

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(ФГБОУ ВО КУБГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

*На правах рукописи*

**Накохов Рамазан Заурбиевич**

**ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ  
НА АНГИОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ  
КОНСТРУКЦИИ ПИЩЕВОДА**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

профессор **А.Х. Каде**

Научный консультант:

доктор медицинских наук

профессор **Г.М. Могильная**

Краснодар – 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
 <b>ГЛАВА 1.</b>	
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>12</b>
1.1. Перспективы использования методов регенеративной медицины при патологии пищевода .....	12
1.2. Тканевая инженерия как новый подход к лечению заболеваний пищевода .....	15
1.3. Регуляция ангиогенеза .....	17
1.4. Стимуляция ангиогенеза в тканеинженерных конструкциях .....	20
1.5. Стволовые клетки, используемые в регенеративной медицине .....	24
1.6. Децеллюляризация как способ получения биологического каркаса для тканевой инженерии пищевода .....	29
 <b>ГЛАВА 2.</b>	
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>42</b>
2.1. Эксплантация органов .....	42
2.2. Децеллюляризация пищевода .....	43
2.3. Морфологический анализ .....	43
2.4. Количественное определение содержания ДНК .....	44
2.5. Иммуногистохимический анализ .....	45
2.6. Выделение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток .....	46
2.7. Статичная рещеллюляризация децеллюляризованного пищевода ....	49
2.8. Оценка жизнеспособности стволовых клеток и цитотоксических свойств ацеллюлярных матрицсов .....	49
2.9. Протокол оперативного вмешательства .....	49
2.10. Статистические методы обработки полученных данных .....	50

**ГЛАВА 3.**

<b>РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	52
3.1. Процесс децеллюляризации пищевода крысы .....	52
3.2. Морфологическая характеристика децеллюляризованного пищевода крысы .....	54
3.3. Культивирование GFP-позитивных клеток и статическая рецеллюляризация ацеллюлярного каркаса .....	60
3.4. Характеристика тканеинженерных конструкций пищевода после эксплантации .....	62
3.5. Иммуногистохимическая оценка процессов ангиогенеза в ТИК пищевода .....	71

**ГЛАВА 4.**

<b>ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	77
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	90
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b> .....	91
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	92
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	94
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b> .....	117

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** В общей структуре заболеваемости органов пищеварительного тракта патология пищевода хотя и имеет небольшой удельный вес, но в силу тяжести последствий и их социальной значимости является весьма актуальной. Анатомическое расположение и важность выполняемой функции способствуют тому, что процессы, приводящие к затруднению прохождения пищи по пищеводу, приводят к значительному снижению качества жизни пациентов (Т.В. Скажуткина и др., 2015). Хирургическое лечение больных с патологией пищевода связано с изъятием поврежденной части органа и замещением его частью желудка или кишечника. Показаниями для выполнения реконструктивной операции являются: отсутствие эффекта от бужирования стриктур, рубцовое нарушение проходимости пищевода, уменьшение длины пищевода с развитием устойчивого гастроэзофагеального рефлюкса, который приводит к формированию стриктур, ретенозы пищевода после неоднократных бужирований (чаще, 3-х раз в течение 6 месяцев), риск перфорации в процессе бужирования и перфорация пищевода в анамнезе (Ю.В. Чикинев и др., 2009).

Современная техника восстановительных операций, после резекции пищевода из-за различной патологии, достигла значительных успехов. Развитие эндоскопических технологий позволяет выполнять широкий спектр малоинвазивных вмешательств. Восстановление проходимости пищевода после его резекции является заключительным этапом после резекции. В этом случае принято говорить об одномоментном восстановлении. Однако в ряде случаев пластика пищевода проводится в несколько этапов.

Методы реконструкции пищевода являются довольно травматичными, поскольку при этом используются собственные ткани организма (кожные лоскуты, тонкий и толстый кишечник, желудок), ослабленного на фоне

основного заболевания. Кроме того, большое количество осложнений, как в ближайшем, так и в отдаленном послеоперационном периоде при использовании приведенных методик, свидетельствует о том, что до настоящего времени не существует приемлемого метода пластики пищевода. Таким образом, необходим поиск менее травматичных методов (Р.А. Ханвердиев, А.Ю. Разумовский, 2012).

В настоящее время не хватает донорских органов, кроме того, не решены проблемы, связанные с их доставкой. Пациентам после трансплантации назначается пожизненная иммуносупрессивная терапия, которая приводит к определенным осложнениям. Таким образом, необходима разработка новых методов лечения. Это позволит предупредить возникновение осложнений, которые связаны с аллогенной трансплантацией (А.В. Черных и др., 2016). Здесь большие надежды возлагаются на настоящие и будущие возможности регенеративной медицины.

Наиболее перспективным направлением современной медицины является регенеративная медицина, позволяющая создать в лабораторных условиях биологическую конструкцию, на основе естественного (полученного методом децеллюляризации) или синтетического каркаса и аутологичных клеток реципиента, для замены поврежденного или удаленного органа. Для создания наиболее оптимального каркаса требуется решить ряд проблем: во-первых, обеспечить структуру, сходную с нативной тканью; во-вторых, создать сосудистую сеть, способную обеспечить оптимальную перфузию по всему объему тканей; в-третьих, способствовать пролиферации и дифференцировке клеток, используемых при рецеллюляризации; в-четвертых, обеспечить адекватное микроокружение клеток; в-пятых, стимулировать пролиферацию, дифференцировку и созревания клеток.

Использование аутологичных стволовых клеток реципиента при создании тканеинженерных органов и тканей позволит исключить использование иммуносупрессивной терапии, что в дальнейшем приведет к

повышению качества жизни пациентов. Однако невозможность воссоздания сложной структуры внеклеточного матрикса при использовании синтетических каркасов, а также невозможность моделировать в пространстве и времени все факторы и сигналы, способствующие дифференцировке и пролиферации клеток, привели к необходимости использования биологических (децеллюляризированных) каркасов, полученных от доноров (А.В. Черных и др., 2016; S.F. Badylak et al., 2011; F. Berthiaume et al., 2011).

Таким образом, необходим поиск новых менее травматичных и более эффективных методов лечения патологии пищевода. Методы регенеративной медицины, в частности тканевой инженерии, могут быть использованы для решения данной проблемы.

**Степень разработанности темы.** Возможность использования биологических каркасов, полученных путем децеллюляризационной обработки материала, зависит от вида используемых детергентов и способов оценки качества полученного материала, которые являются весьма специфичными для определенных тканей и органов. Исходя из этого, большое внимание уделяется разработке протокола децеллюляризационной обработки тканей и органов, с целью минимизации повреждения внеклеточного матрикса (ВКМ). Биологические каркасы, полученные методом децеллюляризации, должны сохранять структуру и свойства нативной ткани. В дальнейшем это будет способствовать адгезии и пролиферации аутологичных клеток, что, в итоге, приведет к созданию оптимальной трехмерной тканеинженерной конструкции (ТИК) (А.В.Черных и др., 2016). Полученный биологический каркас пищевода должен обладать необходимыми эластическими свойствами для достаточного расширения во время прохождения пищевого комка, но при этом должен спадаться в состоянии покоя (Р.З. Накохов и др., 2017). После пересадки ТИК пищевода

должна быть устойчивой к низким значениям рН содержимого желудка и активно осуществлять перистальтические движения.

При анализе литературы стало ясно, что определенные протоколы, используемые для децеллюляризации пищевода, обладают как преимуществами, так и недостатками. Протоколы децеллюляризации, в которых в качестве детергента использовались дезоксихолат натрия и ДНК-аза, показали большую эффективность и являются в настоящее время наиболее перспективными для создания ТИК пищевода (O. Syed et al., 2014). Известные протоколы обеспечивают сохранение биомеханических свойств матрикса, но при этом требуется увеличение продолжительности процедуры (G. Totonelli et al., 2012; G. Totonelli et al., 2013; С.Т. Турсуналиев и др., 2015), что создает угрозу развития бактериальной контаминации. Однако сокращение времени выполнения протокола децеллюляризации неминуемо приводит к ухудшению механических свойств каркаса. Структура и состав биологического каркаса, в свою очередь, оказывают влияние на протекающие процессы ангиогенеза, а также миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток.

**Цель исследования:** разработать оптимальный протокол децеллюляризации пищевода у крыс и изучить активность процессов ангиогенеза после трансплантации тканеинженерной конструкции пищевода.

**Задачи исследования:**

1. Создать оптимальный протокол децеллюляризации пищевода крысы с сохранением гистологической структуры его внеклеточного матрикса.
2. Представить характеристику антигенных свойств бесклеточного матрикса пищевода до и после проведения процесса децеллюляризации.
3. Отработать протокол рецеллюляризации каркаса пищевода мультипотентными мезенхимными стромальными клетками с дальнейшим определением способности к адгезии к нему и степени их выживаемости.

4. Отработать методику трансплантации пищевода у крыс и оценить биологическую совместимость тканеинженерной конструкции пищевода с организмом реципиента, созданной на основе биологического каркаса и аллогенных мезенхимных стволовых клеток костного мозга.

5. Оценить проангиогенные свойства тканеинженерной конструкции пищевода после ее трансплантации.

**Научная новизна исследования.** Впервые разработан модифицированный детергентно-энзиматический метод децеллюляризации пищевода крыс, способствующий сохранению элементов внеклеточного матрикса пищевода (коллаген IV типа, фибронектин, ламинин), снизить концентрацию антигенов (ДНК, МНС I типа). Одновременно с этим оптимизировано время воздействия растворов, что в свою очередь улучшило биомеханические свойства, снизило вероятность бактериальной контаминации получаемого биологического каркаса, а также активизировало ангиогенные свойства ТИК пищевода.

На модели крыс изучены ангиогенные свойства полученного биологического каркаса пищевода, а также описаны возможные механизмы ангиогенеза после трансплантации ТИК пищевода. Проведена оценка возможности формирования сосудистой сети в ТИК пищевода с последующим восстановлением кровоснабжения тканей. С помощью иммуногистохимических методов исследования проведена визуализация сосудов в трансплантированной ТИК. Результаты исследований показали присутствие сосудистой сети во всех оболочках ТИК пищевода.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты экспериментальных исследований позволили расширить знания о процессе децеллюляризации пищевода, а также степени его воздействия на свойства бесклеточного каркаса. Изучение ангиогенеза после трансплантации ТИК

пищевода, привело к формированию определенной основы для разработок с целью создания функционирующего биоинженерного пищевода.

**Методология и методы исследования.** В ходе работы использовался комплексный анализ результатов морфологических исследований внеклеточного матрикса децеллюляризованного пищевода с оценкой эффективности статической рецеллюляризации и трансплантации полученных тканеинженерных конструкций. В соответствии с разработанным дизайном исследования проводились сбор и обработка данных. В работе были использованы экспериментальный, описательный, культуральный, морфологический, спектрофотометрический и статистический методы.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. При использовании модифицированного детергент-энзиматического способа децеллюляризации в пищеводе крысы не обнаруживаются иммуногенные структуры клеточных мембран (фактор Виллебранда, МНС I типа) и клеточные ядра, сохраняются белки внеклеточного матрикса (ламинин, коллаген IV типа, фибронектин), содержание ДНК снижается до 8 %.

2. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки обладают способностью к адгезии, сохранили жизнеспособность и метаболическую активность на полученном методом децеллюляризации биологическом каркасе пищевода крысы.

3. Процессы ангиогенеза активизировались после трансплантации тканеинженерной конструкции пищевода, что способствовало восстановлению кровоснабжения по всему объему тканей органа.

4. Тканеинженерная конструкция пищевода является биологически совместимой (отсутствует реакция отторжения трансплантата) и не оказывает токсического воздействия на организм животных.

**Степень достоверности и апробация работы.** Дизайн экспериментальных исследований с формированием необходимого количества групп животных обеспечивает достоверность проведенных исследований. В ходе работы были применены современное оборудование и современные технологии, а также проведена качественная статистическая оценка полученного материала.

Материалы диссертационной работы доложены на II международной конференции «Век регенеративной медицины» (Ставрополь, 2015), научно-практическом мероприятии «Медицинская наука и здравоохранение» (Краснодар, 2016), всероссийской конференции с международным участием «StemCellBio-2016: фундаментальная наука как основа клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 2016), форуме «Биомедицина» (Новосибирск, 2016), научно-практическом мероприятии «Эстафета вузовской науки – 2017» (Москва, 2017), III национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), международном форуме «Неделя науки» (Ставрополь, 2018).

