги (Sutherland F.W. et al., 2005) с использованием различных типов клеток продемонстрировали формирование эндогенной ткани в клапанных структурах легочной артерии на модели с овцами. Эксплантация тканеинженерных клапанов происходила на 4-й и 8-й месяцы, и производилась их гистологическая и иммуногистохимическая оценка. Показатели максимального и среднего трансклапанных градиентов, эффективной площади поверхности были в пределах нормы, наблюдалась незначительная или умеренная регургитация.

В 2006 году исследовательская группа Haverich на модели с овцами представила аллогенный трансплантат на основе аутологичного децеллюляризованного клапана легочной артерии (Lichtenberg A. et al., 2006). Бесклеточный клапан легочной артерии был реэндотелизован с использованием простого биореактора, обеспечивавшего механические стимулы для роста клеток. Эндотелиальные клетки формировали непрерывный слой и экспрессировали фактор фон Виллебранда и NO-синтазу. Этот графт в дальнейшем был использован для замены собственного клапана легочной артерии овцы. После имплантации на поверхности клапана сохранился эндотелий, однако в отличие от контрольного децеллюляризованного клапана, не подвергшегося реэндотелизации и также имплантированного овце, в исследуемой группе было отмечено развитие тромбоза клапана из-за гиперплазии неоинтимы. В том же году эти исследователи сообщили о трехлетних результатах наблюдения двух детей, которым были имплантированы децеллюляризованные клапаны легочной артерии, предварительно заселенные человеческими эндотелиальными прогениторными клетками из донорской крови добровольцев (Sebotari S. et al., 2006). Для заселения клетками снова использовали биореактор простой конструкции. Одновременно было заселено несколько клапанов – два из них были имплантированы детям, а остальные использовались в качестве контроля. Как сообщалось, пациенты на момент исследования оставались живы и чувствовали себя хорошо, а клетки, заселенные на створки, активно экспрессировали фактор фон Виллебранда и рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Примечательно, что согласно результатам эхокардиографического исследования отмечался рост трансплантата вместе с ростом тела маленьких реципиентов.

Широко известная американская компания CryoLife, Inc в 2000 году начала выпуск децеллюляризованных свиных клапанов аорты под торговой маркой SynerGraft™. Эти клапаны прошли испытание на овцах в течение года, гидродинамические и иммунологические исследования (Goldstein S. et al., 2000).

Технология изготовления этих клапанов включала множественные циклы заморозки-оттаивания, лизис клеток применением осмотической децеллюляризации, использование ДНК-азы и пролонгированной экстракции водными растворами. Через несколько месяцев появились сообщения о плохом самочувствии детей, получивших этот продукт в качестве имплантата, а через 3 года вышла статья с анализом ситуации (Simon P. et al., 2003).

В ней сообщалось, что 1 пациент семи лет умер через 7 суток после операции, 1 девятилетний пациент умер спустя 6 месяцев после операции, еще 1 ребенок умер через год. Причиной смерти послужили клапан-ассоциированные осложнения в виде разрывов створок, воспалительных изменений и стенозов. 1 ребенку потребовалась реоперация спустя 2 суток после первичной операции. На всех клапанах наблюдались воспалительные изменения, фиброз, инкапсуляции, перфорации и износ створок. До конца причины развившихся осложнений остались неясными, но, вероятно, виной всему послужил неверный протокол децеллюляризации.

Несмотря на такую громкую неудачу, попытки внедрить метод децеллюляризации продолжались и далее, уже более успешно. В 2005 году Dohmen и Konertz опубликовали результаты двух летних наблюдений после имплантации 50 графтов пациентам от 17 до 70 лет (Dohmen P.M. et al., 2005; Konertz W. et al., 2005).

В их исследовании, 1 пациент умер в послеоперационном периоде, двое потребовали реоперации в связи с клапан-ассоциированными осложнениями. Состояние остальных пациентов оценивалось как удовлетворительное. Те же исследователи в 2006 году сообщили уже о 226 прооперированных пациентах, получивших децеллюляризованный ксенографт. Смертность составила 2,7% из которых всего 5 случаев связаны с клапанными осложнениями (протезный эндокардит), состояние остальных пациентов опасений не вызывает (Dohmen P.M. et al., 2006).

Da Costa et al. сообщили об 11 успешно выполненных операциях Росса с использованием децеллюляризованных аллогraftов, изготовленных по авторизированной технологии AutoTissue (da Costa FD et al., 2005). Периоперационной смертности при этом не отмечалось, 1 пациент реоперирован по поводу кровотечения. У всех пациентов исследовался уровень антител к HLA класса I и II, и лишь у двоих он был повышен, в то время как в группе пациентов, получивших классический криоконсервированный гомогraft, было выявлено выраженное повышение таких антител у всех пациентов. Протокол децеллюляризации этих клапанов является интеллектуальной собственностью компании и засекречен.

В целом, неплохие результаты клинического применения децеллюляризованных ксено- и аллогraftов вселяют надежду на дальнейшее развитие данного метода тканевой инженерии и

совершенствование протоколов децеллюляризации клапанов сердца, которое позволит более широко использовать их в лечении пациентов соответствующего профиля.

1.11 Заключение

Тканевая инженерия как самостоятельное направление в сфере биомедицинских наук является, пожалуй, самой молодой среди существующих ныне. Появившаяся около 50 лет назад, свое активное развитие она получила всего 20 лет назад, и продолжает развиваться до сих пор, привлекая своей перспективностью не только исследователей, но и инвестиции.

Ключевым этапом тканевой инженерии клапанов сердца, как, впрочем, и других органов и тканей, является получение матрицы, «скелета» будущей конструкции. При этом матрица должна не только отвечать всем необходимым физиологическим и биомеханическим требованиям, но и быть пригодной для заселения клеток, которые будут жить в микроокружении, создаваемом этой матрицей. К настоящему моменту исследования, посвященные получению таких матриц, ориентированы в два принципиальных направления: биodeградируемые со временем в теле реципиента, и получаемые из гомологичных тканей с помощью различных модификаций. Было предложено множество материалов для создания основы графтов – полигликолевая кислота, полимолочная кислота, гидрогели, коллагеновые пласты и децеллюляризованные графты.

Мировой опыт исследований в области децеллюляризации тканей, в том числе и клапанов сердца, говорит о том, что исследователи не пришли к единому «рецепту», позволяющему максимально устранить весь клеточный состав и компоненты клеток из тканей таким образом, чтобы не оказывать или минимизировать воздействие на delicate структуры экстрацеллюлярного матрикса. Это объясняется большим количеством реагентов, пригодных для решения этой задачи, разнообразием условий, в которых проводятся эксперименты, а также тем, что не существует единого подхода к оценке эффективности полученных результатов.

От идеи о том, что матрица, не заселенная предварительно клетками, после ее имплантации способна к рецеллюляризации в условиях центрального кровотока вследствие миграции клеток, быстро отказались ввиду повышенной тромбогенности имплантируемой ткани. Предварительное заселение клеток помогает не только снизить тромбогенность поверхности имплантируемого графта, но и инициировать процесс реорганизации матрикса еще до этапа имплантации.

Проводятся исследования, направленные на выбор оптимального типа клеток,

используемых для создания тканеинженерных конструкций. Среди большого количества разновидностей стволовых клеток, наибольшее применение в тканевой инженерии нашли фетальные стволовые клетки (клетки пупочного канатика и амниотической жидкости), мезенхимальные стволовые клетки (красного костного мозга, жировой ткани), эндотелиальные прогениторные клетки периферической крови, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Многие исследования посвящены поиску оптимального способа заселения клеток при разработке тканеинженерных клапанов сердца. При этом анализ статичных способов заселения показал неудовлетворительные результаты. Успешный процесс получения клапанов сердца посредством тканевой инженерии напрямую связан с необходимостью применения механических стимулов, модулируемых биореактором. В мире описан не один десяток конструкций подобного рода. Принципиально важно, чтобы биореактор не только адекватно модулировал множество параметров центральной гемодинамики, но и мог поддерживать необходимые условия для роста клеток.

Использование трехмерных экстрацеллюлярных тканевых матричных скаффолдов в качестве основы для аутологичных клеток в целях получения протеза клапана сердца – это возможность решить проблему нехватки донорского материала, ускорить процесс регенерации органа и улучшить качество жизни пациента после трансплантации. Важным условием для этого является получение экстрацеллюлярного матрикса, свободного от клеток донорской ткани и, в то же время, неповрежденного децеллюлирующими агентами, сохраняющего свою архитектуру, состав, физические свойства и, как следствие, способного к полноценному выполнению своих физиологических функций (Попандопуло А.Г. и соавт., 2013).

Не смотря на очевидный прогресс в области тканевой инженерии, основные исследования еще впереди. К настоящему времени, опубликованы лишь единичные работы, посвященные преклиническим и клиническим испытаниям клапанов сердца, полученных посредством тканевой инженерии. Однако, в целом неплохие их результаты вселяют надежду на дальнейшее успешное развитие тканевой инженерии органов сердечно-сосудистой системы, которое позволит более эффективно лечить пациентов соответствующего профиля.

Тканевая инженерия органов и тканей сердечно-сосудистой системы стоит на стыке нескольких наук: клеточной биологии, гистологии, физиологии, кардиологии, кардиохирургии, трансплантологии. Ее возникновение и активное развитие продиктовано интенсивным ростом числа реконструктивных и клапанозамещающих операций на сердце, и призвано ответить на вопрос, волнующий многих исследователей: возможно ли создать такой протез клапана сердца, который бы не только отвечал всем техническим и гемодинамическим характеристикам, но стал бы по сути частью структур сердца реципиента, не требующей ни

приема дополнительных лекарств, ни повторных операций для его замены. Решение этой непростой задачи, требующее большого количества совместных усилий ученых во всем мире, еще предстоит открыть. Однако на пути к ее решению найдены ответы на многие важные вопросы, и эти достижения в области тканевой инженерии клапанов сердца вселяют оптимизм и веру в успех в реализации поставленной цели.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 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 No.596/76, рег. No.10330 от 11.09.2007 г., приказ No. 223н/38 от 6.05.2008 г.). Гомографты извлекались от доноров с неработающим сердцем с давностью смерти не более 12 ч.

Критерии включения доноров:

- давность смерти (post-mortem интервал) не более 12 ч
- возраст: 18-65 лет

Критерии исключения доноров:

- трансмиссивные инфекции (ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис, туберкулез)
- протозоозные инфекции (Бруцеллез, лихорадка Q)
- наличие активного инфекционного процесса, септицемии
- анамнез онкологических заболеваний
- заболевания соединительной ткани
- неустановленная причина смерти
- анамнез врожденных пороков сердца

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 Са-/Mg-) (БиоЛот, Россия) в сочетании с антибактериальными средствами (Jashari R. et al., 2005):

- ванкомицин (Лек, Словения) 6 мг/мл
- метронидазол (Гедеон Рихтер, Венгрия) 6 мг/мл
- амикацин (Синтез, Россия) 6 мг/мл
- ципрофлоксацин (KRKA, Словения) 1,5 мг/мл
- амфотерицин (Гедеон Рихтер, Венгрия) 25 мг/мл.

Контейнер доставлялся в лабораторию и помещался в холодильник при $+4^{\circ}\text{C}$ на срок не менее 24 ч для стерилизации.

После забора тканей в протоколе исследования фиксировались ФИО донора, возраст, причина смерти, дата смерти и вскрытия, диагноз.

2.2 Выделение гомографта

Выделение гомографта производилось в специальном помещении, в ламинарном шкафу 2-го класса. Микробиологический контроль фильтра, помещения, рабочей установки, проверка систем кондиционирования воздуха проводились каждые 6 месяцев. Для проведения исследований в биореакторе использовался цельный корень аорты, предварительно очищенный от окружающих тканей, и соответствовавший критериям включения в исследование (рисунок 8).



Рисунок 8 - Цельный корень аорты человека, готовый для дальнейших исследований в биореакторе

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) (рисунок 9А), 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 5х2 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 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 (рисунок 9Б).

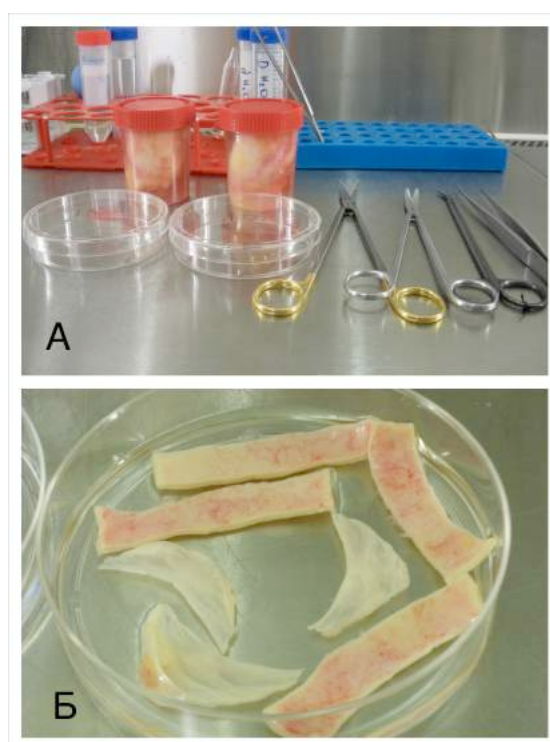


Рисунок 9 - Вид рабочей зоны и тканей перед началом исследований. А – набор необходимого хирургического инструментария. Б – вид тканей перед началом исследований

2.3 Децеллюляризация створок аортального клапана и фрагментов восходящей аорты

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. Et al., 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 (см далее п. 3.2). Не достигнув успеха, мы приступили к поиску оптимального протокола децеллюляризации эмпирическим путем, используя различные компоненты и варьируя их концентрации (подробнее см. п. 3.2). В итоге нами был получен оригинальный эффективный протокол децеллюляризации как створок аортального клапана, так и фрагментов восходящей аорты, более подробно описанный в разделе «Результаты» п. 3.2». 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 Х-100 (Sigma, США). Этап разрушения нуклеиновых кислот проводился в течение 24-48 ч при +37°C в условиях постоянного перемешивания (Reider E. Et al., 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°C в условиях постоянного перемешивания (Reider E. Et al., 2005).

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

2.4 Гистологическая и иммуногистохимическая оценка

Участки исследуемых тканей помещались в 4% нейтральный формалин на 4 ч, дегидратировались в спиртах и заливались в парафиновые блоки по стандартной программе на автоматическом тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica, Германия). С помощью микротомы делались серии поперечных срезов тканей толщиной 5 мкм. Для определения равномерности проведённой децеллюляризации исследовали срезы, сделанные по краям и в центре препарата.

2.4.1 Окраска гематоксилином-эозином

Для гистологического исследования приготовленные срезы депарафинировались и окрашивались гематоксилином-эозином для общей оценки препарата и визуализации ядер клеток. Оценивалось количество сохранных ядер в исследуемых образцах тканей по сравнению с контролем, а также наличие повреждений и целостности экстрацеллюлярного матрикса. Изучение микропрепаратов проводилось на световом микроскопе Leica DM1000 с фотокамерой с увеличением от x10 до x1000 (Leica, Германия). 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.

2.4.2 Окраска по Ван Гизону

Эта окраска применяется для изучения структуры и свойств соединительной ткани. Для окраски по Ван Гизону парафин из срезов удалялся ксилолом, срез проводился через спирты нисходящей крепости до 80% этанола, и окрашивался железным гематоксилином Вейгерта в течение 10 минут. После этого препарат промывался в дистиллированной и проточной воде, окрашивался красителем Ван Гизона в течение 5 минут. Далее препарат снова отмывался в спиртах, просветлялся в двух порциях орто-ксилола и закреплялся нейтральным бальзамом. В результате окраски ядра клеток приобретали чёрный цвет, коллаген — красный, другие тканевые элементы (включая мышечные волокна и эритроциты) — желтые, фибрин — жёлтый или оранжевый.

2.4.3 Иммуногистохимия

Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования использовался непрямой двойной метод визуализации EnVision (Dako, Дания). В качестве первичных антител применялись моноклональные антитела к антигенам CD34 (PECAM-1) и к альфа-гладкомышечному актину (α -SMA) (Dako, Дания). Иммуногистохимические препараты дополнительно прокрашивались гематоксилином. Изучение микропрепаратов проводилось в ультрафиолетовом освещении на микроскопе Leica DM1000 с фотокамерой с увеличением от $\times 10$ до $\times 1000$ (Leica, Германия). Позитивная окраска тканей считалась неудовлетворительным эффектом децеллюляризации, негативная окраска свидетельствовала об эффективной и успешной децеллюляризации.

2.4.4 Окраска DAPI

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. Контрольные и децеллюляризованные створки аортального клапана отмывались от красителя в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ Ca-/Mg-), децеллюляризованные створки аортального клапана окрашивались раствором красителя в течение 20 мин, после чего снова отмывались. Изучение препаратов проводилось на световом микроскопе Leica DM1000 с фотокамерой с увеличением от $\times 10$ до $\times 100$ (Leica, Германия). При этом отсутствие характерного свечения ядер клеток в поляризованном свете считалось удовлетворительным эффектом выполненного протокола децеллюляризации.

2.5 Определение остаточных ДНК и РНК в тканях

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 ($n=5$). Фрагменты тканей замораживались на -80°C , после чего гомогенизировались в аппарате TissueLyser (QuiaGen, США) Для выделения молекул РНК использовался метод тризол-хлороформенной экстракции, после чего нуклеиновые кислоты отмывались изопропанолом и преципитировались в спиртах. Для выделения молекул ДНК после лизиса тканей тризольным способом, отмывались остатки

клеток, ДНК преципитировалось в спиртах. Супернатант дважды отмывался цитратом натрия, осадок ресуспендировался в 75% этаноле. После центрифугирования осадок осушался, а ДНК солюбилизировалось раствором щелочи. После центрифугирования супернатант растворяли в свободной от нуклеаз воде.