**Внедрение результатов исследования в практику.** Основные результаты экспериментальных исследований применяются в научно-исследовательской и педагогической деятельности кафедры общей и клинической патологической физиологии, Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Разработанный автором протокол децеллюляризационной обработки пищевода используется в ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» министерства здравоохранения Краснодарского края, а также в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (г. Краснодар).

**Публикации результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 9 – в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.

**Личный вклад автора в исследование.** Диссертант участвовал в разработке дизайна исследования (85 %), провел анализ отечественной и зарубежной литературы по исследуемой теме. Автор проводил опыты на экспериментальных животных (крысы) по децеллюляризации пищеводов, гистологического и иммуногистохимического анализа образцов, в проведении количественного анализа уровня ДНК в тканях, рецеллюляризации ацеллюлярного пищевода матрикса. Соискателем лично выполнены статистический анализ полученных данных, сформирован текст диссертации, опубликован материал по исследуемой теме. Личный вклад диссертанта при получении результатов проведенных исследований составил 90 %, при подготовке публикаций – 75 %.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 121 странице. Работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы, практические рекомендации, список литературы (191 источник, из них на русском языке 57 и на иностранных языках 134). Диссертация содержит 4 таблицы и 29 рисунков.

## ГЛАВА 1.

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Перспективы использования методов регенеративной медицины при патологии пищевода

Значительную часть патологии пищевода составляют доброкачественные посттравматические стриктуры, а также стенозы в области анастомозов после реконструктивных операций. Реабилитация данного контингента больных является актуальной проблемой, так как пик заболеваемости приходится на трудоспособный возраст. К рубцовым стриктурам приводят химические ожоги и травмы пищевода, синдром Барретта, рефлюкс-эзофагит, некоторые инфекционных заболевания, эндоскопические и лучевых повреждения, склеродермия и др. Проблема лечения данного контингента больных до настоящего времени не решена в связи с тем, что существующие методики предполагают длительное лечение и его повторные курсы (В.Л. Белевич и др., 2012).

Рубцовые стриктуры пищевода являются трудно разрешимой проблемой в хирургии. Среди заболеваний пищевода рубцовые сужения занимают второе место у взрослых, а у детей – первое. Более 80 % больных с ожогами пищевода составляют люди молодого и трудоспособного возраста, причем, 55 % взрослых и 80 % детей получают химический ожог случайно. Исследования показали, что в мире уменьшается число больных с постожоговыми рубцовыми стриктурами пищевода, в то время как в России увеличивается количество случаев у детей, лиц молодого и трудоспособного возраста (А.В. Климашевич, 2012).

Исход в рубцовую стриктуру достигает 25 %, летальность больных с сужениями пищевода ожоговой этиологии составляет 6–14 %,

а инвалидизация с сопутствующей психологической травматизацией возникает у 18–32 %. Лечение таких пациентов связано с высокой травматичностью и осложнениями в виде несостоятельности швов и рубцовых сужений пищеводно-кишечных анастомозов (12–54,6 % и 9–19,6 % случаев) в послеоперационном периоде (Т.В. Скажутина и др., 2015).

При рубцовых стриктурах для восстановления проходимости пищевода применяются различные методы реканализации: бужирование по струне-направителю, бужирование по нити, электрорассечение, баллонная дилатация, эзофагопластика (В.Л. Белевич и др., 2012).

Одним из основных методов консервативного лечения рубцовых стриктур пищевода является бужирование. Основной проблемой послеоперационного периода, после таких методов лечения, является повторное стенозирование пищевода, выявляющееся у 25–40 % пациентов. В развитии данного процесса ключевую роль играют два фактора: образование дефектов в результате разрывов в области рубца (в частности после применения форсированных методик), последствия которых заживают через стадию фиброзирования, и развитие хронического воспаления в стенке пищевода (Т.В. Скажутина и др., 2015). Использование данного метода лечения сопряжено с высокой частотой рецидивов, а также развитием тяжелых осложнений, прежде всего перфорации пищевода при длительном бужировании (М.В. Хрусталева и др., 2013).

Несмотря на развитие современных малоинвазивных методов реканализации, проблема прогрессирования и рецидива эзофагеальных стриктур является актуальной и требует поиска нового высокоэффективного метода лечения (М.П. Королёв и др., 2012; А.В. Климашевич и др., 2014; Т.В. Скажутина и др., 2015).

Высокая распространенность рака пищевода также является актуальной проблемой. Ежегодно в мире более чем у 500 000 пациентов

диагностируется рак пищевода, а сложность диагностики данной патологии обуславливает появление запущенных форм и высокую летальность (J.V. Wheeler et al., 2012; G. Orlando et al., 2013). Хирургический метод является основным в лечении больных с данной патологией. Кроме того, реконструктивные операции на искусственном пищеводе необходимо проводить при незавершенной эзофагопластике, а также в случае дисфункции искусственного пищевода. Данные осложнения возникают в 18–55 % случаев после эзофагопластики. Высокая частота возникновений таких послеоперационных осложнений при реконструктивных оперативных вмешательствах привела к созданию концепции так называемых «болезней искусственного пищевода». Разрабатываются методы диагностики и хирургического лечения при возникновении патологии искусственного пищевода. Такими осложнениями являются язвы анастомоза и трансплантата, стенозы пищеводно- и желудочно-кишечного анастомоза, избыточная длина трансплантата, косметическом дефекте при проведении подкожной эзофагопластики. Данный контингент больных нуждается в диспансерном наблюдении на протяжении всей жизни, так как возможно возникновение и развитие в трансплантате, патологических процессов, возникающих в органе из которого сформирован искусственный пищевод (Ю.В. Чикинев и др., 2010). Все описанные проблемы и осложнения являются стимулом для создания новых разработок в данной области (Д.С. Мурашко, и др., 2011).

Особую сложность представляет восстановление непрерывности пищевода в тех случаях, когда исключается использование желудка. К данному контингенту относятся больные с раком желудка при высоком распространении процесса на пищевод, с множественными новообразованиями желудка и пищевода, с резецированным желудком, гастростомой, рубцовыми дефектами и т.д. (Л.А. Вашакмадзе и др., 2011).

Несмотря на определенные успехи, достигнутые при создании «искусственного пищевода», уровень ранних и поздних послеоперационных осложнений остается довольно высоким (В.И. Аверин и др., 2012).

Большое количество осложнений, как в ближайшем, так и в отдаленном периоде, при использовании различных методов реконструкции пищевода, говорит о том, что до настоящего времени не существует наиболее приемлемого метода пластики данного органа.

## **1.2. Тканевая инженерия как новый подход к лечению заболеваний пищевода**

Регенеративная медицина является направлением, основанным на применении клеточных механизмов пролиферации для восстановления нарушенных структур и функций тканей и органов. Она представляет собой основу медицины будущего, которая должна избавить человечество от различных патологических состояний и заболеваний (А.В. Васильев и др., 2010). Данная область науки является одной из наиболее высокотехнологичных и быстро развивающихся отраслей биомедицинской индустрии (С.С. Целуйко и др., 2016) и ее можно охарактеризовать как междисциплинарный вид научно-практической деятельности. Основной задачей регенеративной медицины является воссоздание структуры и максимально возможное восстановление функции различных органов. Для достижения этих целей могут быть использованы различные методы стимуляции дифференцировки и пролиферации клеток (А.Н. Лызиков и др., 2015).

В области регенеративной медицины существуют два направления. Первым направлением является клеточная терапия, в основе которой лежит стимуляция клеточной или тканевой регенерации с использованием различных методов трансплантации стволовых клеток. Кроме того, могут быть использованы их ассоциаты с соматическими клетками. Тканевая

инженерия, в свою очередь, направлена на восстановление структуры и функций путем трансплантации биоискусственных тканей и органов (В.И. Севастьянов, 2014).

Клеточная и тканевая инженерия являются современными подходами, последним достижением в области молекулярной и клеточной биологии и открывают возможности для создания эффективных биомедицинских технологий, для регенерации поврежденных тканей и органов. Кроме того, данные технологии могут быть использованы для лечения некоторых тяжелых заболеваний (С.С. Целуйко и др., 2016).

Тканевая инженерия является принципиально новым решением проблем в области восстановления тканей и трансплантации органов. Основная задача тканевой инженерии состоит в создании ТИК, которые могут стать альтернативой донорству в процессе восстановления функции органов и тканей (M. He et al., 2012; С.С. Целуйко и др., 2016). Это будет способствовать решению одной из основных проблем в области трансплантологии – необходимость длительного подбора донора и пожизненная иммуносупрессивная терапия. Наиболее важным элементом успеха следует считать наличие достаточного количества функционально активных клеток, способных дифференцироваться, поддерживать существование соответствующего фенотипа и выполнять конкретные биологические функции (С.С. Целуйко и др., 2016).

В области тканевой инженерии и создания биоинженерных конструкций имеется много проблем, требующих дальнейшего изучения. Одной из актуальных задач, требующих решения, является то, что ТИК, полученные методом тканевой инженерии, как правило, имеют большие размеры, значительно ограничивающие транспорт веществ и удаление продуктов обмена из тканей (С.С. Целуйко и др., 2016). В итоге недостаточная васкуляризация – становится одним из главных недостатков тканеинженерных конструкций.

### 1.3. Регуляция ангиогенеза

Ангиогенез можно описать как процесс формирования новых кровеносных сосудов, сопровождающийся миграцией и пролиферацией эндотелиоцитов, что в результате приводит к расширению и ремоделированию сосудистой сети (С.С. Целуйко и др., 2016). Процессы ангиогенеза стимулируются в разных ситуациях, в том числе при пересадке органов в результате трансформации сосудов за счет формирования коллатеральных путей кровотока. Ангиогенез является процессом, состоящим из определенных этапов. На первых этапах сосуды расширяются и одновременно происходят изменения в их стенке, что приводит к повышению проницаемости. Процесс ретракции эндотелиоцитов приводит к уменьшению плотности межклеточных контактов. На следующем этапе протеазы (MMPs) способствуют деградации базальной мембраны. При воздействии ангиогенных факторов эндотелиоциты мигрируют через дефекты в базальной мембране с последующей их активной пролиферацией. В результате описанных процессов происходит образование незрелых капиллярных структур и их дальнейшая стабилизация (С.С. Целуйко и др., 2016).

Метаболическая и биомеханическая регуляция ангиогенеза связана с выделением биологически активных веществ, которые оказывают влияние на рост сосудов. Она также зависит от изменения чувствительности эндотелиальных клеток к про- и антиангиогенным биологически активным веществам. Регуляция ангиогенных процессов различными факторами обеспечивает их четкую координацию в пространстве и времени, что необходимо для ремоделирования сосудистого русла в соответствии с потребностями тканей в кровоснабжении (М.О. Куртукова и др., 2015).

Различные стимуляторы и ингибиторы оказывают влияние на процессы ангиогенеза. В норме выработка тканевых ингибиторов ангиогенеза преобладает над продукцией индукторов. В результате ангиогенез

подавляется и всего лишь небольшая часть эндотелиоцитов имеют способность к пролиферации. Увеличение продукции стимуляторов при снижении выработки ингибиторов сопровождается стимуляцией ангиогенеза (М.В. Мнихович и др. 2013).

Основными медиаторами ангиогенеза являются: фактор роста фибробластов (FGF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ). Доказано ангиогенное действие ангиопоэтина (ANGPT-1,2), инсулиноподобного фактора роста (ИПФР-1,2), ангиогенина, интерлейкина-8, интерлейкина-6, фактора роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), пролиферина, лептина, NO, простагландинов, молекул клеточной адгезии (интегрины, селектины, суперсемейство иммуноглобулинов и кадгерины).

Главным стимулятором процессов ангиогенеза является снижение содержания кислорода в тканях, а эндотелиальные клетки являются мишенью. В результате гипоксии происходит активация семейства индуцируемых гипоксией транскрипционных факторов первого (HIF-1 $\alpha$ ) и второго типов (HIF-2 $\alpha$ ) (А. Ahluwalia, et al., 2012; Т. Hashimoto et al., 2015). Данные факторы индуцируют экспрессию ангиогенных факторов, прежде всего сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) (А.В. Воротников и др., 2012). Семейство VEGF представлено 6 ростовыми факторами: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-EG и PlGF. Из них 5 имеют аналогичные участки, а VEGF-EG (VEGF эндокринных желез, обнаруженный в надпочечниках и яичниках) относится к данному семейству благодаря физиологическому эффекту в виде активизации роста сосудов (А.В. Воротников и др., 2012). VEGF А является гепаринсвязывающим гликопротеином, который представлен 7 изоформами. Из четырех главных изоформ (VEGF121, VEGF165, VEGF189 и VEGF206) доминирующим видом

является VEGF165. Изоформы различаются степени их аффинности к гепарину. VEGF121 обладает низкой аффинностью к гепарину и является свободным растворимым белком. Обладая высокой аффинностью к гепарину, VEGF189 и VEGF206 связываются с внеклеточным матриксом. VEGF165 имеет определенную аффинность к гепарину, поэтому он встречается как в связанном, так и в свободном виде.

Наряду с факторами, оказывающими стимулирующее воздействие на ангиогенез, существует ряд биологически активных веществ, обладающих выраженным супрессорным влиянием. Наиболее изучены эндостатин (фрагмент коллагена XVIII) и ангиостатин (фрагмент плазминогена). К ингибиторам ангиогенеза относятся  $\gamma$ -интерферон, вазогибин-1 (VASH-1), тромбоспондины-1,2 (TSP-1,2), интерлейкин-4 и т.д. Физиологическая роль эндогенных ингибиторов пока недостаточно изучена.

Продукты гликолиза, в частности лактат, также являются стимуляторами ангиогенеза. Повышенное содержание лактата потенцирует активацию Tie-2 (рецепторов ANGPT) и VEGFR-2 (G.X. Ruan et al., 2013).

Для регуляции ангиогенеза важны и биомеханические факторы. Эндотелиальные клетки подвергаются различным механическим воздействиям, связанным с движением крови: напряжение сдвига, трансэндотелиальный ток жидкости, циклическая деформация и другие. Установлено, что изменение параметров гемодинамики может влиять на активность ангиогенных реакций эндотелиальных клеток (G. Chouinard-Pelletier et al., 2013; P.A. Galie et al., 2014). В настоящее время показано, что биомеханические факторы изменяют экспрессию генов и регулируют не только активность миграции, деления и апоптоза эндотелиоцитов, но и выработку ими ангиогенных факторов (М.О. Куртукова и др., 2015).

На процессы пролиферации и миграции эндотелиальных клеток влияет взаимодействие эндотелиоцитов с ВКМ. Компоненты ВКМ (коллаген, ламинин, фибронектин, энтактин) могут проявлять проангиогенные свойства (М.В. Мнихович и др., 2013).

Таким образом, процесс ангиогенеза регулируется сложной системой сигнальных механизмов, обеспечивающих смену периода ангиогенного покоя на активный ангиогенез. На количество сосудов и состояние сосудистой стенки в ткани оказывает влияние синтез факторов роста, одним из источников которых является микроокружение. При этом воздействие данных факторов должно быть правильно смоделировано в пространстве и времени.

#### **1.4. Стимуляция ангиогенеза в тканеинженерных конструкциях**

Успешное решение задач в области создания ТИК зависит от применения различных материалов с оптимальными свойствами. В роли каркаса могут быть выступать различные синтетические, природные и композитные материалы. При выборе наиболее оптимального материала и способов его получения необходимо учитывать структурные особенности каркаса, биологическая совместимость и время его деградации. Ключевую роль играет наличие в каркасе специфичных белков ВКМ, различных факторов роста и цитокинов, а также контролируемое их выделение, способствующее пролиферации и дифференцировке клеток. В настоящее время достигнут значительный прогресс в создании имплантируемых систем целенаправленной доставки определенных веществ и клеток в организм, но существуют определенные проблемы при создании биосовместимых материалов. Формирование самих ТИК также является нерешённой проблемой. Для решения всех этих задач необходимо использование разных технологий их изготовления, различающихся по принципу сборки составных частей и по масштабу создаваемых конструкций (Н.А. Онищенко и др., 2015).

ТИК, созданные на основе синтетического или биологического каркаса и аутологичных клеток, способны заменить отсутствующие или пораженные в результате патологии органы и ткани. Однако формирующаяся сосудистая

система в таком случае должна соответствовать определенным характеристикам. Одной из ключевых задач сосудистой сети такого типа является снабжение пролиферирующих клеток оптимальным количеством питательных веществ. Для решения данной задачи расстояние от клеток до сосудов не должно превышать 200 мкм. При минимальном давлении для достижения этого показателя необходимо формирование кровеносной системы в виде «сосудистого дерева», что подразумевает деление крупных сосудистых структур на более мелкие с формированием капилляров, которые способны кровоснабжать весь объем тканей. Сосудистая стенка должна выполнять роль барьера, который избирательно и дозированно регулирует поступление веществ и жидкости в окружающие ткани. Поэтому после имплантации должна быть обеспечена возможность «подключения» сформированной сосудистой сети к кровеносной системе в ткани пациента. Для такого «подключения», необходимо наличие сосудов диаметром в несколько сотен микрометров (J. Rouwkema et al., 2016).

При создании ТИК важно, прежде всего, качество сосудистых сетей: сосудистая сеть должна быть достаточно организованной и зрелой. Это необходимо для обеспечения перфузии необходимого количества крови по всей ткани (J. Rouwkema et al., 2016).

Альтернативным подходом для управления архитектурой сосудистого русла в ТИК может быть включение местных сигналов, влияющих на процессы создания и ремоделирования сосудистой сети. Активация местного микроокружения способствует созданию предсказуемой сосудистой системы. Данный подход является сложным, однако это будет способствовать усилению контроля над созданием сосудистых структур и обеспечит развитие процессов ремоделирования в долгосрочной перспективе. Прогнозирование и проектирование сосудистой сети – сложная задача из-за действия множества факторов внешней среды, участвующих в ремоделировании кровеносных сосудов (J. Rouwkema et al., 2016).

Процессы стимуляции ангиогенеза в синтетических каркасах играют важную роль в повышении их эффективности *in vitro*, а также *in vivo*. Хотя на сегодняшний день литературные данные о содержании в ткани ростового фактора и длительности его воздействия отсутствуют (Е.А. Великанова и др., 2014). Одним из вариантов решения долгосрочного поддержания высокого уровня VEGF может быть использование липосомальной формы данного фактора (Е.А. Великанова и др., 2014).

Использование каркасов, содержащих факторы роста, может обеспечить регуляцию локальной доставки различных биомолекул. Данные регуляторные факторы выделяются из каркаса после имплантации ТИК. Наиболее оптимальным биodeградируемым синтетическим материалом является поликапролактон (PCL). Его можно использовать в качестве материала для создания тканеинженерной сосудистой системы. Кроме того, поликапролактон может быть использован как материал, улучшающий васкуляризацию тканей и органов в зонах ишемии. Содержащие молекулы VEGF ТИК из поликапролактона, способны обеспечивать контролируемую доставку данного ростового фактора. Они могут быть использованы для стимуляции ангиогенеза при различной патологии. Матрицы, способные привлекать и активировать эндотелиоциты, могут быть использованы при создании тканеинженерных сосудистых каркасов (В.В. Севостьянова и др., 2013).

В исследованиях показано, что добавление в бесклеточные конструкции основного фактора роста фибробластов FGF2 и VEGF значительно ускоряет формирование сосудистой сети (В.В. Севостьянова и др., 2013).

При применении ростовых факторов для активации формирования сосудов в ТИК, существуют проблемы с моделированием во времени и пространстве большого количества привлеченных факторов (J. Rouwkema et al., 2016). Достаточные знания о медиаторах, регулирующих процессы ангиогенеза, позволят разрабатывать в дальнейшем способы воздействия на сосудистую сеть при создании ТИК пищевода.

Синтетические материалы, по сравнению с природными, имеют как преимущества, так и недостатки. Состав таких материалов известен, при этом они легко воспроизводимы (F.J. O'Brien et al., 2011; P. Kuppan et al., 2013; R. Dorati et al., 2014; E.J. Chung et al., 2015; E.M. Jeffries et al., 2015; Y. Luo et al., 2015; H. Ye et al., 2018; G. Jin et al., 2018; S. La Francesca et al., 2018; L. Parisi et al., 2018). Полипропилен, полиэфиры и полиуретаны были использованы для оптимизации регенерации мышечной ткани. Но, следует учитывать, что по сравнению с биологическими каркасами риск их бактериальной контаминации выше. Кроме того, они являются инородными телами и способны провоцировать воспалительную реакцию, препятствующую ремоделированию нарушенной структуры ткани. Такая реакция будет оказывать отрицательное воздействие на соседние нативные ткани (И.Н. Корсаков и др., 2017).

Более перспективными оказалось использование каналов, получаемых с помощью клеточных гидрогелей. В этом варианте эндотелиальные клетки могут прорасти в матрицу (J.S. Miller et al., 2012; Y. Zheng et al., 2012). Это обеспечивает дополнительное ремоделирование начальной структуры сосудистой сети. Многими исследованиями показано, что на структуру сосудистой системы оказывают влияние механические свойства матрикса, с которым контактируют эндотелиальные клетки (J. Rouwkema et al., 2016). Shamloo и Heilshorn (2010) показали, что ее механические свойства и плотность матрикса влияют на сами эндотелиоциты. Более того, данные параметры способны изменить реакцию на ангиогенные факторы роста, в частности на VEGF (A. Shamloo et al., 2010).

Сложные 3D-сосудистые сети могут быть получены и с помощью технологии биопринтинга (I.T. Ozbolat et al., 2013; G. Villar et al., 2013; E. Hoch et al., 2014; J.P. Jung et al., 2016; E. Garreta et al., 2017; E.J. Chung et al., 2018). Она позволяет поддерживать высокий уровень пространственного контроля при размещении клеточных структур (C. Norotte

et al., 2009; F. Pati et al., 2015), а также биоматериалов, содержащих клетки (L.E. Bertassoni et al., 2014).

Данная технология биопроизводства включает в себя использование мягких или твердых каркасов для обеспечения тканевой целостности. Созданный на компьютере графический дизайн органа воспроизводится специальными «биочернилами» путем трехмерной послойной печати. В результате создается функциональная копия живого органа. При использовании технологии биопринтинга важное значение имеет биологический материал (клетки), который используется для печати; методика печати (пространственное расположение биочернил); использование определенных подложек; компьютерное моделирование (проектирование) органа, а также последующая фабрикация созданной ткани (органа).

Сложности при создании тканей и органов с помощью биопечати являются общими для тканевой инженерии. Основной проблемой является обеспечение оптимальной васкуляризации. Основные сложности вызывает необходимость идеального подбора компонентов печатной системы, в частности материала и клеток. Кроме того время, необходимое для роста и созревания перфузируемой сосудистой сети по всему объему тканевой конструкции, может превышать период жизнеспособности клеток (А.В. Черных и др., 2017; S.V. Murphy et al., 2014).

### **1.5. Стволовые клетки, используемые в регенеративной медицине**

Создание ТИК кроме выбора вида каркаса (носителя) также сопряжено с трудностью подбора подходящей для рецеллюляризации клеточной линии. Кроме того, необходимо обеспечить адекватную васкуляризацию получаемых тканеинженерных органов, обеспечить сигналы, которые нужны для развития тканей (А.В. Черных и др., 2016).

Выделяют несколько типов стволовых клеток (СК) по способности к дифференцировке. Тотипотентные СК являются клетками, которые

обнаружены в самых первых пулах делений ранней бластоцисты. Кроме них, к данному типу клеток относятся оплодотворенная яйцеклетка, а также клетки 2–8 клеточного бластомера. Данные клетки способны дифференцироваться практически в любые типы клеток, в том числе экстраэмбриональную ткань (плацента). Плюрипотентных СК дают начало клеткам трех зародышевых листков (энтодерма, мезодерма и эктодерма), но данные клетки не участвуют в создании экстраэмбриональных тканей. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) не могут быть использованы из-за своей тератогенности. Кроме того, существует риск развития у реципиента нежелательных иммунологических проявлений. Индуцированные плюрипотентные СК (iPSC) получают путем «вынужденной» индукции транскрипции генов (перепрограммирования) соматических взрослых клеток. Для этого использовались трансформирующие факторы Sox2, Oct3/4, c-Myc, Klf4. Кроме данных факторов могут быть использованы легкие молекулы, белки и РНК и т.д. Таким образом, возможно получение специфических для определенного пациента плюрипотентные клетки, используя при этом дифференцированные. Считается, что такие клетки безопаснее ЭСК, обладая низкой туморогенностью, при этом имеют высокую степень дифференцировочного потенциала. К сожалению, существует проблема низкой частоты получения из дифференцированных соматических клеток iPSC. Большим недостатком iPSC также является их иммуногенность. В настоящее время iPSC и ЭСК проходят необходимые преклинические испытания и не применяются в клинической деятельности. Мультипотентные СК обладают способностью дифференцироваться в различные виды клеток в пределах зародышевого листка, образуя определенные ткани. Мезенхимные СК (МСК) являются мультипотентными и дифференцируются в хондроциты, остециты, фибробласты и адипоциты. Кроме того, при воздействии определенных ростовых факторов и регуляторных молекул они способны дифференцироваться в глиальные клетки, эндотелиоциты и миоциты. К полипотентным СК относятся различные виды клеток, которые образуют

определенный вид ткани. К данной группе можно отнести клетки эндокринного эпителия, а также гемопоэтические СК. Клетки-предшественники или прогениторные клетки относятся к унипотентным СК и дают начало только одному виду специализированных клеток. Они дают начало всего лишь одному виду клеток, при этом отличаются от специализированных клеток способностью к самовоспроизведению. Расположенные в определенных органах и тканях региональные СК обладают различной потентностью (эпидермальные, гемопоэтические, печеночные, нейральные и др.) (Л.В. Шалькевич и др., 2016).