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

2.6 Биомеханические исследования

Исследования проводили на универсальной разрывной машине Instron 5543 (Instron, США).

2.6.1 Биомеханические исследования створок аортального клапана

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). С помощью хирургических инструментов (коронарные ножницы и пинцет) ткани подготавливались для стандартизации условий проводимого исследования (рисунок 10).



Рисунок 10 - Подготовка тканей для биомеханических исследований

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. Толщина створки рассчитывалась для образцов каждой группы использованием метода

макрофотографии с использованием фотоаппарата Canon PowerShot SX50 (Canon, Япония) и обработки с помощью программного обеспечения Adobe Photoshop CS6 (Adobe, Ирландия). Также для измерения толщины створки нами исполся цифровой микрометр (Digital Micrometers, 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. Для предотвращения выскальзывания ткани поверхность рабочих захватов была покрыта наждачной бумагой. После фиксации в аппарате производилось преднапряжение 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:

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

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 (E , МПа):

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

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

2.6.2 Биомеханические свойства восходящей аорты

Биомеханические свойства восходящей аорты оценивались аналогичным образом в продольном и поперечном направлении. Для этого на разрывной машине изучались участки восходящей аорты контрольной (20 образцов) и исследуемой (20 образцов) групп длиной 3 см и шириной 1 см. Толщина образцов тканей была измерена при анализе макрофотографий образцов каждой группы с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS6 (Adobe, Ирландия). Также для исследования толщины образцов восходящей аорты использовался цифровой микрометр. В дальнейшем для вычислений мы использовали среднее арифметическое толщины для каждой группы. После фиксации образцов аорты в рабочих захватах разрывной машины и преднатяжения 0,5 Н производилось растяжение образцов со скоростью 1 мм/секунду до полного их разрушения. На основании автоматически фиксируемых параметров силы и изменения длины с использованием программного обеспечения Bluehill2 (США) строились кривые зависимости напряжения/деформации и рассчитывался модуль упругости.

2.6.3 Биомеханическое исследование прочности шва стенки аорты

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. Толщина измерялась с использованием микрометра. 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 (рисунок 11).

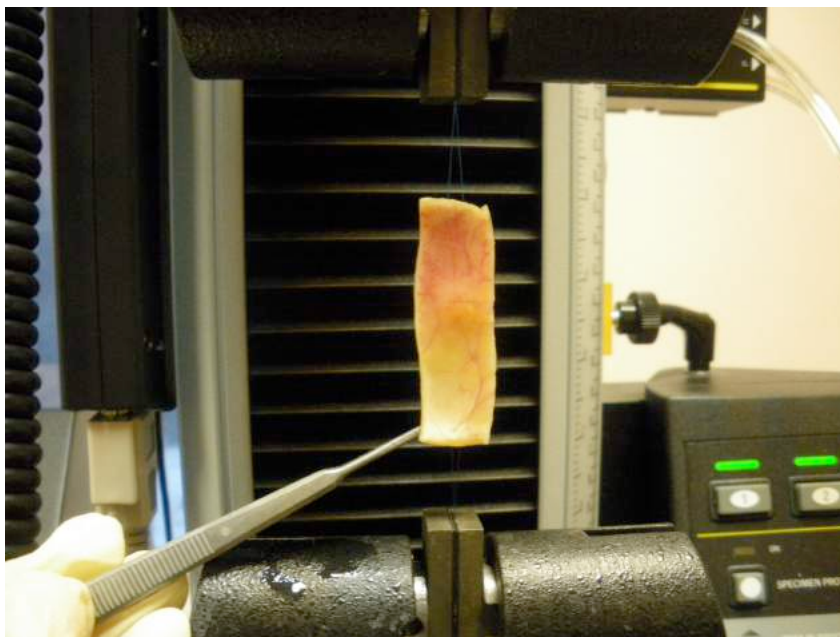


Рисунок 11 - Исследование прочности шва стенки аорты. Фрагмент нативной восходящей аорты (контроль) фиксирован за проведенные через его края швы в зажимах разрывной машины

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.

2.6.4 Статистический анализ

Данные, полученные при проведении исследований, были обработаны в программе «Microsoft Excel». Результаты приводятся как среднее арифметическое значение $\pm$ стандартное отклонение. Степень достоверности межгрупповых различий средних значений оценивалась с помощью непарного t-теста Стьюдента с двухсторонним распределением (функция «ТТЕСТ» в Microsoft Excel). Нулевая гипотеза заключалась в равенстве исследуемых групп. Если результат t-теста был больше уровня значимости ($\alpha = 0,05$), отличия в выборках считались достоверно не отличающимися друг от друга ($P < 0,05$).

2.7 Рецеллюляризация

2.7.1 Получение клеток для рецеллюляризации

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. Красный костный мозг получали при выполнении диагностических пункций пациентам ФМИЦ под местной анестезией. Костный мозг аспирировали иглой Кассирского из области грудины или иглами большого диаметра путем пункции гребня крыла подвздошной кости с обеих сторон в пустой шприц. Содержимое шприц сразу же переносили в пробирки, содержащие антикоагулянт (K_2 -ЭДТА). Объем забираемой костномозговой взвеси – от 5 до 10 мл.

Жировую ткань получали путем иссечения небольшого участка жировой ткани (3х3 см) из подкожного жира передней поверхности груди во время выполнения кардиохирургических операций. Жировую ткань помещали в стерильную пробирку с охлажденным фосфатно-солевым буферным раствором и в течение 15 минут после иссечения доставляли в лабораторию.

2.7.1.1 Получение стволовых клеток красного костного мозга

Стволовые клетки красного костного мозга получали из антикоагулированного при помощи K_2 -ЭДТА аспирата с использованием метода центрифугирования в градиенте плотности. Для этого в ламинарном шкафу 2-го класса с вертикальным потоком воздуха (KojAir, Финляндия) аспират разводили в 4 раза стерильным фосфатно-солевым буферным раствором (БиоЛот, Россия). Полученную взвесь с помощью электрического пипеточного дозатора (Gilson, США) наслаивали на раствор Ficoll-Paque Plus (GE HealthCare, Великобритания) плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$ и центрифугировали 40 мин при 400 g (относительная сила центрифугирования) в универсальной центрифуге (Eppendorf, США) в стерильных центрифужных пробирках емкостью 50 мл (Greiner, Германия). Фиколл создает градиент плотности, за счет которого эритроциты, имеющие большую плотность, осаждаются на дно, а лейкоциты и мононуклеары образуют слой над фиколлом. Не допуская смешивания, с помощью механического дозатора (Gilson, США) осторожно собирали клетки, образующие белесоватое кольцо над фиколлом. При этом попадание фиколла в собираемую клеточную суспензию не допускали.

Полученную суспензию клеток дважды отмывали центрифугированием в фосфатно-

солевом буферном растворе 10 минут при 300 g. Подсчет клеток производили с помощью счетной камеры Бюркера. Супернатант удаляли, а осадок ресуспензировали в 10 мл среды, содержащей: в качестве основы питательную среду альфа-МЕМ без глутамин (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 1% L-глутамин (Invitrogen, США), 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen, США). Суспензию мононуклеаров в питательной среде переносили в культуральные пластиковые стерильные флаконы объемом 25 см³ (Falcon, США) и помещали в CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония) в атмосферу газовой смеси, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха, при 95% влажности и температуре 37°C.

Через 48 часов инкубации среду с неадгезированными клетками собирали, флакон трижды отмывали стерильным фосфатно-солевым буферным раствором, и вновь заливали среду для культивирования МСК. Каждые 48 часов производили смену ½ объема специализированной среды для культивирования МСК с визуальным контролем скорости пролиферации клеток методом микроскопирования с использованием универсального инвертированного микроскопа (Zeiss, Германия) с применением фазового контраста (рисунок 12).

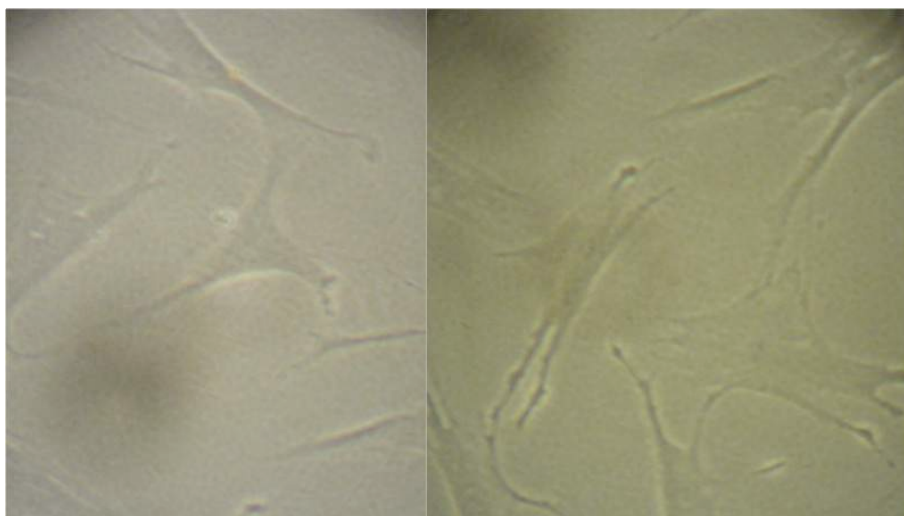


Рисунок 12 - Мультипонентные стволовые клетки красного костного мозга при микроскопии (фазовый контраст). Увеличение 40х

После формирования культивируемыми клетками субконфлюэнтного монослоя, производили нулевой пассаж клеток. Для этого среду сливали из флакона, дно отмывали буферным раствором и заливали предварительно разогретым 0,05% раствором трипсина/ЭДТА (Sigma, США). Флакон с трипсином инкубировали при +37°C в течение 3-5 минут, после чего производили визуальный контроль sluщивания клеточного монослоя под микроскопом. После sluщивания большей части клеток раствор сливали в центрифужную

пробирку и инактивировали двойным объемом питательной среды. Далее производили отмывание центрифугированием в течение 10 минут при 300 g. После этого производили подсчет клеток в счетной камере Бюркера, а клеточный осадок ресуспензировали в питательной среде и засеивали в новые флаконы для получения первого пассажа (P1).

По достижении первым пассажем 75-90% конфлюэнтности, клетки пересевали в культуральные флаконы объемом 75 см³ для получения последующих пассажей до достижения необходимого для рецеллюляризации количества МСК. В экспериментах использовали культуры 3-4 пассажей (P3–P4).

2.7.1.2 Получение стволовых клеток из жировой ткани

После доставки участка жировой ткани в лабораторию в ламинарном шкафу 2-го класса выполняли его отмывание от крови и сгустков стерильным фосфатно-солевым буферным раствором. Затем жировую ткань гомогенизировали с использованием стерильного хирургического лезвия №23 (Paragon, Великобритания). После этого жировую ткань подвергали ферментации равным объемом 0,075% раствора коллагеназы III и гиалуронидазы (Sigma, США), для чего фрагментированную жировую ткань инкубировали с коллагеназой при +37°C в течение 45 минут в фосфатно-солевом буферном растворе. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом фосфатного буферного раствора, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Полученную в результате обработки коллагеназой суспензию клеток отмывали центрифугированием при 400 g в течение 10 минут дважды. Клеточный осадок, содержащий стромальные клетки, ресуспензировали в полной питательной среде и производили подсчет клеток при помощи счетной камеры Бюркера. Полученную суспензию клеток в полной питательной среде помещали в культуральные флаконы из расчета 5×10^4 клеток на 1 см². Клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 24 ч для адгезии МСК. Через 24 ч удаляли среду с не прикрепившимися клетками и добавляли 4 мл новой полной питательной среды. МСК культивировали, проводя замену половины количества питательной среды на новую каждые вторые сутки, при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ до достижения культурой 80-90% конфлюэнтности. После формирования культивируемыми клетками субконфлюэнтного монослоя клетки пересевали на новые флаконы по методике, описанной выше. В экспериментах использовали клетки 3-7 пассажей (P3-P7).

2.7.2 Рецеллюляризация в статичных условиях

Для рецеллюляризации в статичных условиях использовали МСК 3 пассажа и децеллюляризованные створки аортального клапана, обработанные по описанному выше протоколу. 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). При этом в первой лунке ряда находился так называемый нулевой контроль – 2 мл питательной среды, во второй лунке ряда находился контрольный образец – децеллюляризованная створка аортального клапана, помещенная в 2 мл питательной среды, в третьей лунке ряда находилась децеллюляризованная створка с нанесенными на нее клетками в 2 мл питательной среды. 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. Частичная смена среды производилась 1 раз в 2 дня. 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, среда менялась 1 раз в 2 дня. По истечении 7 суток образцы фиксировали в формалине и отправляли на гистологическое исследование.

2.8 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.

В качестве контура использовались полимерные трубки для аппарата искусственного кровообращения (Raumedic, Германия) диаметром $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{8}$ и $\frac{1}{4}$ дюйма, и пластиковые переходники соответствующего диаметра к ним.

Для осуществления перфузии применялась роликовая помпа от аппарата искусственного кровообращения (Stockert, Германия). Питание этой помпы осуществлялось от сети 220 вольт. Сама 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 мониторингования отмечалась характерная для пульсирующего потока кривая (рисунок 13), что позволяет говорить о том, что исследования проводились в условиях пульсирующего потока жидкости.



Рисунок 13 — Кривая давления, регистрируемая на портативном мониторе при создании пульсирующего потока жидкости в биореакторе

Для мониторингирования параметров перфузии к системе подключался многопараметрический анестезиологический портативный монитор (Datex, Великобритания). Контролировалось давление в системе, оценивался характер кривой давления (рисунок 13).

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 (IntAir Medical, Франция).

2.9 Децеллюляризация в биореакторе

Сконструированный биореактор предназначен как для процесса децеллюляризации, так и процесса рецеллюляризации. 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 (рисунок 14).

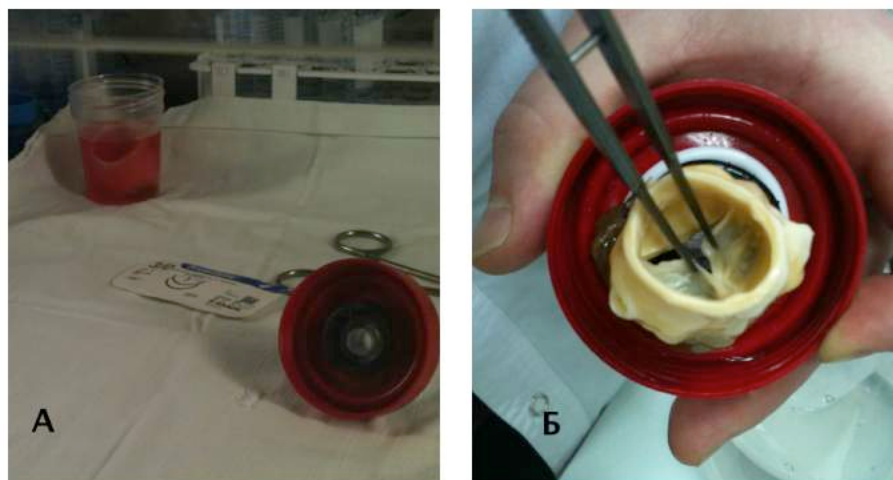


Рисунок 14 - Фиксация гомографта к манжете крышки контейнера. А. Подготовительный этап для децеллюляризации с использованием биореактора. Б. Гомографт подшит к манжете крышки контейнера

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. (рисунок 15).



Рисунок 15 - Децеллюляризация аортального гомографта в биореакторе

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 (см. главу Материалы и Методы, раздел 2.1 «Забор материала»)

2.10 Рецеллюляризация в биореакторе

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 (Тегито, 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 (рисунок 16).

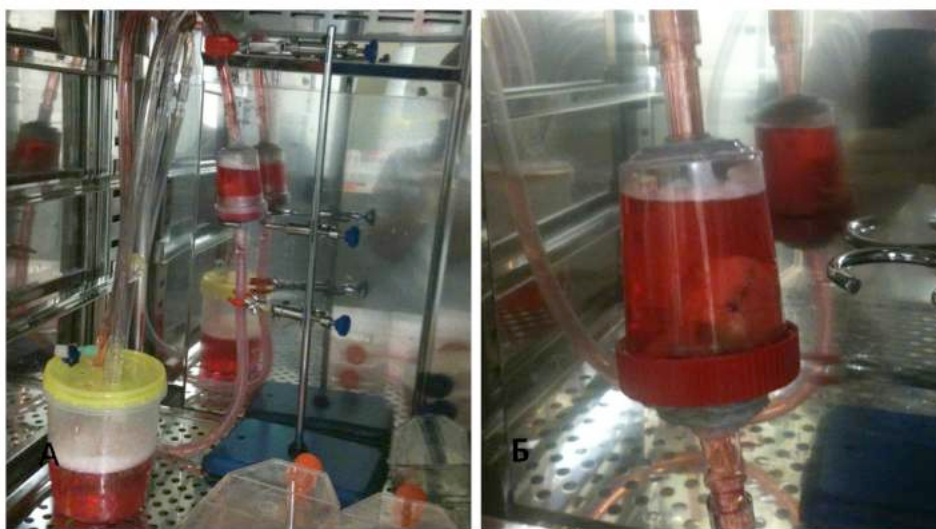


Рисунок 16 - Рецеллюляризация аортального гомографта в биореакторе. А – общий вид в инкубаторе. Б – контейнер с гомографтом, заполненный питательной средой

Первоначальная производительность насоса составляла 100-150 мл/мин. Производительность насоса увеличивали на 150 мл/мин дважды в день до достижения скорости перфузии 2 л/мин. Давление в системе поддерживалось на уровне 50-120/10-60 мм рт. ст. Каждый третий день производилась смена половины объема питательной среды. Спустя 10 дней инкубации, гомографт отправляли на морфологическое исследование.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Макроскопическая оценка тканей

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.