В регенеративной медицине могут быть использованы зрелые (постнатальные) СК. Данные клетки обладают оптимальным пролиферативным и регенеративным потенциалом. ЭСК обладают пролиферативным потенциалом выше, чем СК взрослого человека. Однако из-за повышенной пролиферативной способности и плюрипотентности ЭСК необходимо контролировать процессы протекающие в ТИК после пересадки. Это обусловлено высокой иммуногенностью и потенциальной канцерогенностью данного типа клеток. Кроме того, существуют этические проблемы при использовании ЭСК в терапевтических целях. Таким образом, наиболее оптимальным является использование зрелых СК, с возможностью использования аутогенного клеточного материала. При их применении отсутствуют этические сложности и проблемы связанные с иммунологической несовместимостью. Использование ЭСК в качестве аутогенного материала ограничивается тем, что эксплантация их из эмбриона приводит его гибели. Преимуществом МСК, считается низкая иммуногенность, с возможностью трансплантации клеточного материала от неродственного донора без последующей иммуносупрессивной терапии. Кроме того, следует учитывать, что МСК обладают достаточно выраженными иммуносупрессивными свойствами против клеток иммунной системы, что позволяет использовать данные клетки для лечения больных с

выраженной реакцией отторжения трансплантата (А.Н. Лызиков и др., 2015; Н. Yagi et al., 2010; G. Moll et al., 2011; S.A. Jacobs et al., 2013).

Комитет мезенхимных и тканевых стволовых клеток Международного общества клеточной терапии установил критерии определения МСК:

- МСК обладают адгезией к пластику;
- МСК экспрессируют маркеры дифференцировки CD105, CD73, CD90;
- МСК экспрессируют CD34, CD45, CD19, CD14, CD79a, CD11b и HLA-DR;
- МСК дифференцируются *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты (Е.Ю. Закирова и др., 2014).

Впервые МСК были описаны как фибробластоподобные структуры костного мозга, которые способны прилипать к поверхности пластиковых сосудов *in vitro*, в виде отдельных колоний расти при жидком расewe и дифференцироваться в клетки костной, хрящевой и жировой тканей. Позднее было установлено, что МСК способны дифференцироваться в эндотелиоциты, кардиомиоциты, нейроны и астроциты. Основным источником материала для исследований является костный мозг человека и лабораторных животных. В последнее время часто используемым источником МСК является висцеральная или подкожная жировая ткань. МСК содержатся практически в любой ткани взрослого организма и могут быть выделены из плаценты, плацентарной крови, соединительной ткани и сосудов пупочного канатика (В.Б. Климович, 2014). Показано, что МСК продуцируют ангиогенные и нейротрофные факторы роста, в том числе фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), ангиопоэтин (Ang), фактор роста гепатоцитов (HGF), нейротрофный фактор головного мозга (BDNF), нейротрофный фактор глиальных клеток (GDNF) и фактор роста нервов (NGF) (К. Rubina et al., 2009; F. Rastegar et al., 2010; Т. Lopatina et al., 2011; S.M. Rankin, 2012; M.B. Murphy et al., 2013;

R.R. Sharma et al., 2014; M. Mueller et al., 2016). При этом продуцируемые МСК ангиогенные факторы роста стимулируют пролиферацию эндотелиоцитов, их миграцию и формирование сосудистой сети (Н.И. Калинина и др., 2011; A.J. Melchiorri et al., 2014; M. Gelinsky et al., 2015; J.D. Anderson et al., 2016).

МСК могут дифференцироваться в гладкомышечные клетки (ГМК) и перициты и, таким образом, участвовать в процессе стабилизации сосудистой стенки. Важным механизмом влияния МСК является паракринный эффект, заключающийся в способности секретировать широкий спектр ангиогенных факторов (FGF, Ang1, интерлейкины, протеазы и др.). При этом МСК способны создавать специфическое микроокружение за счет противовоспалительных и проангиогенных факторов (A.I. Caplan et al., 2011; K.S. Park et al., 2010; K. Bieback et al., 2012; A. Sohni et al., 2013; S. Bartaula-Brevik et al., 2016; Y.C. Huang et al., 2013). При совместном культивировании МСК и эндотелиоцитов стабилизируются сосудоподобные структуры, образованные эндотелиальными клетками. У пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) в сочетании с сахарным диабетом и ожирением, происходит существенное снижение пролиферативной активности МСК по сравнению со здоровыми донорами (К.А. Хмельницкая и др., 2015).

Муральные клетки принимают участие в регуляции проницаемости сосудистой стенки и снижении давления интерстициальной жидкости, способствуя стабилизации тканевых сосудов (S. Goel et al., 2011).

Гипоксическое прекондиционирование вызывает усиление экспрессии HIF- $\alpha$ , а также Ang1, участвующих в ангиогенезе (Л.Н. Маслов и др., 2013).

Известны также исследования, по созданию клеточных пластов из такого материала как МСК жировой ткани, а также исследованию их ангиогенного эффекта. Предполагается, что трансплантации МСК жировой ткани способствуют восстановлению кровотока в ишемизированной ткани

определенными механизмами. Во-первых, данные клетки секретируют ангиогенные факторы роста, в том числе VEGF, bFGF и HGF, способствуя тем самым миграции и пролиферации эндотелиоцитов и их предшественников, а также формированию новой сосудистой сети. Во-вторых, МСК жировой ткани способны дифференцироваться в ГМК и эндотелиоциты растущих сосудов выполняя функцию перицитов и стабилизируя сосудистую стенку (А.Ю. Ефименко и др., 2011; Z. Shi et al., 2014; Т.Т.У. Nan et al., 2015; R.I.I. Stone et al., 2018).

Клеточные пласты являются ТИК, состоящими из клеток и выработанного ими внеклеточного матрикса. Наличие ВКМ синтезированного клетками, содержащего ростовые факторы и другие цитокины, является фактором, способствующим повышению выживаемости клеток и обеспечивающим высокую эффективность в процессе формирования клеточных пластов. Таким образом, наличие в составе клеточного пласта синтезированного ВКМ может способствовать стимуляции регенеративных процессов (П.И. Макаревич и др., 2015; В.S. Kim et al., 2012; Q. Xing et al., 2014). Исследования показали, что возраст организма – источника МСК жировой ткани, оказывает значительное влияние на экспрессию и продукцию факторов, участвующих в регуляции процессов ангиогенеза. В процессе старения снижается способность МСК жировой ткани стимулировать ангиогенез в результате подавления экспрессии ангиогенных факторов (А.Ю. Ефименко и др., 2011).

### **1.6. Децеллюляризация как способ получения биологического каркаса для тканевой инженерии пищевода**

Для создания тканеинженерных органов наиболее перспективным является применение тканеспецифичных каркасов. В связи с этим ведется поиск биосовместимых материалов, которые способны обеспечить

механическую стабильность на уровне органа, не препятствуя при этом пролиферации и дифференцировке клеток. Данный подход предполагает использовать внеклеточные матриксы в качестве сложных комплексов, состоящих из множества полисахаридов, протеинов, гликопротеидов и протеогликанов. Интегрины способствуют адгезии клеток к ВКМ, способствуя поддержке тканевой архитектуры *in vivo*. Взаимосвязь специфических клеточных рецепторов и молекул ВКМ способна напрямую активировать внутриклеточные сигнальные пути (А.В. Черных и др., 2017; S. Murphy et al., 2013; J.E. Arenas-Herrera et al., 2013; J.P. Guyette et al., 2014; M.L. Lim et al., 2013; Y. Li et al., 2015; M.E. Scarritt et al., 2015).

Существует гипотеза, согласно которой с помощью технологий тканевой инженерии возможно создание адаптивного, аутологичного и функционально настраиваемого органа способного к росту. Суть данной гипотезы заключается в использовании децеллюляризированных матриксов, которые должны обладать значительно сниженной иммуногенностью и быть идеальными для репопуляции каркаса клетками реципиента для создания живой аутологичной ткани (А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова, 2013).

В состав биологических каркасов, полученных методом децеллюляризации, входят компоненты ВКМ, такие как коллаген, фибронектин, эластин, ламинин. Кроме того, в них обнаруживаются различные ростовые факторы (VEGF, FGF, TGF- $\beta$  и др.). Такие ТИК способны воспроизводить биологические и механические свойства исходного ВКМ и сохранить архитектуру нативной ткани. Кроме того, сохраняется определенное микроокружение, которое оказывает влияние на адгезию, пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток (J.J. Song et al., 2011; R.W. Bonvillain et al., 2012; S.E. Gilpin et al., 2014; K.S. Chian et al., 2015; A. Peloso et al., 2015; T.J. Keane et al., 2015; H. Hrebikova et al., 2015; E. Lee et al., 2017).

ВКМ волокнистой рыхлой соединительной ткани представлено различными волокнами и аморфным веществом. Оно является результатом жизнедеятельности клеток определенной ткани, в частности фибробластов. Состав и структура ВКМ в определенной ткани являются высокоспецифическими и определяют ее функциональные свойства, но структура и состав определенного белка ВКМ у различных видов млекопитающих остаются неизменными. Структурные и функциональные молекулы ВКМ относятся к белкам аминокислотный состав которых имеет незначительную вариабельность у разных видов. Вероятно, именно с этим связано отсутствие признаков реакции отторжения после ксенотрансплантации. Отсутствие клеточного компонента органа является важным и достаточным условием для предупреждения иммунного ответа на ксенотрансплантат. Связано это с тем, что именно клеточные элементы ксенографта являются причиной развития реакции отторжения трансплантата (А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова, 2013).

В плане снижения иммуногенности трансплантата децеллюляризация является перспективным методом, так как при данном процессе происходит удаление вместе с клеточными элементами максимального количества антигенов (А.С. Сотниченко и др., 2013). Процесс децеллюляризации снижает выраженность реакции воспаления после имплантации ТИК в результате сниженного содержания человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) (M. Ozeki et al., 2006; J.M. Fishman et al., 2012; G. Totonelli et al., 2012; J.Y. Tan et al., 2012; M.L. Wong et al., 2014). При обеспечении оптимального удаления клеточных антигенов, ответственных за иммунологическое отторжение, полученный бесклеточный каркас, при условии минимального повреждения ВКМ, может стать источником различных факторов, которые в дальнейшем будут способствовать конструктивному ремоделированию поврежденных тканей. Данный процесс приводит к тому, что каркас ВКМ участвует в процессе формирования в месте имплантации участка

соответствующей ткани (А.С. Сотниченко и др., 2013; K.S. Dua et al., 2016). Полученные биологические каркасы должны создавать микроокружение для культивируемых клеток, близкое к естественному, но при этом не должны содержать остатков химических детергентов, которыми они обрабатывались, а также продуктов деградации клеток (А.В. Черных и др., 2016; О.И. Агапова и др., 2015; F.A. Sheikh, 2015).

Клетки и ВКМ в ткани существуют в состоянии «динамического равновесия», при котором сигналы из ВКМ регулируют клеточные процессы, а клетки, в свою очередь, изменяют организацию и состав ВКМ. ВКМ участвует в формировании ниш для стволовых клеток, со специфичным микроокружением, необходимым для сохранения пула стволовых клеток. Данные «ниши» обнаружены практически во всех органах у взрослых людей. В состав данных образований входит гликозаминогликан гепарансульфат. Молекулы интегринов регулируют пролиферацию СК и способность их мигрировать из «ниши» (Т.Г. Рукша и др., 2013).