3.2 Поиск эффективного способа децеллюляризации

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 (протокол 1, таблица 2). 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.

Вначале мы решили увеличить концентрацию дезоксихолата натрия и проверить модифицированный метод на створке аортального клапана. Нами были опробованы

протоколы с увеличением концентрации используемого детергента в 2, 4 и в 10 раз (протокол 2, таблица 2), но они не привели к желаемому результату — по-прежнему при окраске гематоксилином-эозином в структуре створки аортального клапана и стенке аорты сохранялось около 80%-90% ядер клеток. Использование гипотонического 0,45% раствора хлорида натрия или дистиллированной воды (протокол 3, таблица 2) в качестве веществ, вызывающих осмотический шок и лизис клеток, в течение 6 и 12 ч перед обработкой детергентом также не имело результата.

В процессе дальнейшего поиска эффективного протокола децеллюляризации створки аортального клапана, несмотря на имеющиеся указания в литературе о негативном влиянии раствора додецилсульфата натрия и раствора трипсина на свойства матрикса (Samouillan V. et al., 1999; Korossis S.A. et al., 2002; Rieder E. et al., 2004), было решено протестировать протоколы с их использованием. Были апробированы протоколы децеллюляризации створки аортального клапана с использованием комбинации растворов додецилсульфата натрия и дезоксихолата натрия в концентрациях 0,05%, 0,075% и 0,1%, с добавлением и без добавления 0,05% раствора трипсина. Также на первом этапе обработки тканей мы добавили в раствор 0,2% ЭДТА.

Было установлено, что использование трипсина в концентрации 0,05% в течение 3 ч ускоряет процесс удаления клеток из структуры створки аортального клапана, а последующая обработка створок аортального клапана 0,05% раствором детергентов и 0,2% ЭДТА в течение 48 ч (протокол 4, табл. 2) приводит к полной децеллюляризации створки аортального клапана. Однако, при этом отмечалось повреждение матрикса створки аортального клапана — на рисунке 17Б видна более рыхлая структура створки и увеличение промежутков между слоями по сравнению с контролем. При этом использование 0,05% раствора детергентов с 0,2% ЭДТА без предварительной обработки трипсином (протокол 5, таблица 2) не приводило к удалению клеток из структуры створки аортального клапана (рисунок 17В).

Использование детергентов в концентрации 0,075% (протокол 6, таблица 2) в сочетании с 0,2% ЭДТА в ряде случаев приводило к полной децеллюляризации створки аортального клапана, при этом предварительная обработка 0,05% раствором трипсина в течение 3 ч не обязательна (рисунок 17Г).

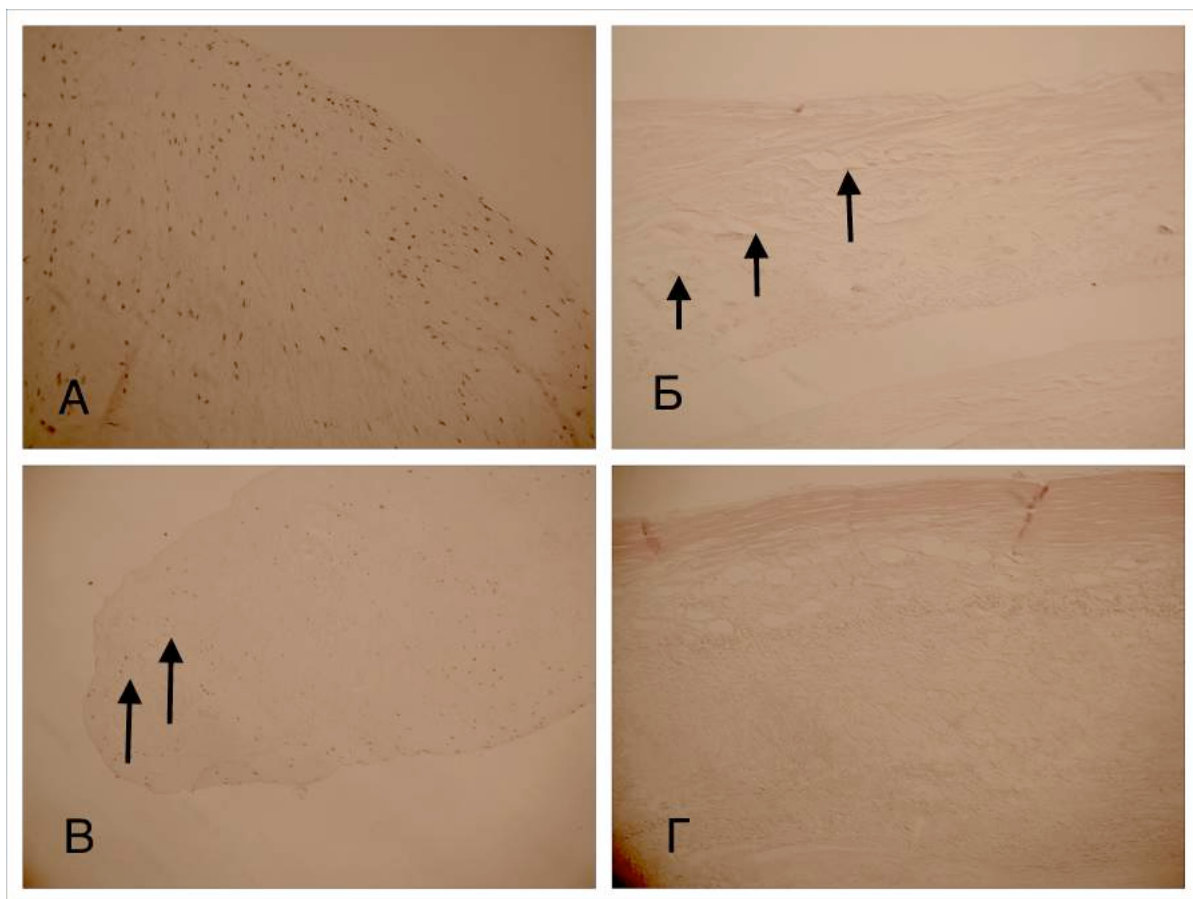


Рисунок 17 - Микрофотография створок аортального клапана после децеллюляризации с помощью различных комбинаций концентрации детергентов и энзимов. Увеличение $\times 10$ - $\times 100$.

Окраска Гематоксилин-эозин. А. Контрольная створка аортального клапана. Б. Створка аортального клапана после децеллюляризации с использованием 0,05% трипсина и 0,05% детергентов. Стрелками указаны зоны разрыва матрикса. В. Створка аортального клапана после децеллюляризации с использованием только 0,05% детергентов. Стрелками показаны неэлиминированные ядра. Г. Створка аортального клапана после децеллюляризации с использованием 0,075% детергентов. Практически полное отсутствие клеток

Использование детергентов в концентрации 0,1% (протокол 7, таблица 2) в сочетании с 0,2% ЭДТА вне зависимости от предварительной обработки створок аортального клапана 0,05% раствором трипсина приводит к полной децеллюляризации створки.

Таблица 2 - Эффекты апробированных протоколов децеллюляризации створки
аортального клапана

Номер протокола	Протокол децеллюляризации (1-й этап)	Эффект	Влияние на структуру матрикса
1	0,05% дезоксихолат натрия	Отсутствует, сохранность 90% ядер клеток	Не влияет
2	0,1% / 0,2% / 0,5% дезоксихолат натрия	Отсутствует, сохранность 80% ядер клеток	Не влияет
3	0,5% дезоксихолат натрия + дистиллированная вода / 0,45% раствор хлорида натрия	Отсутствует, сохранность 80% ядер клеток	Не влияет
4	0,05% трипсин + 0,05% дезоксихолат натрия + 0,05% додецилсульфат натрия + 0,2% ЭДТА	Отчетливый, полное отсутствие ядер клеток	Деструкция - наличие разрывов и пустот
5	0,05% дезоксихолат натрия + 0,05% додецилсульфат натрия + 0,2% ЭДТА	Слабый, сохранность 50% ядер клеток	Не влияет
6	0,075% дезоксихолат натрия + 0,075% додецилсульфат натрия + 0,2% ЭДТА	Непостоянный, в ряде случаев сохранность до 30% ядер клеток	Не влияет
7	0,1% дезоксихолат натрия + 0,1% додецилсульфат натрия + 0,2% ЭДТА	Отчетливый, полное отсутствие ядер клеток	Не влияет

Таким образом, мы сделали вывод о том, что минимально достаточной концентрацией детергентов для достижения эффекта полной децеллюляризации является 0,05% в сочетании с 0,2% ЭДТА и предварительной обработкой 0,05% трипсином (протокол 4, таблица 2), либо необходимо использование 0,1% раствора детергентов и 0,2% ЭДТА без предварительной обработки трипсином (протокол 7, таблица 2; рисунок 18).

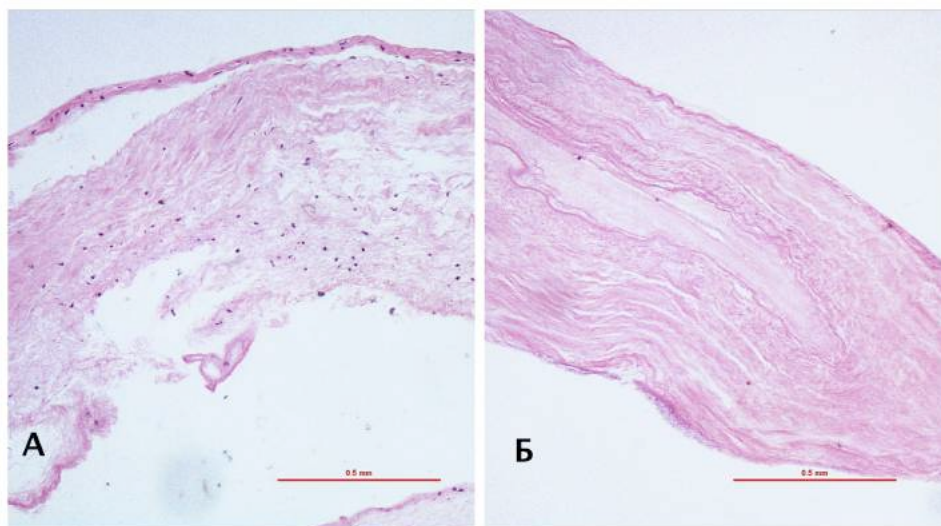


Рисунок 18 - Микрофотография створок аортального клапана после децеллюляризации с использованием 0,1% детергентов. Увеличение 100х. Гематоксилин-эозин. А. Контрольная створка аортального клапана. Б. Створка аортального клапана после децеллюляризации с использованием 0,1% детергентов без трипсина

Учитывая разрушающее влияние трипсина на матрикс, предпочтительным явилось использование комбинации додецилсульфата натрия и дезоксихолата натрия в концентрации 0,1% в течение двух суток с последующей обработкой раствором нуклеаз.

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 (протокол 1, таблица 3). 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.

Приступив к поиску эффективного протокола децеллюляризации восходящей аорты, мы вновь использовали метод увеличения концентраций используемых детергентов. Было показано, что использование 1%, 2% и даже 3% растворов детергентов (протокол 2, таблица 3) не приводит к полной децеллюляризации стенки аорты. При этом отмечалось удаление клеток из интимы и адвентиции, и сохранение их в структуре меди (рисунок 19Б).

Однако предварительное использование 0,5% трипсина с 0,2% ЭДТА в течение 5 ч в комбинации даже с небольшими концентрациями (0,1%) детергентов (протокол 3, таблица 3) способствовало более “глубокой” децеллюляризации, устранению клеток меди. При этом эффект повреждения внеклеточного матрикса, наблюдаемый во время использования трипсина в протоколе децеллюляризации створок аортальных клапанов, отсутствовал. Матрикс аорты, обладая более прочными свойствами, демонстрировал сохранность структуры после трипсинизации (рисунок 19В). Использование 0,25% раствора трипсина также являлось эффективным в случае более длительной экспозиции.

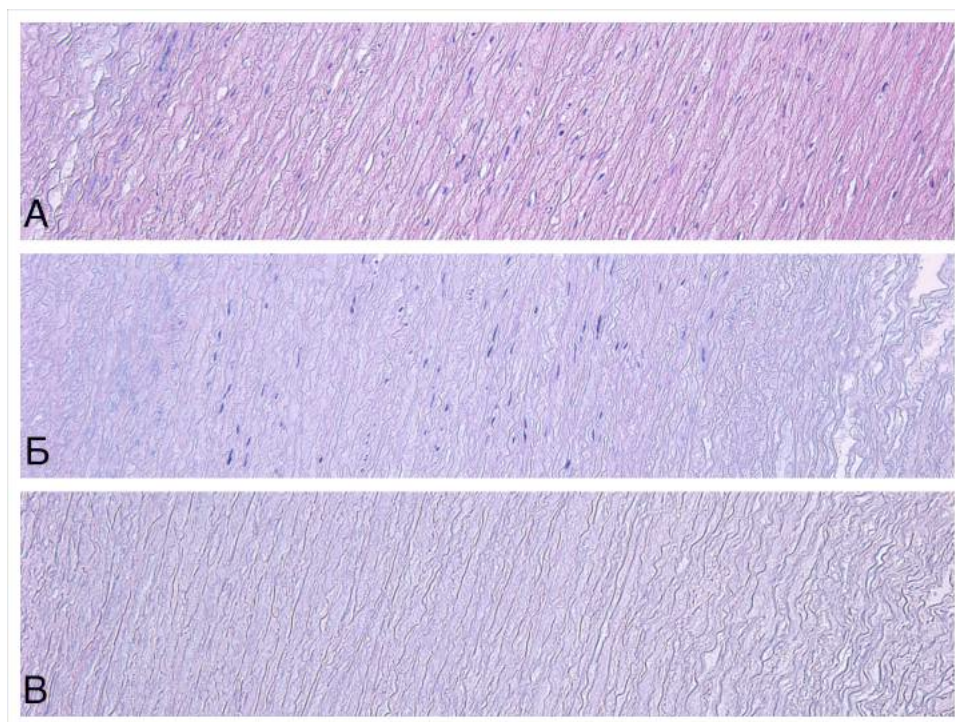


Рисунок 19 - Микрофотография аорты после децеллюляризации с использованием различных комбинаций концентрации детергентов и энзимов. Увеличение x100. Гематоксилин-эозин. А.

Аорта контроль. Б. Аорта после децеллюляризации с использованием 3% детергентов. В медиИ видны ядра клеток. В. Аорта после децеллюляризации с использованием 0,5% трипсина и 0,1% детергентов. Полное отсутствие ядер клеток всех слоев

Таблица 3 - Эффекты апробированных протоколов децеллюляризации восходящей аорты

Номер протокола	Протокол децеллюляризации (1-й этап)	Эффект	Влияние на структуру матрикса
1	0,1% дезоксихолат натрия + 0,1% додецилсульфат натрия + 0,2% ЭДТА	Отсутствует, сохранность ядер всех слоев стенки	Не влияет
2	1% / 2% / 3% дезоксихолат натрия + 1% / 2% / 3% додецилсульфат натрия + 0,2% ЭДТА	Слабый, сохранность ядер клеток медиИ	Не влияет
3	А. 0,5% трипсин + 0,2% ЭДТА Б. 0,1% дезоксихолат натрия + 0,1% додецилсульфат натрия + 0,2% ЭДТА	Отчетливый, полное отсутствие ядер клеток	Не влияет

Таким образом, 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 MgCl₂ + 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 Ca²⁺/Mg²⁺ (время экспозиции в каждой из них – 15 минут при комнатной температуре), затем перемещение в емкость с 50 мл ФСБ Ca²⁺/Mg²⁺ на 24 ч при +4°C в условиях постоянного перемешивания.

Хранение тканей производилось в растворе ФСБ Ca²⁺/Mg²⁺ с добавлением антибиотиков при + 4°C.

3.3 Оценка результатов окраски по Ван Гизону и на эластин

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 (рисунок 20).

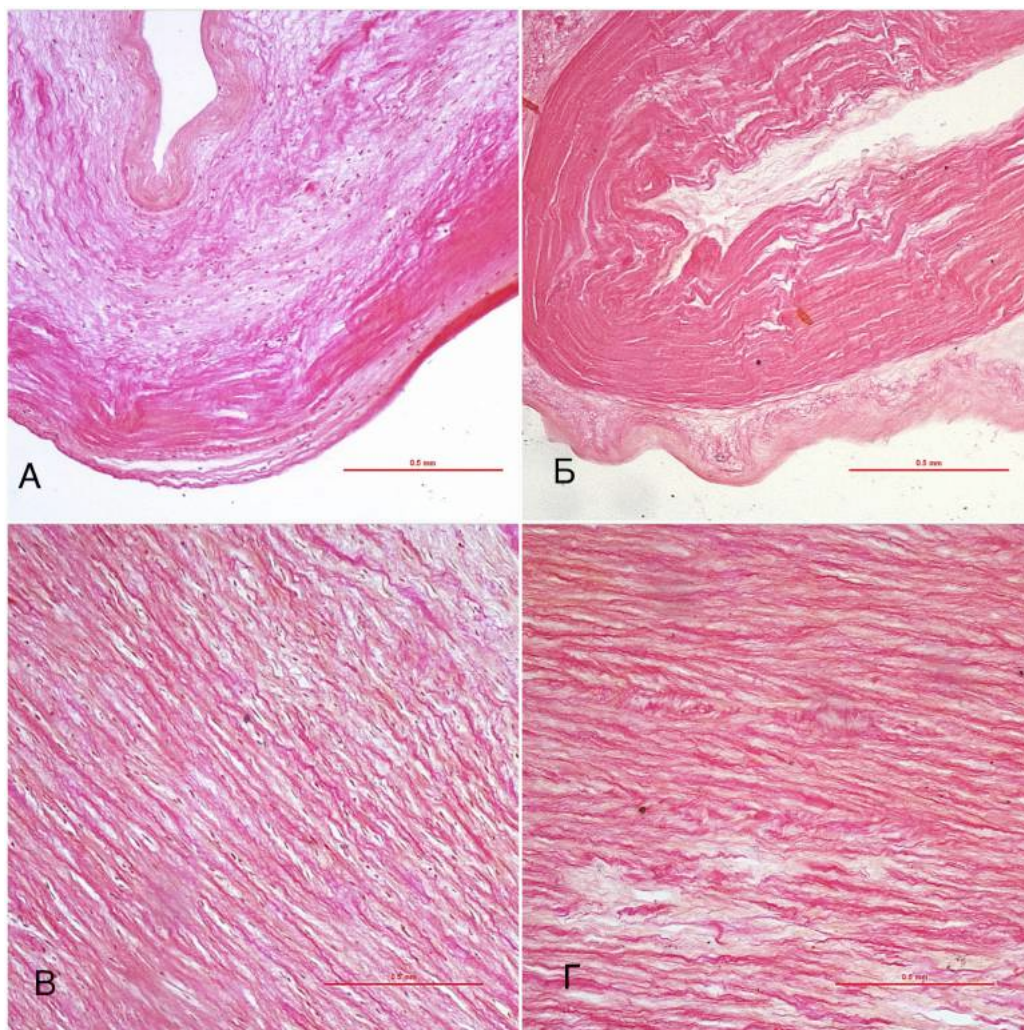


Рисунок 20 - Микрофотография створок аортального клапана и стенки восходящей аорты до после децеллюляризации с использованием 0,1% детергентов. Увеличение 100х. Окраска по Ван Гизону. А. Контрольная створка аортального клапана. Б. Створка аортального клапана после децеллюляризации с использованием 0,1% детергентов без трипсина. В. Нативный участок восходящей аорты (контроль). Г. Стенка восходящей аорты после децеллюляризации с использованием 0,1% детергентов и 0,5% трипсина

3.4 Результаты иммуногистохимического исследования

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 (рисунок 21), что указывает на устранение из структуры тканей гладкомышечных волокон и эндотелиальных клеток.

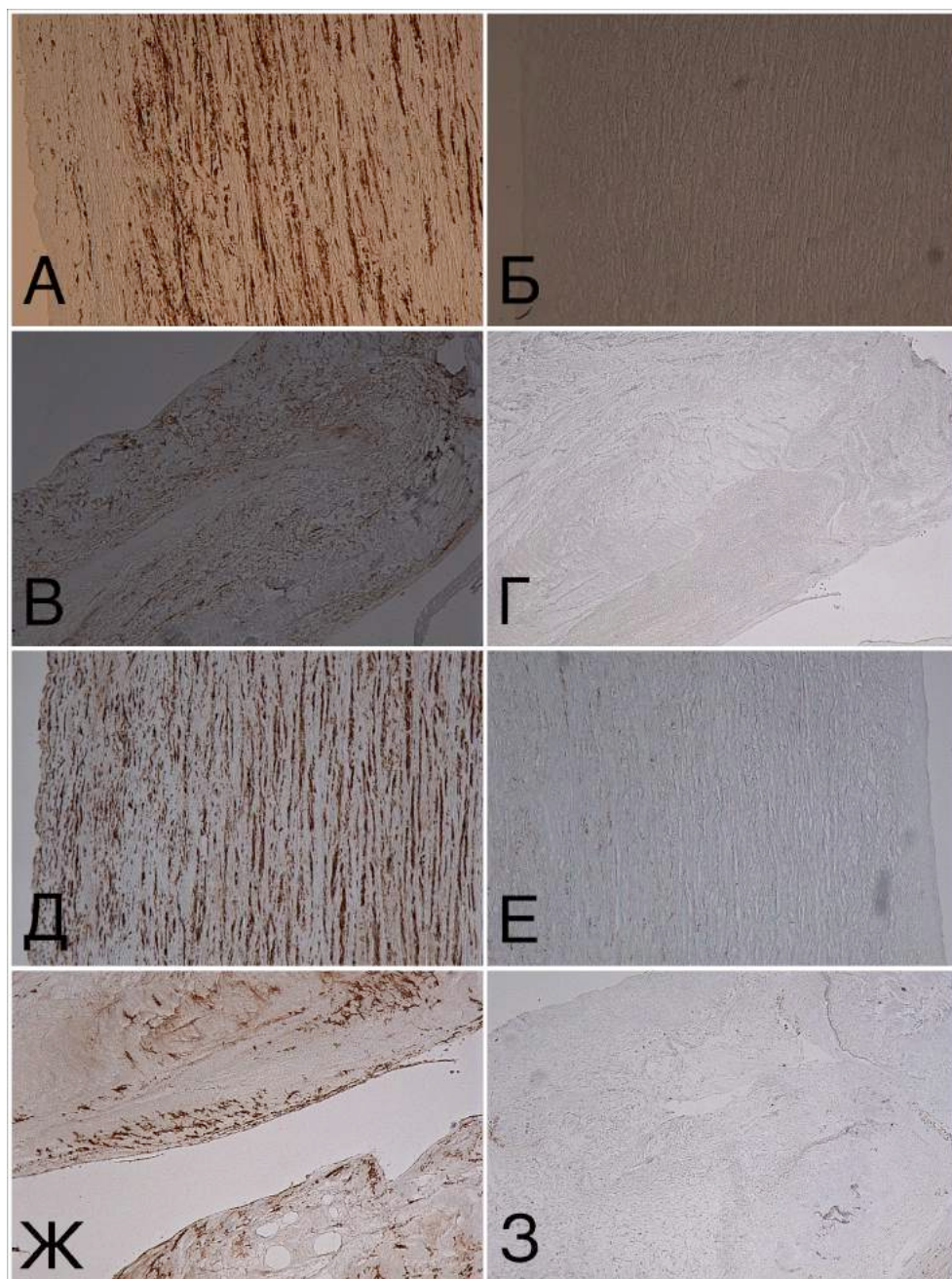


Рисунок 21 - Иммуногистохимия створок аортального клапана и аорты, обработанных по найденному протоколу. Увеличение x100. Окраска на CD34 (А-Г) и альфа-гладкомышечный актин (Д-З). А. Аорта контроль, CD34 Б. Аорта после децеллюляризации, CD34 В. Контрольная створка аортального клапана, CD34 Г. Створка аортального клапана после децеллюляризации, CD34. Д. Аорта контроль, альфа-гладкомышечный актин Е. Аорта после децеллюляризации, альфа-гладкомышечный актин Ж. Створка аортального клапана контроль, альфа-гладкомышечный актин З. Створка аортального клапана после децеллюляризации, альфа-гладкомышечный актин

3.5 Результаты использования красителя DAPI

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 (рисунок 22).

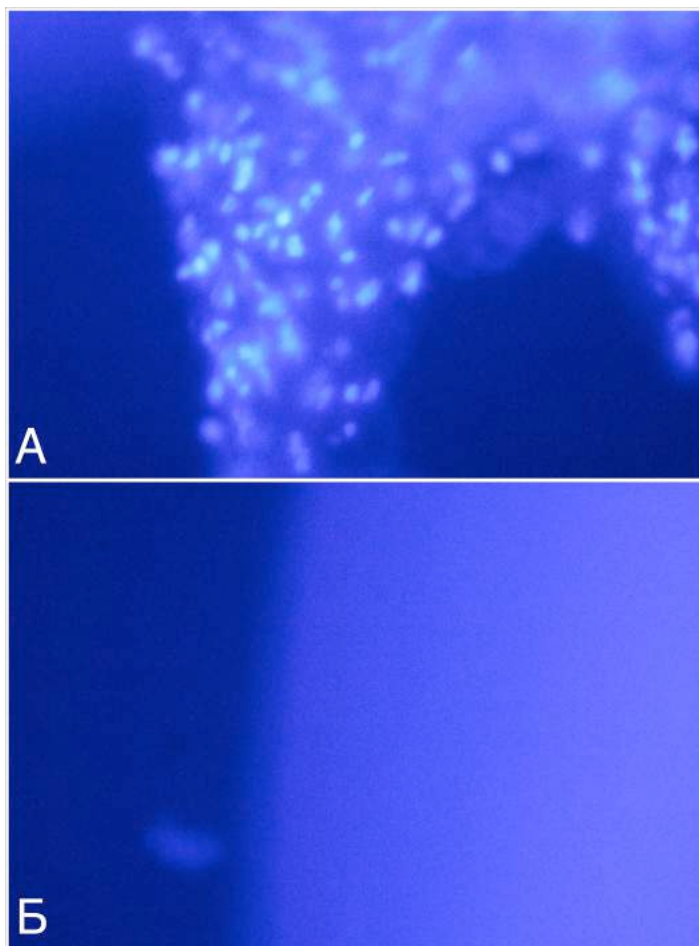


Рисунок 22 - Створка аортального клапана после децеллюляризации. Увеличение 10х. Окраска DAPI. А. Контрольная створка аортального клапана. Отчетливо видны ядра клеток. Б. Створка аортального клапана после децеллюляризации. Полное отсутствие ядер

3.6 Определение остаточных ДНК и РНК в тканях

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.

3.7 Биомеханические тесты

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 ($p=0,16$) (рисунок 23).

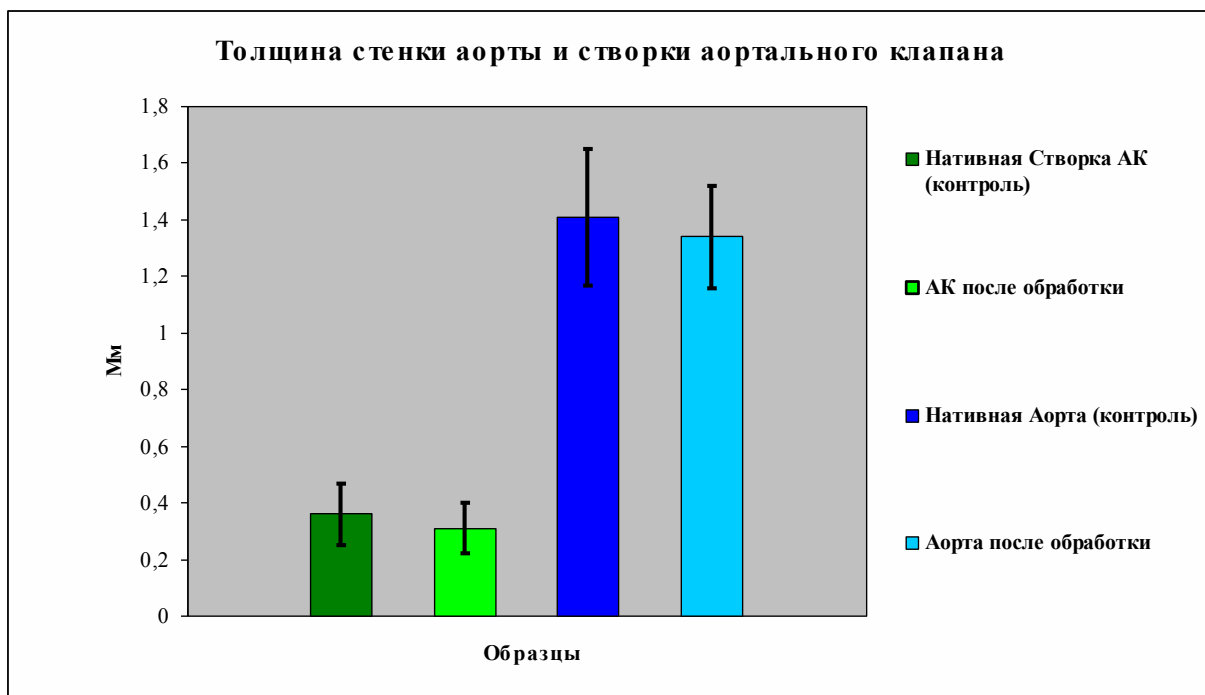


Рисунок 23 - Толщина стенки аорты и створки аортального клапана до и после децеллюляризации

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.

Графики зависимости средних величин напряжения растяжения от деформации растяжения при исследовании створок аортального клапана в продольном и поперечном направлениях представлены на рисунке 24.

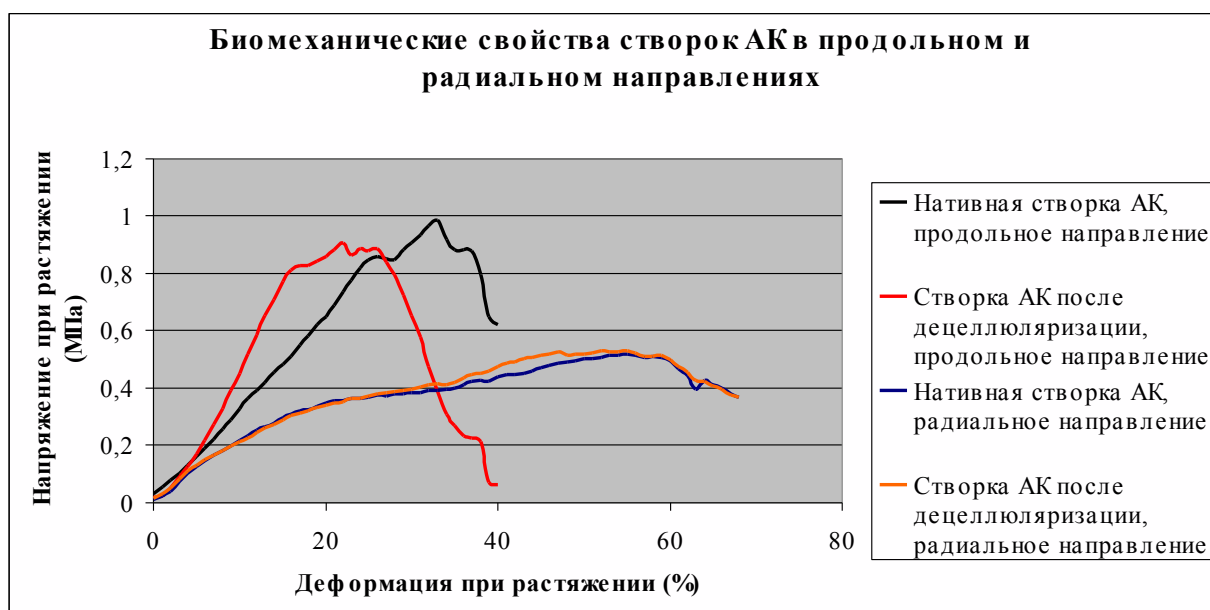


Рисунок 24 - Графики зависимости средних величин напряжения растяжения от деформации растяжения при исследовании створок аортального клапана в продольном и поперечном направлениях

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 ($p>0,05$). Графики зависимости показателей биомеханических свойств аорты представлены на рисунке 25.

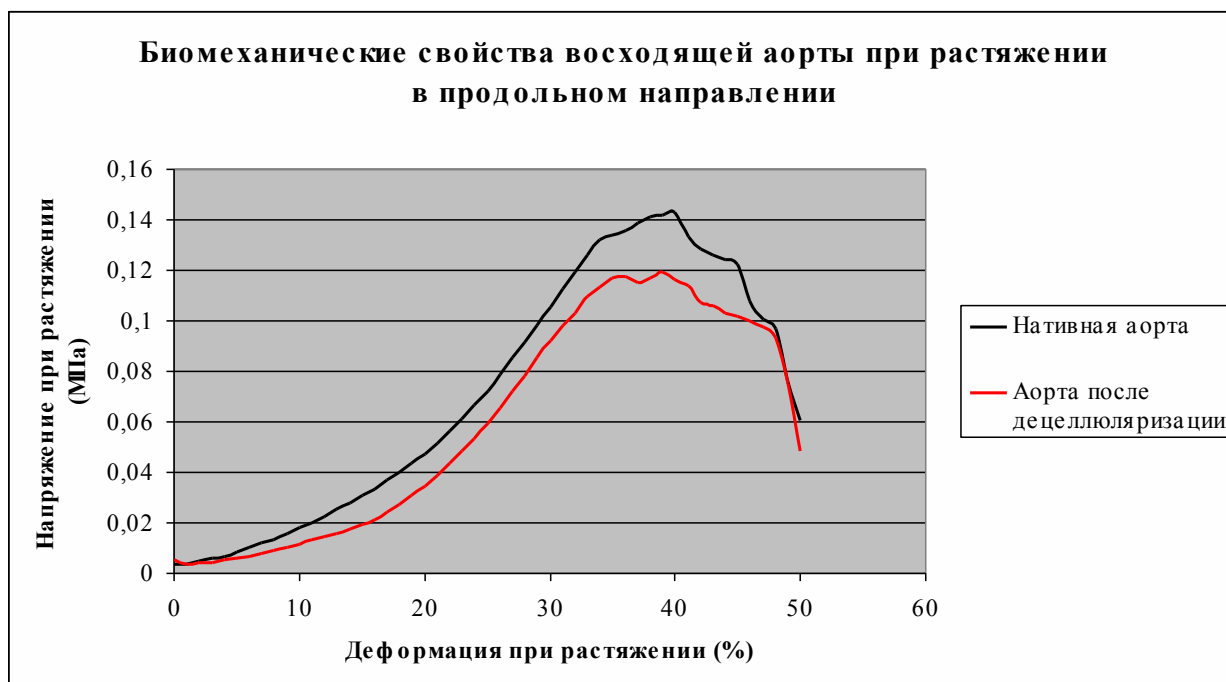


Рисунок 25 - Зависимость средних величин напряжения растяжения от деформации растяжения при исследовании стенки восходящей аорты в продольном направлении

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 (рисунок 26).