Молекулы ВКМ способны взаимодействовать с ростовыми факторами. ВКМ может сорбировать факторы роста, которые могут сохраняться в децеллюляризованном матриксе в зависимости от метода воздействия на исходный материал. Продукты деградации ВКМ оказывают хемоаттрактантный и митогенный эффект на прогениторные клетки мышечной ткани (И.Н. Корсаков и др., 2017; P.E. Bourguine et al., 2013; V.N. Brown et al., 2014). VEGF и FGF способны связываться с гепарансульфатом, выступающим в качестве их «резервуара» и посредника в передаче определенных сигналов. Факторы роста, совместно с матриксными металлопротеиназами, способны регулировать состояние ВКМ: факторы роста активируют местную продукцию компонентов ВКМ, а матриксные металлопротеиназы участвуют в их деградации, тем самым обеспечивая существование и передвижение клеток (Т.Г. Рукша и др., 2013). Именно поэтому важен подбор наиболее оптимального протокола децеллюляризации, способствующего максимальному сохранению состава и структуры ВКМ.

Орган, подвергающийся децеллюляризации, обладая низкой иммуногенностью, может быть как аутогенного или аллогенного происхождения. Основным процессом при децеллюляризации является оптимальное удаление клеточных компонентов ткани с донорского биологического матрикса. Для достижения этой цели децеллюляризация может проводиться в несколько этапов, которые затем обозначаются как «протокол децеллюляризации» (А.В. Черных и др., 2017). При этом стоит учитывать, что полное удаление клеточного компонента органа может привести к значительному нарушению состава и структуры ВКМ.

Для децеллюляризации тканей и органов используются различные методы. Из физических методов наиболее распространены механическая, ультразвуковая обработка и процесс замораживания-оттаивания. Для ферментативного воздействия на ткани могут быть использованы экзонуклеазы, эндонуклеазы и трипсин. В качестве детергентов при химической децеллюляризации применяются растворы кислот и щелочей, гипотонические и гипертонические растворы разных концентраций, неионные и ионные детергенты. Эффективность процесса децеллюляризации обработки органов со сложной структурой можно повысить путем сочетания различных детергентов. Использование определенного метода децеллюляризации обработки, а также подбор конкретного детергента зависят от свойств и структуры определенной ткани и органа. Кроме того, следует учитывать анатомо-гистологические особенности материала для выбора оптимального времени воздействия детергентов. Неверно подобранный детергент может способствовать повреждению ВКМ, что, в свою очередь, нарушит его механические и биологические свойства. Но следует помнить, что практически любое химическое вещество оказывает негативное влияние на ВКМ, и речь идет только о минимализации повреждающего воздействия. После децеллюляризации обработки детергенты должны максимально

элиминироваться. Остаточные количества детергента могут повысить цитотоксичность каркаса в отношении нанесенных на него клеток. Кроме того, это может способствовать развитию воспалительной реакции после трансплантации ТИК. Такие биологические матриксы способны оказывать стимулирующее воздействие на пролиферацию насенных на них клеток и способствовать ремоделированию тканей. Для этого остатки химических веществ и продукты распада клеток должны быть удалены из каркаса. От использования высокоспецифичных для определенной ткани способов обработки исходного материала зависит успешное терапевтическое применение в качестве биологических матриксов децеллюляризированных органов. Все это говорит о важности разработки наиболее оптимального протокола децеллюляризационной обработки материала, который оказывает минимальное повреждающее воздействие в пределах родственных видов тканей (Е.А. Губарева и др., 2012; Т. Hoshiba et al., 2010; S. Mathapati et al., 2010; Т. W. Gilbert, 2012).

Существуют объективные и общепринятые критерии контроля качества децеллюляризации тканей (Р.М. Сгаро et al., 2011). Одним из условий является отсутствие клеточных ядер при гистологической окраске гематоксилин-эозином. Ядра клеток также не должны выявляться при окрашивании флуорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI. При этом содержание ДНК должно быть не более 50 нг/мг в сухой ткани биологического материала. Кроме того, в тканях должны отсутствовать фрагменты ДНК размерами более 200 нуклеотидных пар.

Описанные критерии фактически определяют не децеллюляризацию, а степень денуклеаризации тканей. Однако, несмотря на это, количество содержащейся ДНК используется в качестве показателя содержания остальных внутриклеточных или мембранных молекул, что говорит об наиболее эффективном удалении клеточных элементов (Т. W. Gilbert et al., 2012).

Описанные ТИК обладают преимуществами в сравнении с синтетическими каркасами, которые, потенциально, могут стать источниками различных токсичных продуктов биodeградации, вызывающих воспалительную реакцию. Благодаря своим преимуществам, каркасы, полученные методом децеллюляризации, являются наиболее перспективными при создании тканеинженерных органов (G. Totonelli et al., 2012; M.T. Wolf et al., 2012; T. Kawasaki et al., 2015; V. Chan et al., 2015; L.E. Fitzpatrick et al., 2015; L. Edgar et al., 2016; L. Urbani et al., 2017; G. Luc et al., 2018).

A.D. Hofmann и соавт. (2015) предложили для создания тканеинженерной конструкции пищевода использовать в качестве биологического каркаса децеллюляризованный участок кишечника крысы. В качестве детергентов авторы использовали додецилсульфат натрия, дезоксихолат натрия и ДНКазу. В децеллюляризованном кишечнике отсутствовали клеточные компоненты, а содержание ДНК было снижено на 99 %. Однако следует учитывать, что стремление к практически полному удалению клеточного компонента органа может привести к нарушению структуры и состава ВКМ.

R. Askbar и соавт. (2012) приводят данные об использовании додецилсульфата натрия для децеллюляризации пищеводов овец. Морфологический анализ показал, что данный детергент способствует высокоэффективному удалению клеточного компонента органа и сохранению структуры коллагеновых волокон.

В работе O. Syed и соавт. (2014) показано, что использование в качестве детергента дезоксихолата натрия при создании тканеинженерной конструкции является более предпочтительным, так как происходит эффективное удаление клеточных структур, а полученный биологический каркас обладает низкой цитотоксичностью.

G. Totonelli и соавт. (2013) применяли перфузионный метод децеллюляризации пищевода с использованием дезоксихолата натрия и

ДНКазы. Изучение полученного каркаса с помощью сканирующей электронной микроскопии показало, что после 3 циклов обработки внеклеточный матрикс сохранял свою структуру.

Для децеллюляризации органов и тканей широко применяется раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Данный раствор позволяет свести к минимуму повреждение ВКМ в процессе децеллюляризации, что, в свою очередь, позволяет снизить степень дегенерации вследствие кальцификации. ЭДТА является хелатом и способен связывать ионы кальция. В результате этого нарушается взаимодействие между кадгеринами, что приводит к диссоциации клеток и ослабляет физическое соединение клеток в единую ткань. Высокие концентрации ЭДТА способны активировать процесс апоптоза. ЭДТА является хелатором ионов металлов, используется для снижения накопления фосфатов и кальция в митохондриях. Описанные процессы приводят к клеточной гибели. Данный способ децеллюляризации не позволяет полностью удалить клетки из толщи биологического каркаса. Это может быть следствием отрицательного хемотаксиса, в результате чего клетки способны мигрировать с наружных слоев обрабатываемой ткани в более глубокие слои. Данный метод децеллюляризации приводит к апоптотической гибели клеток донора в органе (А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова, 2013).

В качестве основных методик определения качества полученного биологического каркаса используются окрашивание гематоксилином и эозином, флуорофором DAPI, количественное определение содержания ДНК и сканирующая электронная микроскопия. На следующем этапе проводится расширенный иммуногистохимический анализ с определением мембранных (MHC I, фактор Виллебранда) молекул, обладающих антигенной активностью. Далее проводится качественный и количественный иммуногистохимический анализ структурных белков ВКМ и факторов роста, которые не обладают видовой специфичностью и иммуногенностью (А.С. Сотниченко и др., 2017).

Для оценки состояния структуры биологического каркаса пищевода можно использовать фазово-контрастную рентгеновскую компьютерную томографию. Высокое качество изображений, получаемых при использовании данного метода визуализации, позволяет оценить анатомо-гистологические особенности децеллюляризованного пищевода. Преимуществом данного метода является возможность изучения структуры тканеинженерной конструкции пищевода в динамике после трансплантации (С.К. Hagen et al., 2015).

В ТИК после трансплантации мигрируют клетки реципиента. Макрофаги используют различные протеазы в процессе биодеградации биологического каркаса, что сопровождается выделением биологически активных веществ (И.Н. Корсаков и др., 2017). После трансплантации каркасы подвергаются резорбции, одновременно замещаясь элементами ВКМ, которые синтезируются пересаженными клетками. При этом необходимо обеспечить полную биосовместимость и биодеграцию биологических каркасов, которые будут принимать участие в дальнейших процессах пролиферации и дифференцировки клеток, как и нативные ВКМ (А.В. Черных и др., 2016). Форма каркаса создает необходимое микроокружение для адгезии, пролиферации, дифференцировки и миграции культивируемых клеток через матрицу каркаса. Оптимальный рост и развитие клеток имеют место, когда характер микроокружения приближен к интерстициальным структурам естественных органов (А.В. Черных и др., 2017).

Исследования R.G. Spurrer и соавторов (2014) показали наличие пролиферации и дифференцировки клеток эпителия, мышц и нервов в тканеинженерных конструкциях пищевода, имплантированных иммунодефицитным мышам (R.G. Spurrer et al., 2014).

Показано, что МСК костного мозга способствуют эпителизации, реваскуляризации и мышечной регенерации тканеинженерной конструкции пищевода на основе биологического каркаса, полученного методом децеллюляризации (В. Tan et al., 2013).

На модели свиньи была показана полная эпителизация тканеинженерной конструкции пищевода на основе ацеллюлярного матрикса из подслизистой основы тонкого кишечника (SIS) и МСК костного мозга. В группе животных, которым был имплантирован ацеллюлярный матрикс без последующей рецеллюляризации МСК, признаки эпителизации каркаса отсутствовали (J. Catry et al., 2017).

Исследования показали, что МСК жировой ткани и гладкомышечные клетки, полученные из аорты человека, способны к адгезии и пролиферации на ацеллюлярном каркасе пищевода. Это указывает на то, что МСК жировой ткани способны заменить клетки гладкой мускулатуры при создании тканеинженерного пищевода (F. Wang et al., 2018).

Одним из эффективных методов пластики пищевода у пациентов с рубцовыми стриктурами является использование так называемых «патчей» (T. Ohki et al., 2015; R. Dorati et al., 2017; H. Okuyama et al., 2018). Эзофагопластика с использованием небольших тканеинженерных конструкций на основе ацеллюлярного матрикса мочевого пузыря свиньи показала, что через 2 месяца после имплантации происходит полная эпителизация биологического каркаса с восстановлением слизистой оболочки пищевода (S.F. Badylak et al., 2011; A. Nieponice et al., 2014). На модели кролика была показана полная регенерация частичного дефекта шейного отдела пищевода при использовании тканеинженерной конструкции на основе синтетического каркаса и МСК костного мозга. Морфологический анализ показал наличие регенерирующего эпителия слизистой оболочки и гладкомышечных клеток в тканеинженерной конструкции пищевода (S.Y. Park et al., 2016).

При участии и активном взаимодействии нескольких видов клеток сосудистой стенки (прогениторные МСК и циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток (ПЭК), эндотелиоциты) могут протекать процессы неоваскуляризации ишемизированных тканей. При

гипоксии за счет повышения в тканях экспрессии и секреции ангиогенных факторов, прежде всего VEGF, усиливается пролиферация эндотелиоцитов. Взаимодействие VEGF с его рецепторами, селективно экспрессированными на эндотелиоцитах, активирует экспрессию протеаз в них, что приводит к разрушению межклеточных контактов и деградации базальной мембраны, при этом клетки начинают делиться и мигрировать в ишемизированную ткань. Этих основные процессы запускают ангиогенез при ишемии (К.А. Хмельницкая и др., 2015).