Рисунок 26 - Зависимость средних величин напряжения растяжения от деформации растяжения при исследовании стенки восходящей аорты на устойчивость к прорезыванию швом

3.8 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 рецеллюляризации створок аортального клапана в статичных условиях нельзя назвать полностью удовлетворяющими цели получить заселенную стволовыми клетками створку аортального клапана после децеллюляризации. Образцы, заселенные клетками в количестве 200-800 тыс. на створку, за время инкубации (5-15) дней не продемонстрировали значимого роста клеток на своей поверхности. В структуре этих створок отмечалось наличие единичных клеток по сравнению с контролем (децеллюляризованная створка АК) (рисунок 27).

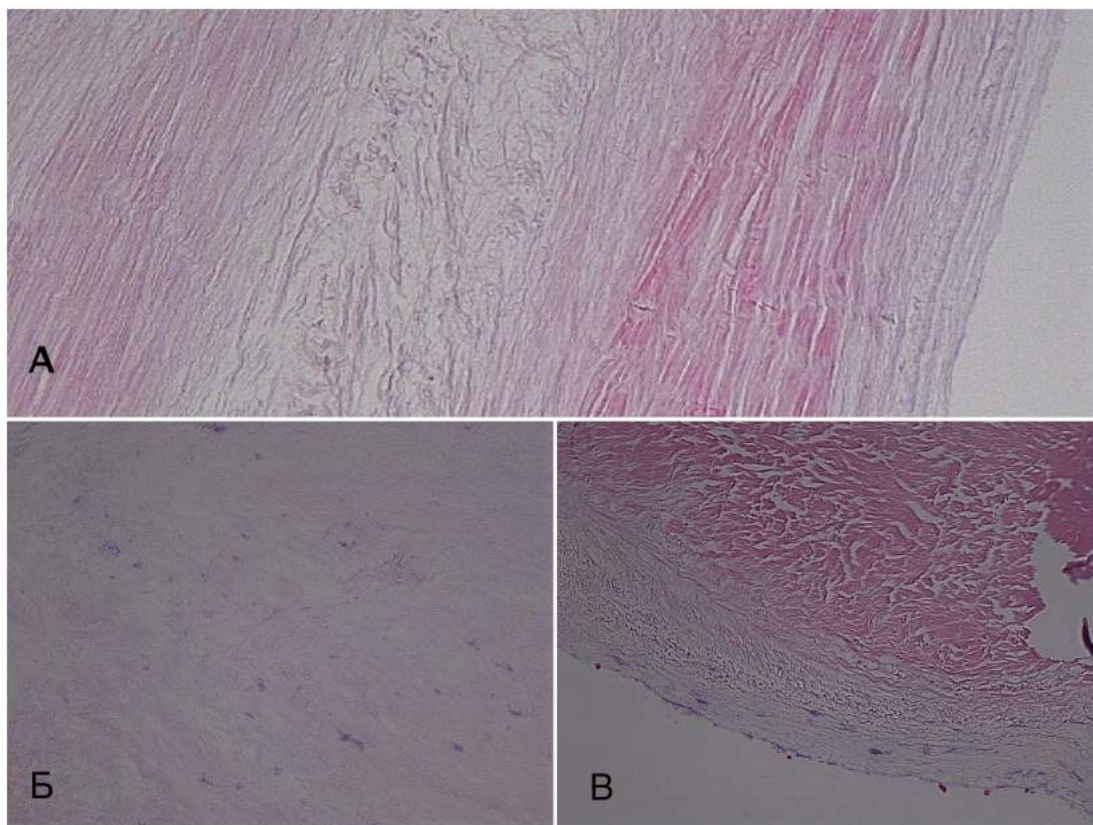


Рисунок 27 - Микрофотография створок аортального клапана до и после заселения мезенхимальными стволовыми клетками. Увеличение 40х – 100х. Окраска гематоксилин-эозин. А. Контрольная створка аортального клапана (после децеллюляризации), полностью лишенная всех клеточных элементов. Б. Створка аортального клапана после рецеллюляризации мезенхимальными стволовыми клетками в количестве 400 тыс. В. Створка аортального клапана после рецеллюляризации стволовыми клетками в количестве 800 тыс. На рисунках Б и В видны единичные включения ядер стволовых клеток

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 рецеллюляризации. 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.

Не было отмечено различий и при использовании мультипотентных стволовых клеток разного происхождения. При проведении этого этапа эксперимента отмечалось лишь, что

клетки, полученные из жировой ткани, обладают несколько более высокой скоростью роста колоний, по сравнению с таковыми из красного костного мозга. Это позволяло получить необходимое количество клеток за более короткий промежуток времени. Однако при использовании жировых МСК для децеллюляризации в статичных условиях убедительных различий в их поведении и росте отмечено не было.

3.9 Децеллюляризация гомографта с использованием биореактора

Применение биореактора для децеллюляризации цельного корня аорты является частью полного цикла обработки тканей, при котором гомографт планируется подготовить для дальнейших преклинических и клинических исследований, а в перспективе — и для практического применения. 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 (рисунок 28).

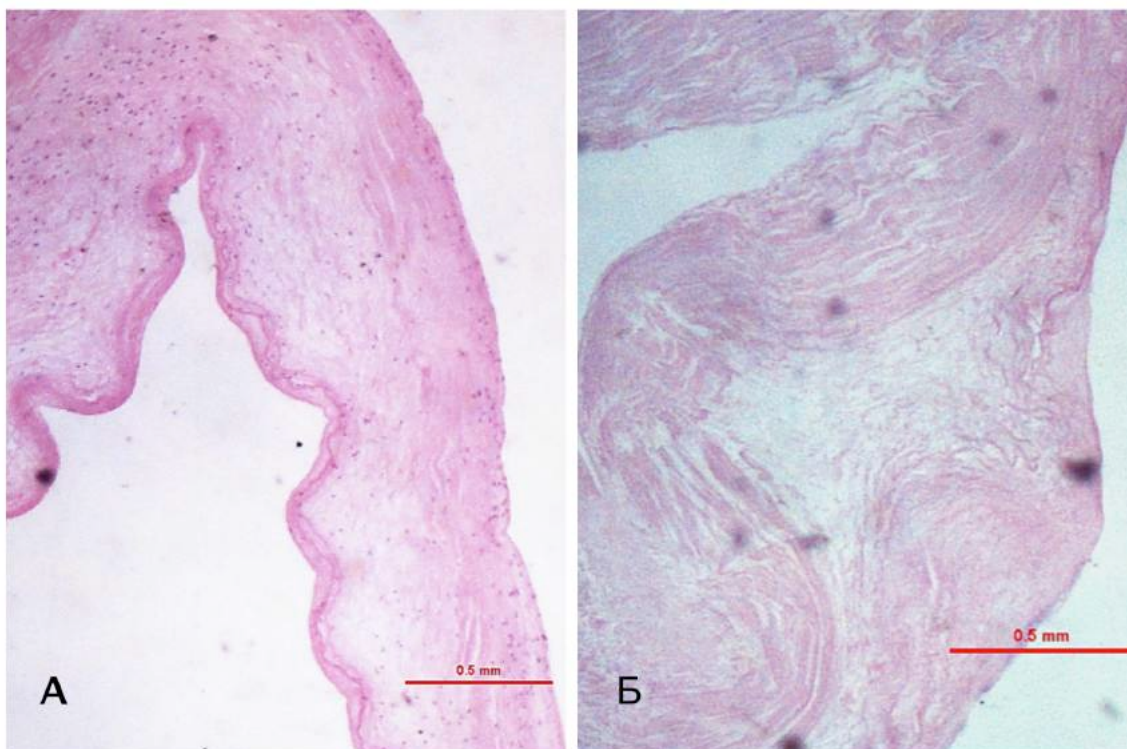


Рисунок 28 - Микрофотография створки аортального клапана при децеллюляризации с биореакторе с использованием 0,075% растворов детергентов. Увеличение 40х. Окраска гематоксилин-эозин. А. Нативная створка аортального клапана (контроль). Б. Створка аортального клапана после децеллюляризации в биореакторе

Дальнейшие спектрофотометрические исследования показали полное отсутствие нуклеиновых кислот, или наличие их остатков в количестве менее 5% по сравнению с нативными тканями. Исследование биомеханических свойств створок клапана, децеллюляризованных в биореакторе, не проводилось. Однако учитывая тот факт, что нами применялась более низкая концентрация реагентов, можно с уверенностью предполагать, что децеллюляризация в биореакторе также не влияет на биомеханические свойства створок аортального клапана.

При гистологическом исследовании стенки аорты гомографта после децеллюляризации в биореакторе выявлены те же изменения, что и при обработке участков восходящей аорты отдельно от створок. Так как мы не использовали ферменты при динамической децеллюляризации, опасаясь повреждения створок, устранение клеток из структуры стенки аорты оказалось неполным. Аналогично с описанными выше результатами, динамическая децеллюляризация в биореакторе приводила к устранению клеток из интимы и адвентиции, лишь небольшое количество ядер клеток меди аорты оставалось интактными.

3.10 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 500 тыс. клеток на створку с использованием биореактора, выявлено формирование монослоя клеток, покрывающих поверхность створки. (рисунок 29) Формирование монослоя отмечалось на всех створках клапана и во всех успешных случаях применения биореактора.

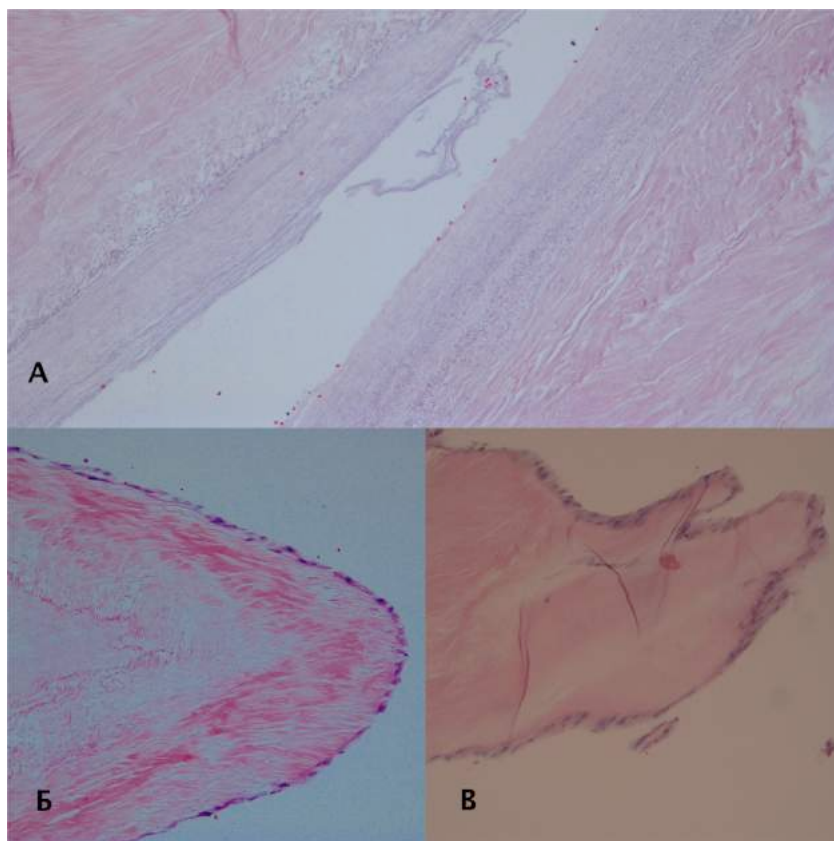


Рисунок 29 - Микрофотография створок аортального клапана до и после заселения стволовыми клетками красного костного мозга с использованием биореактора. Увеличение 40х-100х. Окраска гематоксилин-эозин. А. Контрольная створка аортального клапана (после децеллюляризации), полностью лишенная всех клеточных элементов. Б и В. Створка аортального клапана после рецеллюляризации мезенхимальными стволовыми клетками в биореакторе. Видны ядра стволовых клеток, покрывающих створку в виде монослоя

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 биореаторе. При этом образование конфлюэнтного монослоя клеток на поверхности децеллюляризованной створки аортального клапана можно считать успешным результатом проведенного эксперимента.

4 ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Децеллюляризация – надежный способ получения экстрацеллюлярной матрицы створки аортального клапана

Децеллюляризация органов и тканей получила широкое развитие благодаря тому, что этот метод тканевой инженерии позволяет надежно и полностью элиминировать все клеточные элементы и их остатки из состава тканей. Не смотря на то, что существует альтернативный метод получения трехмерной структуры матрицы – из биodeградируемых материалов, будущее тканевой инженерии клапанов сердца на настоящем витке развития в большей степени ассоциируется именно с децеллюляризацией. Это объясняется тем, что материалы, используемые в биосинтезе матриц, не обладают достаточными прочностными характеристиками и не способны выдерживать большие гемодинамические нагрузки, в которых оказывается тканеинженерный протез после имплантации (Rippel R.E. et al., 2012; Hasan A. et al., 2013). Децеллюляризованные же ткани полностью сохраняют естественную структуру ткани и ее механическую прочность, что делает их подходящим субстратом для дальнейшего заселения стволовыми клетками (Ueda Y. et al., 2006; Korossis S.A. et al., 2004).

Нами разработаны оригинальные способы децеллюляризации как створок аортального клапана, так и восходящей аорты. Комбинация детергентов и ферментов, использованных для децеллюляризации, не является новой (Numata S. et al., 2004; Cebotari S. et al., 2002; Allaire E. et al., 1994; Caamano S. et al., 2009; Rieder E. et al., 2004; Meyer S.R. et al., 2006; Erdbrugger W. et al., 2006; Fang N.T. et al., 2007; Rieder E. et al., 2005; Schenke-Layland K. et al., 2003), 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.

Первый этап, заключающийся в обработке тканей растворами детергентов, направлен на разрушение мембран клеток, входящих в состав створок аортального клапана и участков восходящей аорты. Додецилсульфат натрия и дезоксихолат натрия, являясь сильными поверхностно-активными веществами, солюбилизируют белки и липиды клеточных мембран, тем самым приводя к их разрушению. Это облегчает последующее удаление компонентов клеток и клеточного дебриса из ткани. В литературе описано применение различных концентраций детергентов, используемых для децеллюляризации тканей – от 0,05% до 5%. Однако мы отдавали предпочтение использованию минимально эффективных концентраций

для снижения влияния детергентов на структуру матрицы и жизнеспособность стволовых клеток, засеваемых на нее на дальнейших этапах. В статичных условиях децеллюляризации створок аортального клапана оптимальным является использование 0,1% раствора детергентов, так как по полученным в наших экспериментах данным эта концентрация является минимально необходимой для разрушения всех клеток и компонентов створки аортального клапана.

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.

Для увеличения эффекта применяемых веществ на первом и втором этапах нами был добавлен раствор ЭДТА в небольшой концентрации. Этот альдегид, широко используемый в биохимии и медицине, связывает ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , участвующие в образовании межклеточных контактов и в механизмах адгезии клеток на внеклеточном матриксе. Кроме того, ЭДТА неселективно ингибирует матриксные металлопротеиназы, способствуя увеличению сохранности экстрацеллюлярного матрикса и препятствуя его саморазрушению.

Второй этап, являющийся стандартным для многих протоколов децеллюляризации, описанных в литературе, заключается в разрушении ДНК и РНК и их фрагментов. Для оценки качества и глубины децеллюляризации важно проведение тестов на наличие остатков молекул нуклеиновых кислот. Их устранение препятствует возможной передаче вирусных инфекций (в том числе вызываемых ДНК- и РНК-вирусами). Спектрофотометрические исследования вместе с высокотропной к нуклеиновым кислотам окраской DAPI с высокой точностью позволяют оценить полноту устранения ДНК и РНК из матрикса конструируемого тканеинженерного протеза.

Третий этап, заключающийся в отмывании реагентов и остатков клеточных структур, имеет важное значение для дальнейшего использования полученной матрицы как субстрата для заселения стволовыми клетками. Плохо отмывтый от реагентов графт будет обладать цитотоксичностью и будет демонстрировать отсутствие роста клеток на своей поверхности. Остатки клеточных элементов, не удаленные из трехмерной матрицы, механически препятствуют проникновению стволовых клеток вглубь ее структуры, а также способствуют развитию иммунных реакций, способствующих развитию процессов биodeградации и снижающих потенциальный срок службы протеза. На начальных этапах работы, когда мы осуществляли поиск оптимального протокола обработки тканей, мы использовали три

коротких эпизода отмывания в ФСБ. В дальнейшем этому этапу придавалось большее значение, и срок отмывания был увеличен до 3 суток. Именно этот вариант протокола и рекомендуется для дальнейшего использования.