Успешная регенерация тканей, в частности пищевода, требует интеграции трех компонентов так называемой «тканеинженерной триады», включающей каркас, клетки и факторы роста. Различные сигналы, такие как топографические (характер каркаса, геометрия и структура поверхности), механические (напряжение сдвига и одноосное или двухосное механическое растяжение), химические (химический состав каркаса) и биологические (факторы роста, цитокины), определяют регенераторный потенциал клеток, который необходим для формирования функционирующего тканеинженерного пищевода. Полная эпителизация, сохранение паракринной связи между гладкими миоцитами и фибробластами являются важными элементами в процессе создания функционирующего тканеинженерного пищевода (R. Askbar et al., 2012; P. Kurpan et al., 2012; N. Kanai et al., 2014).

Рассмотренные методы являются наиболее перспективными для дальнейшего развития тканевой инженерии пищевода, однако требуют постоянного совершенствования.

Анализ современной научной литературы показал, что особенности кровоснабжения органа является большой проблемой для тканевой инженерии пищевода. В ТИК пищевода после имплантации требуется наличие сформированной сети кровеносных сосудов, которая способна обеспечивать клетки питательными веществами, что в дальнейшем должно привести к быстрой регенерации тканей. Толщина ткани является ключевым

фактором определяющим продолжительность ее полной васкуляризации (J. Rouwkema et al., 2016). Различные сигналы (топографические, химические, биологические и механические) влияют на формирование функционирующего тканеинженерного пищевода. Также важно для регенерации пищевода контролируемое высвобождение факторов роста в тканеинженерной конструкции. Факторы роста способствуют клеточной адгезии, миграции, пролиферации, а также стимулируют ангиогенез в тканеинженерном пищеводе (T. Poghosyan et al., 2011). Ангиогенез является существенным фактором, необходимым для восстановления функций пищевода. Однако данные аспекты недостаточно изучены в связи с высоким уровнем сложности и рассматриваются как перспективные с точки зрения дальнейшего развития регенеративной инженерии.

Таким образом, запуск механизмов ангиогенеза, при создании тканеинженерных конструкций пищевода, остается нерешенной проблемой. Понимание механизмов взаимодействия биохимических и молекулярных факторов, контролирующих ангиогенез, является фундаментальным при трансплантации тканеинженерных конструкций (С.С. Исакова и др., 2014). Существуют определенные успехи в вопросе изучения механизмов ангиогенеза в условиях ишемии, а также разработаны эффективные методы его стимуляции (механизмы естественной реакции на гипоперфузию тканей). Несмотря на все это, существуют определенные проблемы при практическом применении знаний для оптимизации метаболических процессов в органах и тканях в процессе разработки ТИК (Л.М. Непомнящих и др., 2010; М.Г. Шурыгин и др., 2010).

В современной научной литературе механизмы восстановления сосудистой сети после трансплантации тканеинженерных конструкций пищевода недостаточно исследованы. Кроме того, не оценено влияние результатов децеллюляризации на проангиогенные свойства тканеинженерной конструкции пищевода. Результаты исследований в

области тканевой инженерии пищевода, посвященные выбору метода децеллюляризации, сведены к подбору времени и порядка воздействия растворов на орган. Модификация протоколов децеллюляризации пищевода ограничена, либо сокращением общей продолжительности протокола за счет выбора более жестких параметров децеллюляризации, что приводит к ухудшению биомеханических свойств биологического каркаса, либо к максимальным сохранением свойств нативной ткани, путем подбора более щадящих параметров обработки биологического материала, что неизбежно приводит увеличению продолжительности процесса децеллюляризации и риску бактериальной контаминации каркаса. Однако, необходимо отметить, что характер протокола децеллюляризации пищевода влияет не только на биомеханические свойства материала, но и на скорость последующей биодеградации, а также проангиогенные свойства биологического каркаса. Выбор наиболее оптимальных способов стимуляции ангиогенеза и подбор оптимального протокола децеллюляризации должны способствовать решению ряда проблем в области тканевой инженерии пищевода и создания биоинженерных материалов в целом.

## ГЛАВА 2.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); Principles on Good Laboratory Practice (OECD, ENV/MC/СUEM (98)17, 1997); ГОСТ 33044-2014 и Приказом 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04.2016; «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Часть первая – М. : Гриф и К, 2013). Исследования проводились в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины на базе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Животные случайным были разделены на 3 группы. Животные 1 группы ( $n = 20$ ) использовались для отработки протокола децеллюляризационной обработки пищевода. Животным из 2 группы ( $n = 30$ ) проводились оперативные вмешательства с имплантацией подкожных образцов. Животным из 3 группы ( $n = 30$ ) проводились имплантации образцов в область брюшной части пищевода (без вскрытия просвета). Кроме этого проводились имплантации децеллюляризованного ( $n = 10$ ), рецеллюляризованного ( $n = 10$ ) и нативного ( $n = 10$ ) пищевода животным из 2 и 3 группы.

#### 2.1. Эксплантация органов

При эвтаназии животных интраперитонеально вводили летальную дозу (150 мг/кг) барбитуратов. Органокomплекс выделяли единым блоком, далее проводили диссекцию пищевода. Проксимальная часть пищевода отсекалась как можно ближе к глотке, а дистальная – ближе к пищеводно-желудочному соединению. При этом выделялся участок пищевода наибольшей длины. Для

фиксации в биореакторе (Harvard Apparatus, Массачусетс, США) пищевод канюлировали сосудистыми катетерами.

## **2.2. Децеллюляризация пищевода**

Оригинальный протокол децеллюляризационной обработки тонкого кишечника свиньи детергент-энзиматическим методом (O. Syed et al., 2014) был модифицирован. Изменены состав, время экспозиции и последовательность промывки децеллюляризирующими растворами. На первом этапе промывали пищевод раствором фосфатного буфера с добавлением 1 % раствора пенициллина-стрептомицина. После этого пищевод промывали раствором деионизированной воды в течение 1 ч. На следующем этапе был использован раствор 4 % дезоксихолата натрия, после предварительного добавления в него 800 мкл ЭДТА (3 ч). Остатки детергента удаляли в течение 10 мин с использованием раствора фосфатного буфера. Для ферментативной обработки в фосфатный буфер добавляли 2000 ЕД/мг свиной панкреатической ДНКазы-I и промывали пищевод в течение 1 часа. На заключительном этапе пищевод промывали раствором фосфатного буфера с добавлением 1 % раствора пенициллина-стрептомицина в течение 24 ч. Все использованные в процессе децеллюляризационной обработки пищевода растворы были стерильными, комнатной температуры. Растворы в биореактор подавались со скоростью 6 мл/мин.

## **2.3. Морфологический анализ**

Образцы пищеводов помещали в 10 % раствор формалина. После проведения процесса дегидратации (Leica TP1020 (Германия), препараты заключали в парафин с помощью установки EG1150H (Leica, Германия). На ротационном микротоме RM2235 (Leica, Германия) получали парафиновые

срезы образцов (5 мкм). Далее последовательно проводили процессы депарафинизации, гидратации, гистологической окраски такими красителями как гематоксилин и эозин (Histolab, Швеция), а также, для проведения иммунофлуоресцентной микроскопии, флуорофором (4',6-диамидино-2-фени-линдола) DAPI (Sigma Aldrich, США). Качественная оценка компонентов ВКМ была проведена с использованием окрашивания образцов пикрофуксином по Ван Гизону (Первая лабораторная компания, Санкт-Петербург). Оценку эластических свойств полученного после децеллюляризации биологического каркаса проводили путем сравнения площади просвета органа до и после децеллюляризационной обработки согласно разработанному протоколу. Для этого были использованы микрофотографии поперечных срезов пищевода (микроскоп Olympus BX51 (Япония)). Для решения данной задачи был использован метод подсчета количества пикселей области просвета пищевода. Полученное число переводили в мм<sup>2</sup>, учитывая коэффициент пропорциональности для данного вида микроскопа.

#### **2.4. Количественное определение содержания ДНК**

С помощью набора реактивов DneasyBlood and Tissue Kit (Швеция) проводилась количественная оценка остаточной ДНК в децеллюляризованном и нативном пищеводах. Для спектрофотометрической оценки образцов использовали аппарат NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США)

После обработки 30 % этанолом образцы пищевода вносили в пробирки типа Эппендорф, добавляли 180 мкл лизирующего ALT буфера и 20 мкл протеиназы К. Полученные образцы смешивали в течение 15 с на вортекс-миксере и помещали в термостат на ночь. Температуру в термостате устанавливали + 57 °С. Через 12 ч. в пробирки с образцами были добавлены

200 мкл 100 % этанола и 200 мкл AL буфера. Полученные образцы перемешивали в течение 15 с. Затем образцы помещались в центрифугу (8000 rpm) на 1 мин. После извлечения из центрифуги дополнительно вносили 500 мкл AW1 буфера и еще раз центрифугировали при таких же параметрах. Далее вносили 500 мкл AW2 буфера и при 14000 rpm центрифугировали уже 3 мин. На заключительном этапе вносили в пробирки 200 мкл AE буфера и помещались в центрифугу (8000 rpm) на 1 мин. Полученные образцы были исследованы на спектрофотометре.

## **2.5. Иммуногистохимический анализ**

Для проведения иммуногистохимического анализа образцов срезы подвергались депарафинизации и гидратиротации. С помощью 3 % раствора пероксида водорода проводили блокировку эндогенной пероксидазной активности. Далее следовал процесс демаскировки антигенов в реактиве Access Rodent (Menarino diagnostics, Италия), который проводили на водяной бане примерно 40 минут. Далее следовал процесс блокировки неспецифического связывания антител с использованием реактива Rat Background Block (Menarino diagnostics, Италия). Данный процесс проводился в течение 30 мин. Затем добавляли первичные антитела и помещали образцы в холодильник (4 °C) (таблица 2.1). Через сутки образцы отмывали фосфатным буфером, добавляли антиполивалентные биотинилированные козьи антитела. Далее отмывали фосфатным буфером и вносили стрептавидин пероксидазу, оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Далее следовал процесс отмывки образцов фосфатным буфером с последующим добавлением DAB хромогена (3–5 мин.). На следующем этапе образцы отмывали раствором буфера и приступали к окрашиванию гематоксилином Майера. На заключительном этапе образцы подвергались дегидратации и заливались в монтирующую среду Consul-Mount (Thermo Fisher Scientific).

**Таблица 2.1** – Антитела для иммуногистохимического исследования парафиновых срезов

Антитело	Разведение	Производитель
anti-Fibronectin antibody	1 : 100	ab6328 Abcam, Англия
anti-Laminin antibody	1 : 100	ab11575 Abcam, Англия
anti-Collagen IV antibody	1 : 100	ab6586 Abcam, Англия
anti-CD31 antibody	1 : 200	ab64543 Abcam, Англия
anti-VEGF antibody	1 : 200	ab46154 Abcam, Англия

При использовании антител, внесенных в таблицу 2.2, выполнялось дополнительное докрашивание криосрезов флуорофором DAPI (Sigma-Aldrich, USA).

**Таблица 2.2** – Антитела для иммуногистохимического исследования криосрезов

Антитело	Разведение	Производитель
anti-MHC Class I antibody(FITC)	1 : 20	ab22367 Abcam, Англия
anti-Von Willebrand factor antibody (FITC)	1 : 100	ab6994 Abcam, Англия

Для оценки инфильтрации провоспалительными макрофагами образцов пищеводов использовали метод иммуногистохимического окрашивания. При этом, в роли первичных выступали поликлональные антитела кролика к маннозным рецепторам (ab64693; Abcam, США), разведенные в соотношении 1 : 100. Вторичными являлись поликлональные антитела, синтезированные в организме козы против кроличьих иммуноглобулинов, которые были конъюгированны с Alex Flour® 488 (ab150081; Abcam, США). В данном случае использовали разведение 1 : 500. Микрофотографии были получены на микроскопе фирмы Olympus BX51 (Япония).

## **2.6. Выделение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток**

Материалом для выделения МСК служил красный костный мозг крыс. При выделении МСК для дальнейших процессов трансдукции и

рецеллюляризации применяли методику, предложенной Е.А. Губаревой и соавторами (2016). При проведении исследований плотность посева клеток на флакон была равна  $5 \times 10^4$  кл/см<sup>2</sup>. В процессе культивирования клеток применяли среду DMEM. В нее были внесены антибиотик-антимикотик и 10 % фетальная бычья сыворотка (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Полученные МСК исследовали путем иммунофенотипирования использованием маркеров CD90, CD34, CD45 и CD105. Кроме того, анализировался процесс индуцированной дифференцировки в определенные клеточные линии (Lim et al., 2014; Куевда и др., 2016). Клетки, достигшие 80–90 % конфлюэнтности, удалялись с флаконов. Далее следовал процесс трансдукции с помощью аппарата Neon Transfection System (Invitrogen, США) по методике фирмы-изготовителя. Получали смешанную культуру путем перемешивания на 2-м пассаже клеток, способных синтезировать GFP белок, с МСК 6-го пассажа, которые до этого не подвергались трансдукции; Полученная культура была использована в процессе рецеллюляризации децеллюляризованных образцов пищевода. Данный процесс, согласно литературе, приводит к снижению вероятности развития патологических иммуногенных реакций. Считается, что данный эффект усиливается у клеток после процесса трансфекции (Tao et al., 2014; Van Vollenstee et al., 2016). Для последующей оценки пролиферативной активности в смешанной культуре МСК использовали метод цитохимического окрашивания для определения содержания Ki-67. На следующем этапе проводилась детекция флуоресценции. В роли первичных выступали кроличьи поликлональные антитела к Ki-67. Антитела были разведены в соотношении 1 : 50 (ab15580; Abcam, США). Вторичные представлены козьими антителами к кроличьим иммуноглобулинам, которые были конъюгированные с Alexa Fluor 488 (ab150081, Abcam, США). В данном случае, антитела были разведены в соотношении 1 : 400.

Для оценки морфологию МСК и детекции GFP применяли инвертированный флуоресцентный микроскоп фирмы Olympus IX51 (Токио,

Япония). Оценка культур проводилась во флаконах и на биологических каркасах *in vitro*, при этом длина волны составляла 488 нм. При оценке *in vivo* рецеллюляризованных пищеводов на предмет наличия клеток, синтезирующих GFP белок, применяли флуоресцентный микроскоп iVox® Explorer<sup>TM2</sup> (UVP, Калифорния, США). Данный микроскоп также был использован в процессе оценки каркасов после эксплантации. Во всех случаях длина волны возбуждения составляла 455–495 нм, а волны излучения 503–523 нм. Для получения снимков образцов пищевода применяли определенные режимы съемок. Сначала применяли режим фиксации светочувствительной матрицей отраженных и переизлученных фотонов без использования светофильтров в рабочем диапазоне, затем режим с поднятым узкополосным фильтром, прозрачным для диапазона флюоресценции GFP. Далее подбирали определенную выдержку в процессе фотографирования образцов, исходя из соответствующей интенсивности свечения клеток. Полученные в процессе макрофотосъемки были сохранены в TIFF формате. При этом глубина цвета составляла 16 бит для следующего этапа обработки. Для этого было использовано программное обеспечение RawTherapee с определением подходящих уровней экспозиции. Выявляющиеся при продолжительной выдержке температурные шумы матрицы подвергались фильтрации с использованием функции порогового отсечения инструментом «уровень черного». Обработанные таким образом фотографии совмещали в единое изображение используя способ послойного наложения (программное обеспечение GIMP). С помощью способа Addition узкополосные изображения окрашивались в оттенки зеленого инструментом Colorize. Полученные таким способом фотографии накладывались дополнительным слоем на широкополосные изображения. Изображение переводилось в формат TIFF. Путем ручного совмещения слоя узкополосного изображения и макрофотографии (фотокамера Canon 600D и макрообъектив Sigma DG Macro 50 мм F2.8.) получали синтетическое композитное изображение.

## **2.7. Статичная рецеллюляризация децеллюляризованного пищевода**

Процесс статичной рецеллюляризации децеллюляризованных пищево­дов проводился в 6-луночных планшетах. Клеточной суспензией (200 мкл) обрабатывали поверхность биологического каркаса с внешней и внутренней стороны. В процессе рецеллюляризации одного децеллюляризованного пищевода были использованы 200 000 клеток.

## **2.8. Оценка жизнеспособности стволовых клеток и цитотоксических свойств ацеллюлярных матриксов**

Для оценки цитотоксических свойств биологических каркасов, полученных путем децеллюляризационной обработки, а также жизнеспособности нанесенных на них клеток (около 30 тыс. клеток на 100 мкл культуральной среды) применяли метод колориметрического анализа. Для этого применили 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид (ХТТ-тест), а оптическая плотность регистрировалась при длине волны равной 450 нм (референс – 620 нм). Описанные процедуры выполнялись на ридере FilterMax F5 (Molecular Devices, США). Долю активно метаболизирующихся клеток рассчитывали в процентах (Багаева и др., 2015; Кувда и др., 2017).

## **2.9. Протокол оперативного вмешательства**

Анестезия животных осуществлялась подкожным введением Xilazin 2 % (10 ED) и внутримышечным введением Zoletil (8 ED). В послеоперационном периоде проводилась терапия антибиотиком Baytril 0,2 mL/kg без последующей иммунотерапии.

При гетеротопической трансплантации (подкожные тесты) выполнялся разрез на холке крысы длиной 1 см и создавался подкожный карман. Образцы пищевода помещались в карман и фиксировались двумя швами к подлежащим тканям с целью предотвращения перемещения в область кожного шва. Кожная рана ушивалась непрерывным швом. В качестве оперативного доступа при трансплантации в область брюшной части пищевода использовали подреберную (косую) лапаротомию слева. Послойно рассекали кожу, подкожную клетчатку, мышцы переднебоковой стенки живота, брюшину. С помощью ранорасширителей разводили края лапаротомной раны, срединную и левую доли печени отводили краниально, желудок – каудально. Трансплантат (длиной не менее 8–10 мм) продольно фиксировали двумя узловыми швами к брюшной части пищевода. Проводили контроль гемостаза. После завершения описанных выше манипуляций рана послойно ушивалась, с наложением отдельных швов на мышцы переднебоковой брюшной стенки и кожу.

## **2.10. Статистические методы обработки полученных данных**

Данные, которые были получены в ходе исследований, были статистически обработаны с применением программного обеспечения «GraphPad Prism 7.00» (GraphPad Software Inc., США) и «Statistica 10.0» (StatSoft Inc., США) «MS Excel 2016» (Microsoft Inc., США). Далее для определения нормальности распределения в исследуемых группах количественных признаков использовался критерий Шапиро-Уилка. Для выявления статистически значимых различий при парных сравнениях межгрупповых различий двух независимых групп использовали критерий Манна-Уитни (MW-test). При проверке статистических гипотез критический уровень значимости (p-value) принимали равным 0,05. При парных сравнениях зависимых групп для оценки статистически значимых различий

использовали критерий t-критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ). При проверке статистических гипотез критический уровень значимости (p-value) принимали равным 0,05.

## ГЛАВА 3.

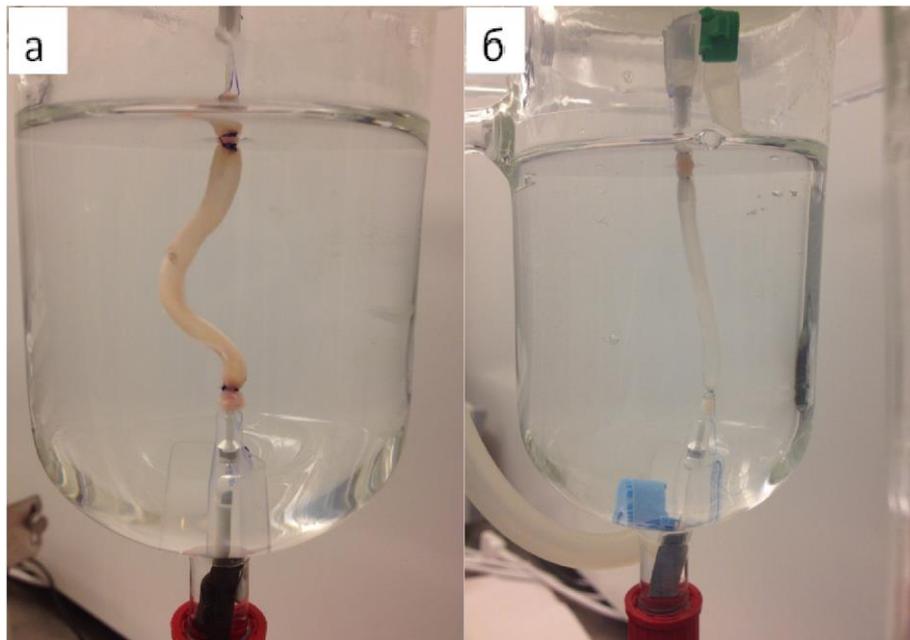
### РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Создание ТИК довольно сложный процесс, который зависит от правильности подбора наиболее оптимального метода получения тканеинженерных матриц с возможностью реализации их свойств, в том числе биомеханических, функциональных и морфологических. Также необходимо обеспечить возможность рецеллюляризации различными клеточными линиями. Полученный каркас ТИК не должен быть токсичным ни по отношению к клеткам, использованным в процессе рецеллюляризации, и ни по отношению к организму реципиента. Еще одним условием является отсутствие иммуногенности у каркаса. При разработке протокола децеллюляризации пищевода необходимо учитывать влияние параметров обработки пищевода на сохранность структуры внеклеточного матрикса и биомеханических свойств биологического каркаса, поскольку от них, в первую очередь, зависят процессы адгезии, пролиферации и дифференцировки заселенных на него клеток, а также процессы ангиогенеза после трансплантации ТИК.

#### 3.1. Процесс децеллюляризации пищевода крысы

В процессе децеллюляризации пищевод терял характерный для него цвет и приобретал молочно-белую окраску (рисунок 3.1). Децеллюляризация пищевода происходила относительно равномерно на протяжении всего органа, но в некоторых случаях для децеллюляризации центрального сегмента органа требовалось больше времени, что, вероятно, связано с физиологическим сужением данной его части. К нижнему катетеру фиксировался груз, который препятствовал всплытию нижней части пищевода, при этом подбирались адекватная длина органа, исключая его

натяжение. Процесс децеллюляризации сопровождался увеличением диаметра пищевода, что могло быть связано с воздействием детергента и гидростатическим давлением растворов. Толщина стенки децеллюляризованного пищевода по сравнению с нативным органом уменьшалась, что обусловлено удалением клеточного компонента и уменьшением объема тканей.



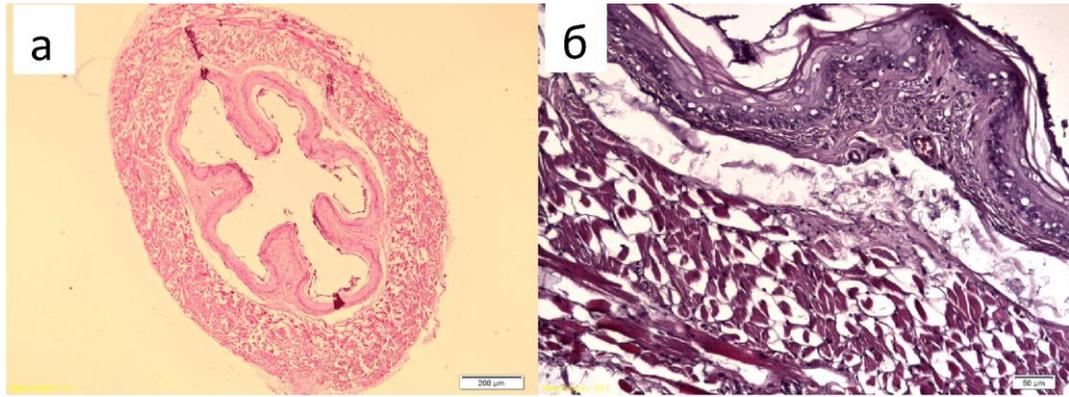
**Рисунок 3.1** – Децеллюляризация пищевода: а – нативный пищевод; б – децеллюляризованный пищевод

Внесенные нами изменения в протокол за счет увеличения скорости подачи растворов более 6 мл/мин способствовали ускорению процесса децеллюляризации, но это приводило к отслойке слизистой оболочки и нарушению целостности стенки. Снижение скорости подачи растворов менее 6 мл/мин приводило к неравномерной децеллюляризации органа (выявлялись участки с интактными клеточными ядрами) и увеличению времени реализации протокола. Таким образом, оптимальной скоростью подачи растворов при децеллюляризации пищевода была выбрана скорость 6 мл/мин.