4.2 Поиск оптимального протокола децеллюляризации

Многочисленные работы, посвященные проблеме децеллюляризации клапанов сердца, свидетельствуют о том, что единого «рецепта» для получения экстрацеллюлярного матрикса с оптимальными свойствами не существует. Очевидно, что минимизация воздействий на донорские ткани позволяет максимально сохранить их качества и приблизить гомографт по своим морфологическим, биомеханическим и гемодинамическим свойствам к нативному клапану. В числе подобных работ существуют и те, успехи которых позволили исследователям дойти до клинических испытаний и опробовать свой продукт в реальных операциях. Так, D. Gabbieri et al. публикуют не только результаты успешного применения полученных в результате децеллюляризации гомографтов в операциях Росса у детей (Gabbieri D. et al., 2007), но и удовлетворительные показатели работы этих клапанов спустя 10 лет после имплантации (Dohmen P.M. et al., 2011). Da Costa и соавторы сообщают об 11 успешно выполненных операциях Росса с использованием децеллюляризованных аллографтов, изготовленных по авторизированной технологии AutoTissue (da Costa F.D. et al., 2005). При этом техника децеллюляризации использует всего один детергент – дезоксихолат натрия (Dohmen P.M., Konertz W., 2008).

Нам не удалось достичь желаемого результата с использованием одного конкретного детергента. Апробация различных протоколов децеллюляризации створок клапана аорты показала необходимость использования комбинации дезоксихолата натрия и додецилсульфата натрия в концентрации 0,1% для полного устранения клеток и клеточного дебриса из структуры створки аортального клапана человека. Использование этих компонентов по отдельности даже в больших концентрациях и при большей экспозиции не приводят к желаемому результату.

4.3 Поиск универсального протокола децеллюляризации

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.

На более поздних этапах исследования при работе с цельным корнем аорты мы использовали биореактор. Динамические условия помогли снизить концентрацию используемых детергентов для эффективной и полной децеллюляризации створок аортального клапана. Как упоминалось выше, при этом в структуре стенки аорты сохранялись ядра клеток меди, клетки интимы и адвентиции отсутствовали. Однако мы сочли отсутствие эффекта полного устранения клеток из структур аорты достаточным и приемлемым для дальнейших испытаний.

При последующей имплантации разрабатываемого кондуита *in vivo* первостепенное значение имеет атромбогенность поверхности имплантируемой ткани (Kasimir M.T., 2005). Так как с помощью предложенного протокола можно эффективно устранить клетки интимы, то предполагается возможное заселение пространства интимы аорты либо стволовыми клетками *in vitro*, либо эндогенными клетками реципиента *in vivo*. Кроме того, использование биореактора позволяет эффективно отмыть гомографт от детергентов, которые являются токсичными для стволовых клеток и препятствуют успешным результатам рецеллюляризации. Это подтвердили результаты роста стволовых клеток на поверхности обработанного по найденному протоколу в биореакторе гомографта. Возможность роста стволовых клеток на поверхности тканеинженерного корня аорты и их предполагаемая дальнейшая дифференцировка в эндотелий под биофизическим воздействием непрерывного потока питательной среды биореактора снижает тромбогенные свойства децеллюляризованной интимы аорты и может быть использована для экспериментов *in vivo*. Исходя из этого можно предполагать, что оптимизированный нами протокол может быть успешно применен в дальнейших исследованиях, и в перспективе — в клинической практике.

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.

4.4 Применение найденного протокола децеллюляризации не влияет на биомеханические свойства структур корня аорты

Сохранение приемлемых механических свойств разрабатываемых протезов клапанов является краеугольным камнем тканевой инженерии клапанов сердца. Сравнимость биомеханических свойств тканеинженерного клапана сердца с таковыми у нативного клапана является необходимым условием для успешного дизайна и создания имплантируемого полностью функционального протеза клапана сердца с длительным сроком службы. Из-за ограниченной доступности донорского человеческого материала для исследований в литературе имеется лишь небольшое число работ, посвященных исследованиям биомеханики структур корня аорты человека (Stradins P. et al., 2004; Balguid A. et al., 2001). Среди работ, выполненных на территории Российской Федерации, подобных исследований до сих пор не проводилось. Поэтому разработка собственных научных экспериментов в этой области с возможностью дальнейшего внедрения их в клиническую практику является актуальной задачей (Ахмедов Ш.Д. и соавт., 2009).

Использованные биаксиальные методы оценки прочности биологических тканей на растяжение являются стандартными, в том числе и в экспериментах с корнем аорты (Mettuman 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. Исследование биомеханических свойств створок клапана, децеллюляризованных в биореакторе, не проводилось, однако учитывая тот факт, что нами применялась более низкая концентрация реагентов, можно с уверенностью предполагать, что децеллюляризация в

биоректоре также не влияет на биомеханические свойства створок аортального клапана.

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.

Найденные статистически значимые различия при тестировании на прорезывание шва аорты могут объясняться тем, что при прошивании края фрагмента аорты можно легко травмировать «нежную» ткань, обработанную детергентами. Тем не менее, в случае дальнейшего использования в экспериментах *in vivo* обработанного по нашей методике тканеинженерного гомографта, справедливы рекомендации по максимально аккуратному формированию дистального анастомоза, протягиванию нити и использованию прокладок из тефлона или биологических материалов (ксеноперикард, аутоперикард).

4.5 Необходимость репопуляции тканеинженерного гомографта стволовыми клетками

Имплантация децеллюляризованных алло- и ксенографтов индуцирует *in vivo* репопуляцию интерстициальными клетками, и как следствие – регенерацию матрикса. Однако некоторые исследования демонстрируют недостаточную репопуляцию децеллюляризованного графта эндотелиальными клетками (Elkins R.C. et al., 2001; Kasimir M.T. et al., 2003). Отсутствие конфлюэнтного эндотелиального слоя децеллюляризованных клапанов является predisposing фактором к образованию на незащищенной поверхности экстрацеллюлярного матрикса тромбов и гиперплазии интимы, что приводит к последующему тромбозу графта (Cebotari S. et al., 2002; Allaire E. et al., 1999). Несмотря на то, что в литературе имеются сообщения о клиническом применении децеллюляризованных графтов, их результаты остаются противоречивыми (Simon P. et al., 2003). Поэтому концепция предоперационного заселения графта клетками с целью ускорения и облегчения ремоделирования, а также снижения риска тромбообразования на его поверхности, до сих пор остается актуальной.

Немаловажным условием для репопуляции тканеинженерного гомографта клетками является соблюдение физиологических условий для их роста. Нами были проведены попытки статичного заселения децеллюляризованных створок аортального клапана. Однако результаты этого эксперимента нельзя назвать полностью успешными. Не повлияла на степень рецеллюляризации и попытка применения центро бежной силы (центрифугирования) сразу

после заселения гомографта клетками. Мы предполагали, что центробежная сила позволит облегчить проникновение клеток вглубь матрикса створки и повысит степень адгезии клеток к поверхности створки, однако никакого значимого влияния это воздействие не оказало. Следовательно, определяющую роль в успехе рецеллюляризации матрикса корня аорты играет создание динамических условий, близких к физиологическим. Применение потока пульсирующей жидкости играет важную роль для роста, ориентации клеток и модификации клеточного фенотипа. Поэтому следующим шагом в нашей работе стала разработка биореактора, позволяющего обеспечить подобные условия.

4.6 Применение биореактора улучшает результаты рецеллюляризации

Разработанный нами биореактор является устройством крайне незамысловатой структуры. Основные отличия его от аналогов (Weston M.W. et al., 2001; Mol A. et al., 2005; Lichtenberg A. et al., 2006; Karim N. et al., 2006; Dumont K. et al., 2002; Hildebrand D.K. et al., 2004; Syedain Z.H. et al., 2009; Webb AR et al., 2007; Berry J.L. et al., 2010; Mertsching H. et al., 2009) состоят в компактности, легкости в изготовлении и воспроизведении, наружном расположении насоса и простоты создания пульсирующего потока жидкости в контуре. Он способен обеспечить такие важные для роста и развития клеток условия, как непрерывное обновление питательной среды и кислорода, отток продуктов метаболизма, необходимую температуру и концентрацию газов, пульсирующий поток для правильной клеточной ориентации. Тщательное мониторингирование и динамическая корректировка этих параметров позволяет улучшить показатели роста клеточной культуры на поверхности тканеинженерного клапана. Следует отметить, что образование конфлюэнтного слоя клеток на поверхности клапана в условиях высокоскоростного потока, близких к физиологическим гемодинамическим параметрам циркуляции, также является непростой задачей. При заселении клетками, резкий переход от условий статического заселения к высоким скоростям потока в системе биореактора может привести к плохим результатам рецеллюляризации (Dunkern T.R. et al., 1999). Например, высокоскоростной поток в системе биореактора-пульсдубликатора может являться причиной смыва клеток с поверхности матрикса, особенно в зонах повышенной турбулентности потока, коими являются синусы Вальсальвы и створки аортального клапана (Lichtenberg A. et al., 2006). Поэтому немаловажным фактором, препятствующим смыву клеток и повреждению поверхностного слоя, является обеспечение медленной адаптации заселенного гомографта путем пошагового, плавного повышения скорости потока в системе биореактора.

Применение биореактора 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.

Соблюдение принципов асептики, а также использование антибактериальных и фунгицидных веществ для предотвращения бактериальной и грибковой контаминации и сохранения стерильности тканей является существенным требованием на всех этапах работы с гомографтом. Самой частой причиной вывода образцов из исследования на всех этапах нашей работы явилась бактериальная контаминация. Наряду с этим важно помнить о цитотоксическом эффекте антибиотиков, поэтому не следует злоупотреблять их чрезмерными комбинациями и увеличением концентрации. Мы пришли к выводу о том, что также необходимо тщательно отмывать антисептики, используемые для стерилизации контура биореактора и других его компонентов, перед началом цикла рецеллюляризации.

4.7 Перспективы исследования

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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор работы искренне благодарит руководителей за идею, помощь при организации и проведении экспериментов, терпение и мудрые советы при ее написании, заведующего Всеволожским патологоанатомическим отделением ГКУЗ ЛОПАБ Семенова Александра Валерьевича и его супругу Татьяну за помощь в осуществлении забора биологического материала и его гистологической обработке, д.м.н., зав. НИЛ Патоморфологии ФМИЦ им. В.А. Алмазова Митрофанову Любовь Борисовну за помощь в изготовлении гистологической окраске препаратов, м.н.с. группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФМИЦ им. В.А. Алмазова Пузанова Максима Викторовича, а также лаборанта Вишневскую Марину Юрьевну за помощь в работе со стволовыми клетками, сотрудников НИЛ молекулярно-клеточных механизмов атеросклероза Института молекулярной биологии и генетики ФМИЦ им. В.А. Алмазова Киселева Артема Михайловича и Злотину Анну Михайловну за помощь в осознании глубоких и сложных механизмов молекулярной биологии, к.т.н. зам. зав. кафедры прикладной механики и инженерной графики СПбГЭТУ (ЛЭТИ) Лебедеву Елену Александровну за помощь в организации и проведении биомеханических тестов, всю семью Лоскутовых, особенно Лоскутова Никиту Альбертовича за идейное вдохновение и помощь в организации гидродинамических экспериментов и Лоскутову Анастасию Никитичну за терпение и поддержку, а также коллегу Насрединова Артема Сергеевича за поддержку при написании работы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК – аортальный клапан

Ао - аорта

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКаза – фермент, разрушающий ДНК

ДЦ - децеллюляризация

ЖМСК – мультипотентные стволовые клетки жировой ткани

ИГХ - иммуногистохимия

МСК – мультипотентные стволовые клетки

МСК ККМ – мультипотентные стволовые клетки красного костного мозга

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКаза – фермент, разрушающий РНК

ФГБУ ФМИЦ – федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный Медицинский Исследовательский Центр

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

ЭДТА (EDTA) – этилендиаминтетрауксусный альдегид

SDC – дезоксихолат натрия

SDS – додецилсульфат натрия

ЛИТЕРАТУРА

1. Акатов, В.С. Изучение биосовместимости трансплантатов клапанов сердца, девитализированных антикальцинозным способом / В.С. Акатов, Р.М. Муратов, И.С. Фатеева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2010. - Т. 5. - № 2. - С. 36-41.
2. Анисимов, С.В. Ксеногенные риски в применении стволовых клеток / С.В. Анисимов // Цитология. - 2012. - Т. 54. - № 4. - С. 289-97.
3. Анисимов, С.В. Стволовые клетки менструальной крови как потенциальный субстрат клеточной терапии / С.В. Анисимов, В.И. Земелько, Т.М. Гринчук, Н.Н. Никольский // Цитология. - 2013. - Т. 55. - №1. - С. 5-10.
4. Ахмедов, Ш.Д. Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии / Ш.Д. Ахмедов, С.А. Афанасьев, М.П. Дьякова, Т.Х. Фатхутдинов, Л.В. Кактурский // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2009. - Т. 4. - № 2. - С. 32-9.
5. Бобылев, Д.О. Тканевая инженерия клапанов сердца: новые возможности и перспективы / Д.О. Бобылев, С. Чеботарь, И. Тудораке, А. Хаверих // Кардиология. - 2011. - Т. 51. - № 12. - С. 50-6.
6. Бокерия, Л.А. Клеточные и интерактивные технологии в лечении врожденных и приобретенных пороков сердца и ишемической болезни сердца / Л.А. Бокерия, Г.П. Георгиев, Е.З. Голухова // Вестник РАМН. - Т. 9. - С. 48-55.
7. Попандопуло, А.Г. Бесклеточный экстрацеллюлярный матрикс как основа тканеинженерного трансплантата сердечного клапана / А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова // Клеточная и органная трансплантология. - 2013. - Т. 1. - № 1. - С. 48-51.
8. Шахпазян, Н.К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н.К. Шахпазян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева // Гены и клетки. - 2012. - Т. 7. - № 1. - С. 23-33.
9. Adham, M. Mechanical characteristics of fresh and frozen human descending thoracic aorta / M. Adham, J.P. Gournier, J.P. Favre, E. De La Ro, C. Ducerf, J.J. Baulieux // Surg Res. - 1996. - V. 64. - P. 32-4.
10. Aikawa, E. Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering / E. Aikawa, P. Whittaker, M. Farber, K. Mendelson, R.F. Padera, C. Aikawa // Circulation. - 2006. - V. 113. - P. 344-52.

11. Allaire, E. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats / E. Allaire, C. Guettier, P. Bruneval, D. Plissonnier, J.B. Michel // *J Vasc Surg.* - 1994. - V. 19. - P. 446-56.
12. Alsberg, E. Environmental cues to guide stem cell fate decision for tissue engineering applications / E. Alsberg, H.A. von Recum, M.J. Mahoney // *Expert Opin Biol Ther*/ - 2006.- V. 6. - P. 847-66.
13. Anderson, R.H. The surgical anatomy of the aortic root / R.H. Anderson // *Multimed Man Cardiothorac Surg.* - 2007. - V. 52. - P. 25-27.
14. Anisimov, S.V. Risks and mechanisms of oncological disease following stem cell transplantation / S.V. Anisimov, A. Morizane, A.S. Correia // *Stem Cell Rev.* - 2010. - V. 6. - P. 411-14.
15. Anssari-Benam, A. A combined experimental and modelling approach to aortic valve viscoelasticity in tensile deformation / A. Anssari-Benam, D.L. Bader, H.R. Screen // *J Mater Sci Mater Med.* - 2011. - V. 22. - P. 253-62.
16. Apte, S.S. Current developments in the tissue engineering of autologous heart valves: moving towards clinical use / S.S. Apte, A. Paul, S. Prakash, D. Shum-Tim // *Future Cardiol.* - 2011. - V. 7. - P. 77-97.
17. Asahara, T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Ze, T. Li // *Science.* - 1997. - V. 275. - P. 964-7.
18. Auger, F.A. The pivotal role of vascularization in tissue engineering / F.A. Auger, L. Gibot, D. Lacroix // *Annu Rev Biomed Eng.* - 2013. - V. 15. - P. 177-200.
19. Bader, A. Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix / A. Bader, G. Steinhoff, K. Strobl, T. Schilling, G. Brandes, H. Mertsching // *Transplantation.* - 2000. - V. 70. - P. 7-14.
20. Balguid, A. The role of collagen cross-links in biomechanical behavior of human aortic heart valve leaflets--relevance for tissue engineering / A. Balguid, M.P. Rubbens, A. Mol, R.A. Bank, A.J. Bogers, J.P. van Kats // *Tissue Eng.* - 2007. - V. 13. - P. 1501-11.
21. Barili, F. Bioengineering of the aortic valve: a race without a finish line / F. Barili, L. Dainese, F.H. Cheema, M. Argenziano, A. Locatelli, C. Grossi // *Artif Organs.* - 2009. - V. 33. - P. 86-7.
22. Bell, E. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro / E. Bell, B. Ivarsson, C. Merrill // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1979. - V. 76. - P. 1274-8.
23. Berry, J.L. Bioreactors for development of tissue engineered heart valves / J.L. Berry, J.A. Steen, J. Koudy Williams, J.E. Jordan, A. Atala, J.J. Yoo // *Ann Biomed Eng.* - 2010. - V. 38. - P. 3272-9.

24. Berthiaume, F. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges // F. Berthiaume, T.J. Maguire, M.L. Yarmush // *Annu Rev Chem Biomol Eng.* - 2011. - V. 2. - P. 403-30.
25. Booth, C. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold / C. Booth, S.A. Korossis, H.E. Wilcox, K.G. Watterson, J.N. Kearney, J.J. Fisher // *Heart Valve Dis.* - 2002. - V. 11. - P. 457-62.
26. Brewer, R.J. An in vivo study of the dimensional changes of the aortic valve leaflets during the cardiac cycle / R.J. Brewer, R.M. Mentzer, J.D. Deck, R.C. Ritter, J.S. Trefil, S.P. Nolan // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 1977. - V. 74. P. 645-50.
27. Butcher, J.T. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions / J.T. Butcher, G.J. Mahler, L.A. Hockaday // *Adv Drug Deliv Rev.* - 2011. - V. 63. - P. 242-68.
28. Butcher, J.T. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments / J.T. Butcher, A.M. Penrod, A.J. Garcia, R.M. Nerem // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2004. - V. 24. - P. 1429-34.
29. Caamano, S. Does sodium dodecyl sulfate wash out of detergent-treated bovine pericardium at cytotoxic concentrations? / S. Caamano, A. Shiori, S.H. Strauss, E.C. Orton // *J Heart Valve Dis.* - 2009. - V. 18. - P. 101-5.
30. Carew, E.O. Effect of specimen size and aspect ratio on the tensile properties of porcine aortic valve tissues / E.O. Carew, J. Patel, A. Garg, P. Houghtaling, E. Blackstone, I. Vesely // *Ann Biomed Eng.* - 2003. - V. 31. - P. 526-35.
31. Carrel, A. The culture of whole organs / A. Carrel, C.A. Lindbergh // *Science.* - 1935. - V. 81. - P. 621-3.
32. Carrier, R.L. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization / R.L. Carrier, M. Papadaki, M. Rupnick, F.J. Schoen, N. Bursac, R. Langer // *Biotechnol Bioeng.* - 1999. - V. 64. - P. 580-9.
33. Cebotari, S. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells / S. Cebotari, A. Lichtenberg, I. Tudorache, A. Hilfiker, H. Mertsching, R. Leyh // *Circulation.* - 2006. - V. 114. - P. 132-7.
34. Cebotari, S. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix / S. Cebotari, H. Mertsching, K. Kallenbach, S. Kostin, O. Repin, A. Batrinac // *Circulation.* - 2002. - V. 106. - P. 163-8.
35. Christie, G.W. Mechanical properties of porcine pulmonary valve leaflets: how do they differ from aortic leaflets? / G.W. Christie, B.G. Barratt-Boyes // *Ann Thorac Surg.* - 1995. - V. 60. - P. S195-9.

36. Christie, G.W. Anatomy of aortic heart valve leaflets: the influence of glutaraldehyde fixation on function / G.W. Christie // *Eur J Cardiothorac Surg.* - 1992. - V. 6. - P. S25-32.
37. Clark, R.E. Stress-strain characteristics of fresh and frozen human aortic and mitral leaflets and chordae tendineae. Implications for clinical use / R.E. Clark // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 1973. - V. 66. - P. 202-8.
38. Colazzo, F. Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells / F. Colazzo, A.H. Chester, P.M. Taylor, M.H. Yacoub // *J Heart Valve Dis.* - 2010. - V. 19. - P. 736-44.
39. Colazzo, F. Extracellular matrix production by adipose-derived stem cells: implications for heart valve tissue engineering / F. Colazzo, P. Sarathchandra, R.T. Smolenski, A.H. Chester, Y.T. Tseng, J.T. Czernuszka // *Biomaterials.* - 2011. - V. 32. - P. 119-27.
40. Cole, W.G. Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves / W.G. Cole, D. Chan, A.J. Hickey, D.E. Wilcken // *Biochem J.* - 1984. - V. 219. - P. 451-60.
41. Courtman, D.W. Biomechanical and ultrastructural comparison of cryopreservation and a novel cellular extraction of porcine aortic valve leaflets / D.W. Courtman, C.A. Pereira, S. Omar, S.E. Langdon, J.M. Lee, G.J. Wilson // *J Biomed Mater Res.* - 1995. - V. 29. - P. 1507-16.
42. Cox, M.A. Tissue-engineered heart valves develop native-like collagen fiber architecture / M.A. Cox, J. Kortsmits, N. Driessen, C.V. Bouten, F.P. Baaijens // *Tissue Eng Part A.* - 2010. - V. 16. - P. 1527-37.
43. da Costa, F.D. Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation / F.D. da Costa, P.M. Dohmen, D. Duarte, C. von Glenn, S.V. Lopes, H.H. Filho // *Eur J Cardiothorac Surg.* - 2005. - V. 27. - P. 572-8.
44. De Vriese, A.S. Endothelial dysfunction in diabetes / A.S. De Vriese, T.J. Verbeuren, J. Van de Vo, N.H. Lameire, P.M. Vanhoutte // *Br J Pharmacol.* - 2000. - V. 130. - P. 963-74.
45. Dohmen, P.M. Results of a decellularized porcine heart valve implanted into the juvenile sheep model / P.M. Dohmen, F.D. da Costa, S.V. Lopes, S. Yoshi, F.P. Souza, R. Vilani // *Heart Surg Forum.* - 2005. - V. 8. - P. E100-4.
46. Dohmen, P.M. Decellularization of xenogenic biologic tissue / P.M. Dohmen, W. Konertz // *Ann Thorac Surg.* - 2008. - V. 85. - P. 2163.
47. Dohmen, P.M. Results with decellularized xenografts / P.M. Dohmen, W. Konertz // *Circ Res.* - 2006. - P. 99.
48. Dohmen, P.M. Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve / P.M. Dohmen, A. Lembcke, S. Holinski, A. Pruss, W. Konertz // *Ann Thorac Surg.* - 2011. - V. 92. - P. 1308-14.

49. Driessen, N.J. Modeling the mechanics of tissue-engineered human heart valve leaflets / N.J. Driessen, A. Mol, C.V. Bouten, F.P. Baaijens // *J Biomech.* - 2007. - V. 40. - P. 325-34.
50. Dumont, K. Design of a new pulsatile bioreactor for tissue engineered aortic heart valve formation / K. Dumont, J. Yperman, E. Verbeken, P. Segers, B. Meuris, S. Vandenberghe // *Artif Organs.* - 2002. - V. 26. - P. 710-4.
51. Dunkern, T.R. A novel perfusion system for the endothelialisation of PTFE grafts under defined flow / T.R. Dunkern, M. Paulitschke, R. Meyer, R. Buttemeyer, R. Hetzer, G. Burmester // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* - 1999. - V. 18. - P. 105-10.
52. El-Hamamsy, I. Endothelium-dependent regulation of the mechanical properties of aortic valve cusps / I. El-Hamamsy, K. Balachandran, M.H. Yacoub, L.M. Stevens, P. Sarathchandra, P.M. Taylor // *J Am Coll Cardiol.* - 2009. - V. 53. - P. 1448-55.
53. Elkins, R.C. Decellularized human valve allografts / R.C. Elkins, P.E. Dawson, S. Goldstein, S.P. Walsh, K.S. Black // *Ann Thorac Surg.* - 2001. - V. 71. - P. S428-32.
54. Erdbrugger, W. Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo / W. Erdbrugger, W. Konertz, P.M. Dohmen, S. Posner, H. Ellerbrok, O.E. Brodde // *Tissue Eng.* - 2006. - V. 12. - P. 2059-68.
55. Fang, N.T. Construction of tissue-engineered heart valves by using decellularized scaffolds and endothelial progenitor cells / N.T. Fang, S.Z. Xie, S.M. Wang, H.Y., Gao H, C.G. Wu, L.F. Pan // *Chin Med J (Engl).* - 2007. - V. 120. - P. 696-702.
56. Forsberg, M. Challenges for the Therapeutic use of Pluripotent Stem Derived Cells / M. Forsberg, O. Hovatta // *Front Physiol.* - 2012. - V. 3. - P. 19.
57. Freed, L.E. Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling / L.E. Freed, F. Guilak, X.E. Guo, M.L. Gray, R. Tranquillo, J.W. Holmes // *Tissue Eng.* - 2006. - V. 12. - P. 3285-305.
58. Gabbieri, D. Ross procedure with a tissue-engineered heart valve in complex congenital aortic valve disease / D. Gabbieri, P.M. Dohmen, J. Linneweber, A. Lembcke, J.P. Braun, W. Konertz // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 2007. - V. 133. - P. 1088-9.
59. Gandaglia, A. Cells, scaffolds and bioreactors for tissue-engineered heart valves: a journey from basic concepts to contemporary developmental innovations / A. Gandaglia, A. Bagnò, F. Naso, M. Spina, G. Gerosa // *Eur J Cardiothorac Surg.* - 2011. - V. 39. - P. 523-31.
60. Go, A.S. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the american heart association / A.S. Go, D. Mozaffarian, V.L. Roger, E.J. Benjamin, J.D. Berry, M.J. Blaha // *Circulation.* - 2014. - V. 129. - P. 399-410.

61. Goldstein, S. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft / S. Goldstein, D.R. Clarke, S.P. Walsh, K.S. Black, M.F. O'Brien // *Ann Thorac Surg.* - 2000. - V. 70. - P. 1962-9.
62. Grashow, J.S. Biaxial stress-stretch behavior of the mitral valve anterior leaflet at physiologic strain rates / J.S. Grashow, A.P. Yoganathan, M.S. Sacks // *Ann Biomed Eng.* - 2006. - V. 34. - P. 315-25.
63. Grimm, M. Improved biocompatibility of bioprosthetic heart valves by L-glutamic acid treatment / M. Grimm, M. Grabenwoger, E. Eybl, A. Moritz, P. Bock, M.M. Muller // *J Card Surg.* - 1992. - V. 7. - P. 58-64.
64. Grinnell, F. Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts / F. Grinnell, C.R. Lamke // *J Cell Sci.* - 1984. - V. 66. - P. 51-63.
65. Grinnell, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction / F. Grinnell // *J Cell Biol.* - 1994. - V. 124. - P. 401-4.
66. Hasan, A. Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs / A. Hasan, K. Ragaert, W. Swieszkowski, S. Selimovic, A. Paul, G. Camci-Unal // *J Biomech* 2013. - V. 47. - P. 1949-63.
67. Hawkins, J.A. Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts / J.A. Hawkins, N.D. Hillman, L.M. Lambert, J. Jones, G.B. Di Russo, T. Profaizer // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 2003. - V. 126. - P. 247-52.
68. Hibino, N. Evaluation of the use of an induced pluripotent stem cell sheet for the construction of tissue-engineered vascular grafts / N. Hibino, D.R. Duncan, A. Nalbandian, T. Yi, Y. Qyang, T. Shinoka // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 2012. - V. 143. - P. 696-703.
69. Hildebrand, D.K. Design and hydrodynamic evaluation of a novel pulsatile bioreactor for biologically active heart valves / D.K. Hildebrand, Z.J. Wu, J.E. Mayer, M.S. Sacks // *Ann Biomed Eng.* - 2004. - V. 32. - P. 1039-49.
70. Hoehn, A. A modular suite of hardware enabling spaceflight cell culture research / A. Hoehn, D.M. Klaus, L.S. Stodieck // *J Gravit Physiol.* - 2004. - V. 11. - P. 39-49.
71. Hoerstrup, S.P. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells / S.P. Hoerstrup, A. Kadner, S. Melnitchouk, A. Trojan, K. Eid, J. Tracy // *Circulation.* - 2002. - V. 106. - P. 1143-50.
72. Hoerstrup, S.P. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro / S.P. Hoerstrup, R. Sodian, S. Daebritz, J. Wang, E.A. Bacha, D.P. Martin // *Circulation.* - 2000. - V. 102. - P. III44-9.

73. Hoerstrup, S.P. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves / S.P. Hoerstrup, R. Sodian, J.S. Sperling, J.P. Vacanti, J.E. Mayer // *Tissue Eng.* - 2000. - V. 6. - P. 75-9.
74. Huh, J. Heart valve replacement: which valve for which patient? / J. Huh, F. Bakaeen // *Curr Cardiol Rep.* - 2006. - V. 8. - P. 109-16.
75. Human, P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure / P. Human, P. Zilla // *Ann Thorac Surg.* - 2001. - V. 71. - P. S385-8.
76. Isenberg, B.C. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro / B.C. Isenberg, C. Williams, R.T. Tranquillo // *Circ Res.* - 2006. - V. 98. - P. 25-35.
77. Iwai, S. Minimally immunogenic decellularized porcine valve provides in situ recellularization as a stentless bioprosthetic valve / S. Iwai, K. Torikai, C.M. Coppin, Y. Sawa // *J Artif Organs.* - 2007. - V. 10. - P. 29-35.
78. Jashari, R. Banking of the human heart valves and the arteries at the European homograft bank (EHB)--overview of a 14-year activity in this International Association in Brussels / R. Jashari, B. Van Hoeck, M. Tabaku, A. Vanderkelen // *Cell Tissue Bank.* - 2004. - V. 5. - P. 239-51.
79. Kada, K. Orientation change of cardiocytes induced by cyclic stretch stimulation: time dependency and involvement of protein kinases / K. Kada, K. Yasui, K. Naruse, K. Kamiya, I. Kodama, J. Toyama // *J Mol Cell Cardiol.* - 1999. - V. 31. - P. 247-59.
80. Kadner, A. A new source for cardiovascular tissue engineering: human bone marrow stromal cells / A. Kadner, S.P. Hoerstrup, G. Zund, K. Eid, C. Maurus, S. Melnitchouk // *Eur J Cardiothorac Surg.* - 2002. - V. 21. - P. 1055-60.
81. Karim, N. The cardiovascular tissue-reactor: a novel device for the engineering of heart valves / N. Karim, K. Golz, A. Bader // *Artif Organs.* - 2006. - V. 30. - P. 809-14.
82. Karimi, R. Estimation of nonlinear mechanical properties of vascular tissues via elastography. / R. Karimi, T. Zhu, B.E. Bouma, M.R. Mofrad // *Cardiovasc Eng.* - 2008. - V. 8. - P. 191-202.
83. Kasimir, M.T. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves / M.T. Kasimir, E. Rieder, G. Seebacher, G. Silberhumer, E. Wolner, G. Weigel // *Int J Artif Organs.* - 2003. - V. 26. - P. 421-7.
84. Kasimir, M.T. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation / M.T. Kasimir, G. Weigel, J. Sharma, E. Rieder, G. Seebacher, E. Wolner // *Thromb Haemost.* - 2005. - V. 94. - P. 562-7.
85. Khademhosseini, A. Progress in tissue engineering / A. Khademhosseini, J.P. Vacanti, R. Langer // *Sci Am.* - 2009. - V. 300. - P. 64-71.

86. Konertz, W. Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation / W. Konertz, P.M. Dohmen, J. Liu, S. Beholz, S. Dushe, S. Posner // *J Heart Valve Dis.* - 2005. - V. 14. - P. 78-81.
87. Korossis, S.A. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves / S.A. Korossis, C. Booth, H.E. Wilcox, K.G. Watterson, J.N. Kearney, J. Fisher // *J Heart Valve Dis.* - 2002. - V. 11. - P. 463-71.
88. Lee, J.M. The glutaraldehyde-stabilized porcine aortic valve xenograft. I. Tensile viscoelastic properties of the fresh leaflet material / J.M. Lee, D.W. Courtman, D.R. Boughner // *J Biomed Mater Res.* - 1984. - V. 18. - P. 61-77.
89. Leeson-Dietrich, J. Porcine pulmonary and aortic valves: a comparison of their tensile viscoelastic properties at physiological strain rates / J. Leeson-Dietrich, D. Boughner, I. Vesely // *J Heart Valve Dis.* - 1995. - V. 4. - P. 88-94.
90. Lewinsohn, A.D. Anisotropic strain transfer through the aortic valve and its relevance to the cellular mechanical environment / A.D. Lewinsohn, A. Anssari-Benham, D.A. Lee, P.M. Taylor, A.H. Chester, M.H. Yacoub // *Proc Inst Mech Eng H.* - 2011. - V. 225. - P. 821-30.
91. Liao, J. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet / J. Liao, E.M. Joyce, M.S. Sacks // *Biomaterials.* - 2008. - V. 29. - P. 1065-74.
92. Lichtenberg, A. Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves / A. Lichtenberg, S. Cebotari, I. Tudorache, G. Sturz, M. Winterhalter, A. Hilfiker *J Heart Valve Dis.* - 2006. - Lichtenberg A, Cebotari S, Tudorache I, Sturz G, Winterhalter M, Hilfiker A. 15. - P. 287-93.
93. Lichtenberg, A. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions / A. Lichtenberg, I. Tudorache, S. Cebotari, S. Ringes-Lichtenberg, G. Sturz, K. Hoeffler // *Biomaterials.* - 2006. - V. 27. - P. 4221-9.
94. Lichtenberg, A. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions / A. Lichtenberg, I. Tudorache, S. Cebotari, M. Suprunov, G. Tudorache, H. Goerler // *Circulation.* - 2006. - V. 114. - P. I559-65.
95. Lysaght, M.J. Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics / M.J. Lysaght, A. Jaklenec, E. Deweerd // *Tissue Eng Part A.* - 2008. - V. 14. - P. 305-15.
96. Lysaght, M.J. Product development in tissue engineering / M.J. Lysaght // *Tissue En.* - 1995. - V. 1. - P. 221-8.
97. Mason, C. Regenerative medicine cell therapies: numbers of units manufactured and patients treated between 1988 and 2010 / C. Mason, E. Manzotti // *Regen Med.* - 2010. - V. 5. - P. 307-13.

98. Mavrilas, D. An approach to the optimization of preparation of bioprosthetic heart valves / D. Mavrilas, Y. Missirlis // *J Biomech.* - 1991. - V. 24. - P. 331-9.
99. McIntire, L.V. WTEC panel report on tissue engineering / L.V. McIntire // *Tissue Eng.* - 2003. - V. 9. - P. 3-7.
100. Mendelson, K. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges / K. Mendelson, F.J. Schoen // *Ann Biomed Eng.* - 2006. - V. 34. - P. 1799-819.
101. Merryman, W.D. The effects of cellular contraction on aortic valve leaflet flexural stiffness / W.D. Merryman, H.Y. Huang, F.J. Schoen, M.S. Sacks // *J Biomech.* - 2006. - V. 39. - P. 88-96.
102. Mertsching, H. Bioreactor technology in cardiovascular tissue engineering / H. Mertsching, J. Hansmann // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* - 2009. - V. 112. - P. 29-37.
103. Meyer, S.R. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat / S.R. Meyer, B. Chiu, T.A. Churchill, L. Zhu, J.R. Lakey, D.B. Ross // *J Biomed Mater Res A.* - 2006. - V. 79. - P. 254-62.
104. Mirnajafi, A. The flexural rigidity of the aortic valve leaflet in the commissural region / A. Mirnajafi, J.M. Raymer, L.R. McClure, M.S. Sacks // *J Biomech.* - 2006. - V. 39. - P. 2966-73.
105. Misfeld, M. Heart valve macro- and microstructure / M. Misfeld, H.H. Sievers // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* - 2007. - V. 362. - P. 1421-36.
106. Missirlis, YF. Stress analysis of the aortic valve during diastole: important parameters / Y.F. Missirlis, C.D. Armeniades // *J Biomech.* - 1976. - V. 9. - P. 477-80.
107. Mol, A. Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach / A. Mol, N.J. Driessen, M.C. Rutten, S.P. Hoerstrup, C.V. Bouten, F.P. Baaijens // *Ann Biomed Eng.* - 2005. - V. 33. - P. 1778-88.
108. Mulholland, D.L. Cell biology of valvular interstitial cells / D.L. Mulholland, A.I. Gotlieb // *Can J Cardiol.* - 1996. - V. 12. - P. 231-6.
109. Murase, Y. Evaluation of compliance and stiffness of decellularized tissues as scaffolds for tissue-engineered small caliber vascular grafts using intravascular ultrasound / Y. Murase, Y. Narita, H. Kagami, K. Miyamoto, Y. Ueda, M. Ueda // *ASAIO J.* - 2006. - V. 52. - P. 450-5.
110. Nandy, S. Flush mounted hot film anemometer measurement of wall shear stress distal to a tri-leaflet valve for Newtonian and non-Newtonian blood analog fluids / S. Nandy, J.M. Tarbell // *Biorheology.* - 1987. - V. 24. - P. 483-500.
111. Narine, K. Readily available porcine aortic valve matrices for use in tissue valve engineering. Is cryopreservation an option? / K. Narine, E.C. Ing, M. Cornelissen, F. Desomer, H. Beele, L. Vanlangenhove // *Cryobiology.* - 2006. - V. 53. - P. 169-181.
112. Nerem, R.M. Regenerative medicine: the emergence of an industry / R.M. Nerem // *J R Soc Interface.* - 2010. - V. 7 Suppl 6. - P. S771-5.

113. Neugebauer, J.M. Detergents: an overview / J.M. Neugebauer // *Methods Enzymol.* - 1990. - V. 182. - P. 239-53.
114. Numata, S. Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: comparison with cryopreserved allograft / S. Numata, T. Fujisato, K. Niwaya, H. Ishibashi-Ueda, T. Nakatani, S. Kitamura // *J Heart Valve Dis.* - 2004. - V. 13. - P. 984-90.
115. Otto, C.M. Clinical practice. Evaluation and management of chronic mitral regurgitation / C.M. Otto // *N Engl J Med.* - 2001. - V. 345. - P. 740-6.
116. Pansky, A. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells / A. Pansky, B. Roitzheim, E. Tobiasch // *Clin Lab.* - 2007. - V. 53 – P. 81-4.
117. Parolini, O. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? / O. Parolini, M. Soncini, M. Evangelista, D. Schmidt // *Regen Med.* - 2009. - V. 4. - P. 275-91.
118. Phillips, T.J. Clinical applications of cultured epithelium / T.J. Phillips, B.A. Gilchrest // *Epithelial Cell Biol.* - 1992. - V. 1. P. 39-46.
119. Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues / D.J. Prockop // *Science.* - 1997. - V. 276. - P. 71-74.
120. Rabkin-Aikawa, E. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves / E. Rabkin-Aikawa, M. Farber, M. Aikawa, F.J. Schoen // *J Heart Valve Dis.* - 2004. - V. 13. - P. 841-7.
121. Rheinwald, J.G. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes / J.G. Rheinwald, H. Green // *Nature.* - 1977. - V. 265. - P. 421-4.
122. Rheinwald, J.G. Growth of cultured mammalian cells on secondary glucose sources / J.G. Rheinwald, H. Green // *Cell.* - 1974. - V. 2. - P. 287-93.
123. Rheinwald, J.G. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells / J.G. Rheinwald, H. Green // *Cell.* - 1975. - V/ 6. - P. 331-43.
124. Rieder, E. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells / E. Rieder, M.T. Kasimir, G. Silberhumer, G. Seebacher, E. Wolner, P. Simon // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 2004. - V. 127. - P. 399-405.
125. Rieder, E. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells / E. Rieder, G. Seebacher, M.T. Kasimir, E. Eichmair, B. Winter, B. Dekan // *Circulation.* - 2005. - V. 111. - P. 2792-7.
126. Rippel, R.A. Tissue-engineered heart valve: future of cardiac surgery / R.A. Rippel, H. Ghanbari, A.M. Seifalian // *World J Surg.* - 2012. - V. 36. - P. 1581-91.

127. Rousseau, E.P. Elastic and viscoelastic material behaviour of fresh and glutaraldehyde-treated porcine aortic valve tissue / E.P. Rousseau, A.A. Sauren, M.C. van Hout, A.A. van Steenhoven // J Biomech. - 1983. - V. 16. - P. 339-48.
128. Sacks, M.S. The aortic valve microstructure: effects of transvalvular pressure / M.S. Sacks, D.B. Smith, E.D. Hiester // J Biomed Mater Res. - 1998. - V. 41. - P. 131-41.
129. Samouillan, V. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprotheses / V. Samouillan, J. Dandurand-Lods, A. Lamure, E. Maurel, C. Lacabanne, G. Gerosa // J Biomed Mater Res. - 1999. - V. 46. - P. 531-8.
130. Sauren, A.A. The mechanical properties of porcine aortic valve tissues / A.A. Sauren, M.C. van Hout, A.A. van Steenhoven, F.E. Veldpaus, D.D. Janssen // J Biomech. - 1983. - V. 16. - P. 327-37.
131. Schaner, P.J. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering / P.J. Schaner, N.D. Martin, T.N. Tulenko, I.M. Shapiro, N.A. Tarola, R.F. Leichter // J Vasc Surg. - 2004. - V. 40. - P. 146-53.
132. Schenke-Layland, K. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study / K. Schenke-Layland, F. Opitz, M. Gross, C. Doring, K.J. Halbhuber, F. Schirrmeister // Cardiovasc Res. - 2003. - V. 60. - P. 497-509.
133. Schenke-Layland, K. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves / K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz, K. Konig, I. Riemann, K.J. Halbhuber // J Struct Biol. - 2003. - V. 143. - P. 201-8.
134. Schmidt, D. Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source / D. Schmidt, J. Achermann, B. Odermatt, C. Breymann, A. Mol, M. Genoni // Circulation. - 2007. - V. 116. - P. I64-70.
135. Schmidt, D. Cryopreserved amniotic fluid-derived cells: a lifelong autologous fetal stem cell source for heart valve tissue engineering / D. Schmidt, J. Achermann, B. Odermatt, M. Genoni, G. Zund, S.P. Hoerstrup // J Heart Valve Dis. - 2008. - V. 17. - P. 446-55.
136. Schmidt, D. Minimally-invasive implantation of living tissue engineered heart valves: a comprehensive approach from autologous vascular cells to stem cells / D. Schmidt, P.E. Dijkman, A. Driessen-Mol, R. Stenger, C. Mariani, A. Puolakka // J Am Coll Cardiol. - 2010. - V. 56. - P. 510-20.
137. Schmidt, D. Tissue engineered heart valves based on human cells / D. Schmidt, S.P. Hoerstrup // Swiss Med Wkly. - 2007. - V. 137 Suppl 155. - P. 80-5.
138. Schoen, F.J. Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification / F.J. Schoen, R.J. Levy, A.C. Nelson, W.F. Bernhard, A. Nashef, M. Hawley // Lab Invest. - 1985. - V. 52. - P. 523-32.

139. Schoen, F.J. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering / F.J. Schoen // *Circulation*. - 2008. - V. 118. - P. 1864-80.
140. Shachar, M. Cardiac tissue engineering, ex-vivo: design principles in biomaterials and bioreactors / M. Shachar, S. Cohen // *Heart Fail Rev*. - 2003. - V. 8. - P. 271-6.
141. Shaddy, R.E. Prospective analysis of HLA immunogenicity of cryopreserved valved allografts used in pediatric heart surgery / R.E. Shaddy, D.D. Hunter, K.A. Osborn, L.M. Lambert, L.L. Minich, J.A. Hawkins // *Circulation*. - 1996. - V. 94. - P. 1063-7.
142. Shi, Y. Fabrication of mitral valve chordae by directed collagen gel shrinkage / Y. Shi, I. Vesely // *Tissue Eng*. - 2003. - V. 9. - P. 1233-42.
143. Shinoka, T. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model / T. Shinoka, C.K. Breuer, R.E. Tanel, G. Zund, T. Miura, P.X. Ma // *Ann Thorac Surg*. - 1995. - V. 60. - P. S513-6.
144. Shinoka, T. Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model / T. Shinoka, P.X. Ma, D. Shum-Tim, C.K. Breuer, R.A. Cusick, G. Zund // *Circulation*. - 1996. - V. 94. - P. II164-8.
145. Simon, P. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients / P. Simon, M.T. Kasimir, G. Seebacher, G. Weigel, R. Ullrich, U. Salzer-Muhar // *Eur J Cardiothorac Surg*. - 2003. - V. 23. - P. 1002-6.
146. Smith, A. Anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary trunk. Anatomic findings in relation to pathophysiology and surgical repair / A. Smith, R. Arnold, R.H. Anderson, J.L. Wilkinson, S.A. Qureshi, L.M. Gerlis // *J Thorac Cardiovasc Surg*. - 1989. - V. 98. - P. 16-24.
147. Smith, J.D. Humoral immune response to human aortic valve homografts / J.D. Smith, H. Ogino, D. Hunt, R.M. Laylor, M.L. Rose, M.H. Yacoub // *Ann Thorac Surg*. - 1995. - V. 60. - P. S127-30.
148. Sodian, R. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves / R. Sodian, S.P. Hoerstrup, J.S. Sperling, S. Daebritz, D.P. Martin, A.M. Moran // *Circulation*. - 2000. - V. 102. - P. III22-9.
149. Sodian, R. Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering / R. Sodian, J.S. Sperling, D.P. Martin, A. Egozy, U. Stock, J.E. Mayer // *Tissue Eng*. - 2000. - V. 6. - P. 183-8.
150. Stella, J.A. Time-dependent biaxial mechanical behavior of the aortic heart valve leaflet / J.A. Stella, J. Liao, M.S. Sacks // *J Biomech*. - 2007. - V. 40. - P. 3169-77.
151. Stella, J.A. On the biaxial mechanical properties of the layers of the aortic valve leaflet / J.A. Stella, M.S. Sacks // *J Biomech Eng*. - 2007. - V. 129. - P. 757-66.

152. Stock, U.A. Patch augmentation of the pulmonary artery with bioabsorbable polymers and autologous cell seeding / U.A. Stock, T. Sakamoto, S. Hatsuoka, D.P. Martin, M. Nagashima, A.M. Moran // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 2000. - V. 120. - P. 1158-67.
153. Stradins, P. Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve / P. Stradins, R. Lacis, I. Ozolanta, B. Purina, V. Ose, L. Feldmane // *Eur J Cardiothorac Surg.* - 2004. - V. 26. - P. 634-9.
154. Sutherland, F.W. From stem cells to viable autologous semilunar heart valve / F.W. Sutherland, T.E. Perry, Y. Yu, M.C. Sherwood, E. Rabkin, Y. Masuda // *Circulation.* - 2005. - V. 111. - P. 2783-2791.
155. Syedain, Z.H. Controlled cyclic stretch bioreactor for tissue-engineered heart valves / Z.H. Syedain, R.T. Tranquillo // *Biomaterials.* - 2009. - V. 30. - P. 4078-84.
156. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* - 2006. - V. 126. - P. 663-76.
157. Tan, A.J. The effects of sterilization and storage treatments on the stress-strain behavior of aortic valve leaflets / A.J. Tan, D.L. Holt // *Ann Thorac Surg.* - 1976. - V. 22. - P. 188-94.
158. Taylor, P.M. The cardiac valve interstitial cell / P.M. Taylor, P. Batten, N.J. Brand, P.S. Thomas, M.H. Yacoub // *Int J Biochem Cell Biol.* - 2003. - V. 35. - P. 113-8.
159. Thubrikar, M. Stresses of natural versus prosthetic aortic valve leaflets in vivo / M. Thubrikar, W.C. Piepgrass, J.D. Deck, S.P. Nolan // *Ann Thorac Surg.* - 1980. - V. 30. - P. 230-9.
160. Tudorache, I. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves / I. Tudorache, S. Cebotari, G. Sturz, L. Kirsch, C. Hurschler, A. Hilfiker // *J Heart Valve Dis.* - 2007. - V. 16. - P. 567-73.
161. Ueda, Y. Antigen clearing from porcine heart valves with preservation of structural integrity / Y. Ueda, M.W. Torrianni, C.M. Coppin, S. Iwai, Y. Sawa, H. Matsuda // *Int J Artif Organs.* - 2006. - V. 29. - P. 781-9.
162. Versari, S. Effects of gravity on proliferation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells / S. Versari, A. Villa, M.N. Helder, B.Z. Doulabi, J. van Loon, S. Bradamante // *J Gravit Physiol.* - 2007. - V. 14. - P127-8.
163. Vesely, I. The hybrid xenograft/autograft bioprosthetic heart valve: in vivo evaluation of tissue extraction / I. Vesely, R. Noseworthy, G. Pringle // *Ann Thorac Surg.* - 1995. - V. 60. - P. 359-64.
164. Vesely, I. Heart valve tissue engineering / I. Vesely // *Circ Res.* - 2005. - V. 97. - P. 743-55.
165. Wang, K.X. Effect of trypsin and Triton-X 100 for decellularization of porcine aortic heart valves / K.X. Wang, J.F. Zhang, Q.P. Zhan, X.H. Jian // *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* - 2005. - V. 25. - P. 22-5.

166. Wang, X. Intelligent freeform manufacturing of complex organs / X. Wang // *Artif Organs*. - 2012. - V. 36. - P. 951-61.
167. Webb, A.R. In vitro characterization of a compliant biodegradable scaffold with a novel bioreactor system / A.R. Webb, B.D. Macrie, A.S. Ray, J.E. Russo, A.M. Siegel, M.R. Glucksberg // *Ann Biomed Eng*. - 2007. - V. 35. - P. 1357-67.
168. Weber, B. Stem cells for heart valve regeneration / B. Weber, M.Y. Emmert, S.P. Hoerstrup // *Swiss Med Wkly*. - 2012. - V. 142. - P. 13622.
169. Weiner, L.P. Definitions and criteria for stem cells / L.P. Weiner // *Methods Mol Biol*. - 2008. - V. 438. - P. 3-8.
170. Weston, M.W. Estimation of the shear stress on the surface of an aortic valve leaflet / M.W. Weston, D.V. LaBorde, A.P. Yoganathan // *Ann Biomed Eng*. - 1999. - V. 27. - P. 572-9.
171. Weston, MW. Biosynthetic activity in heart valve leaflets in response to in vitro flow environments / M.W. Weston, A.P. Yoganathan // *Ann Biomed Eng*. - 2001. - V. 29. - P. 752-763.
172. Wollmann, L.C. Effects of cryopreservation and/or decellularization on extracellular matrix of porcine valves / L.C. Wollmann, C.A. Laurindo, F.D. da Costa, A.N. Moreno // *Rev Bras Cir Cardiovasc*. - 2011. - V. 26. - P. 490-6.
173. Yacoub, M.H. Novel approaches to cardiac valve repair: from structure to function: Part II / M.H. Yacoub, C.H. Cohn // *Circulation*. - 2004. - V. 109. - P. 1064-72.
174. Yacoub, MH. Will heart valve tissue engineering change the world? / M.H. Yacoub, J.J. Takkenberg // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. - 2005. - V. 2. - P. 60-1.
175. Zeltinger, J. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves / J. Zeltinger, L.K. Landeen, H.G. Alexander, I.D. Kidd, B. Sibanda // *Tissue Eng*. - 2001V. 7. - P. 9-22.
176. Zuk, P.A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz // *Tissue Eng*. - 2001. - V. 7. - P. 211-28.