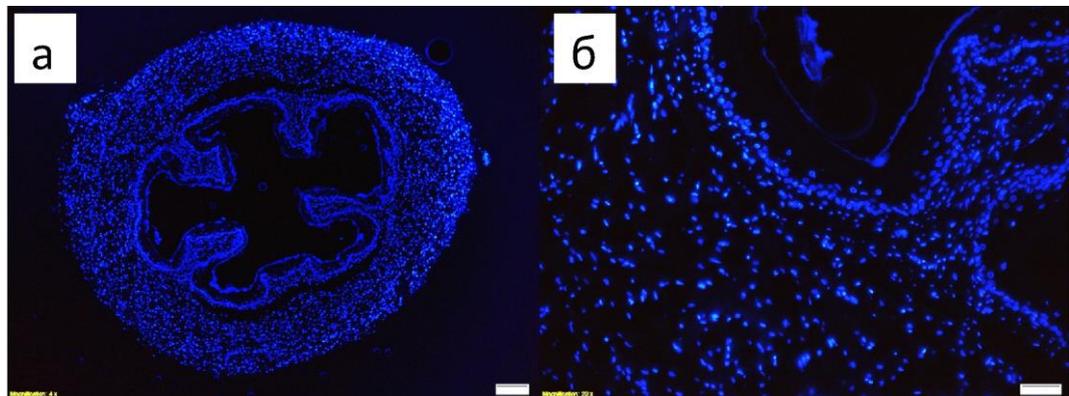
### **3.2. Морфологическая характеристика децеллюляризованного пищевода крысы**

Для оценки качества полученного каркаса использовали окрашивание гематоксилином и эозином, флуорохромирование DAPI и количественный анализ уровня содержания ДНК. При окраске гематоксилином и эозином препаратов нативного пищевода (рисунок 3.2) в его составе четко дифференцировали слои: слизистая оболочка, подслизистая основа, мышечная и адвентициальная оболочки. Слизистая оболочка вместе с подслизистой основой формируют на внутренней поверхности пищевода продольные складки. При этом слизистая оболочка представлена базофильно окрашенным пластом многослойного плоского неороговевающего эпителия, собственной пластинкой (образованной рыхлой соединительной тканью) и мышечной пластинкой, последняя образована слоем гладких миоцитов, имеющих продольную ориентацию. В собственной пластинке слизистой оболочки (в местах физиологических сужений пищевода) располагаются кардиальные железы, по клеточному составу соответствующие кардиальным железам желудка. Мышечная пластинка слизистой оболочки отграничивает слизистую от подслизистой основы. Рыхлая волокнистая соединительная ткань входит в состав подслизистой основы, в которой выявляются концевые отделы собственных желез пищевода. В состав мышечной оболочки входят два слоя мышечной ткани. При этом внутренний слой имеет продольную ориентацию волокон, а наружный – циркулярный. В верхней трети преобладает поперечнополосатая мышечная ткань, а остальной части пищевода – гладкомышечная ткань. В межмышечных соединительнотканых прослойках выявляются сосуды разного калибра. Адвентициальная оболочка – это слой рыхлой волокнистой соединительной ткани, в которой выявляются сосуды.

Окрашивание гематоксилином и эозином децеллюляризованного пищевода не выявило наличия клеточных ядер (рисунок 3.3 а).

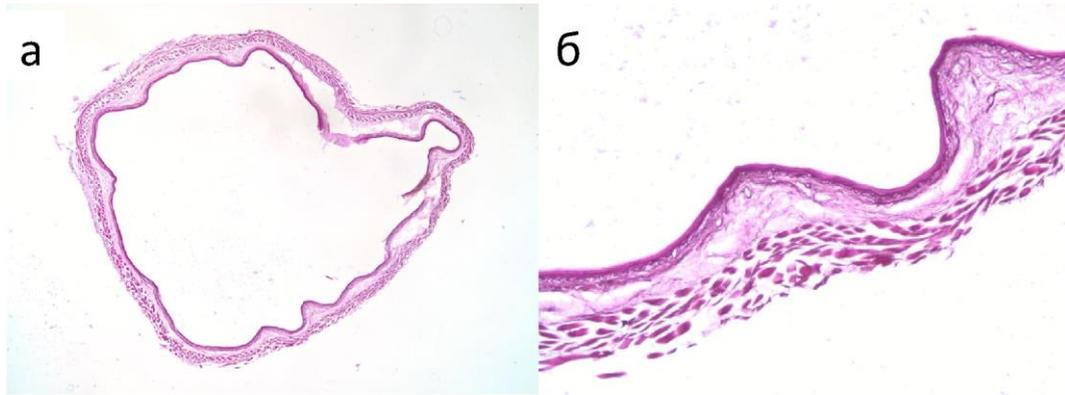


**Рисунок 3.2** – Нативный пищевод. Окраска гематоксилином и эозином (а, б). Парафиновые срезы: а –  $\times 40$ ; б –  $\times 200$ . Выявляются базофильно окрашенные клеточные ядра



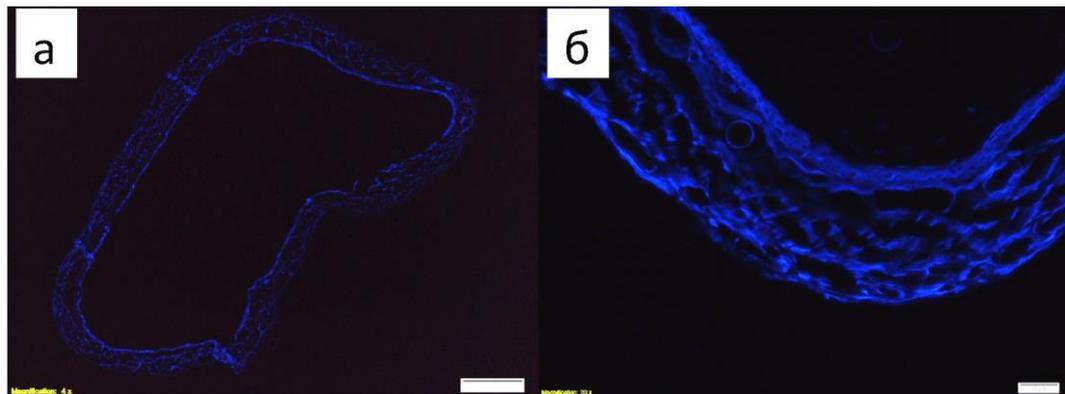
**Рисунок 3.3** – Нативный пищевод. Окраска DAPI (а, б). Парафиновые срезы: а –  $\times 40$ ; б –  $\times 200$ . Флуоресценция клеточных ядер

Стенка децеллюляризованного пищевода сохранила структурную организацию свойственную нативному органу структуру и имела те же дифференцируемые оболочки. В пищеводе сохранены продольные складки, образованные слизистой оболочкой и подслизистой основой, но толщина этих складок менее выражена чем в нативном пищеводе, что приводило к увеличению площади просвета органа (рисунок 3.3 а, б). Процесс децеллюляризации в целом приводил к уменьшению толщины стенки пищевода в основном за счет снижения объема подслизистой основы и мышечной оболочки, что, вероятно, являлось результатом удаления под воздействием детергента части клеток. В децеллюляризованном пищеводе при окрашивании гематоксилином и эозином сосуды не типировались (рисунок 3.4).



**Рисунок 3.4** – Децеллюляризованный пищевод. Окраска гематоксилином и эозином. Парафиновые срезы: а –  $\times 40$ ; б –  $\times 200$ . Клеточные ядра отсутствуют

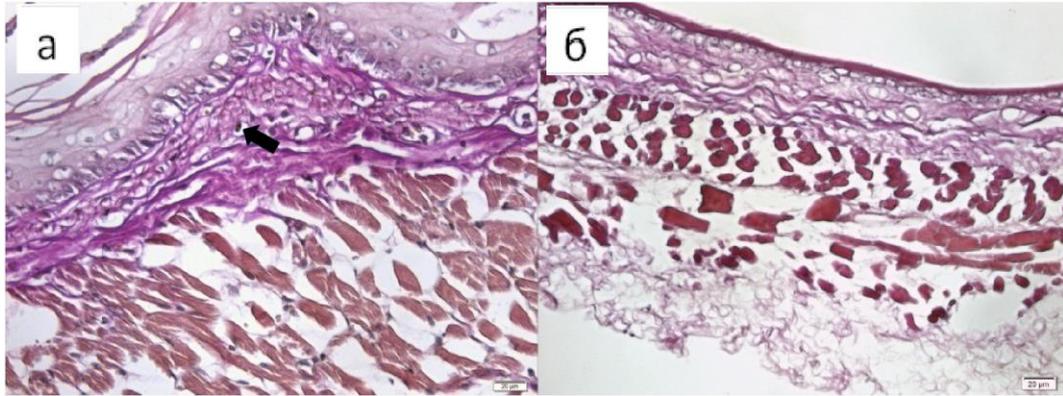
При окрашивании DAPI в образцах нативного пищевода выявлялось свечение клеточных ядер, а в децеллюляризованном пищеводе свечение ядерных структур отсутствовало (рисунок 3.3 а, б; рисунок 3.5 а, б).



**Рисунок 3.5** – Децеллюляризованный пищевод. Окраска DAPI не выявляет свечение ядер; отмечается аутофлуоресценция компонентов ВКМ. Парафиновые срезы: а –  $\times 40$ ; б –  $\times 200$

Для выявления волокон ВКМ и их архитектоники использовали окрашивание по методу Ван Гизона, являющегося тропным к компонентам ВКМ. В нативном органе соединительнотканые элементы выявлялись в основном в участках базальной мембраны и в зоне мышечной оболочки (рисунок 3.6 а).

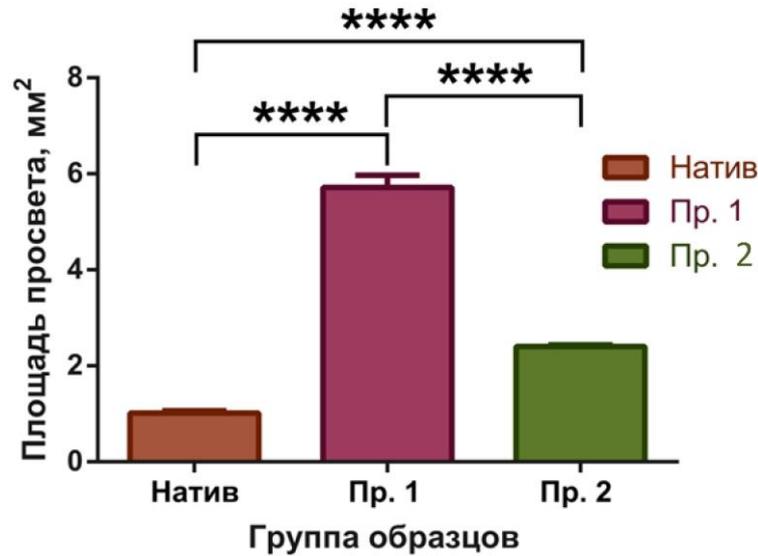
Во ВКМ децеллюляризованного органа выявляются коллагеновые структуры. При морфологической оценке отмечается исходное расположение



**Рисунок 3.6** – Окрашивание пикрофуксином по Ван Гизону:

а – нативный пищевод; б – децеллюляризированный пищевод. В децеллюляризированном пищеводе ядра не выявляются. Архитектоника ВКМ сохранена. Парафиновые срезы,  $\times 400$

элементов ВКМ. Не выявляются нарушения структур соединительнотканых волокон. Отсутствуют морфологические признаки изменения свойств ВКМ пищевода (рисунок 3.6 б). Площадь просвета органа у животных из группы контроля (нативный пищевод) составила  $1,019 \pm 0,039$  мм<sup>2</sup>. Площадь просвета при использовании оригинального протокола статистически значимо больше на 82,2 % (MW-test,  $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем и составила  $5,716 \pm 0,282$  мм<sup>2</sup>, а в условиях модифицированного статистически значимо больше на 57,6 % (MW-test,  $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем и составила  $2,401 \pm 0,042$  мм<sup>2</sup>. Площадь просвета пищевода при использовании оригинального протокола статистически значимо больше на 58 % (MW-test,  $p < 0,05$ ), чем при использовании модифицированного протокола. Перфузия пищевода с указанной скоростью различными растворами, в том числе и детергентами, сопровождается его растяжением и, вероятно, снижением эластических свойств органа. Описанные процессы приводят к увеличению площади просвета децеллюляризированного пищевода. Площадь просвета пищевода при применении оригинального протокола децеллюляризационной обработки равна  $5,716 \pm 0,282$  мм<sup>2</sup>, а при использовании авторского модифицированного –  $2,401 \pm 0,042$  мм<sup>2</sup> (рисунок 3.7, таблица. 3.1).

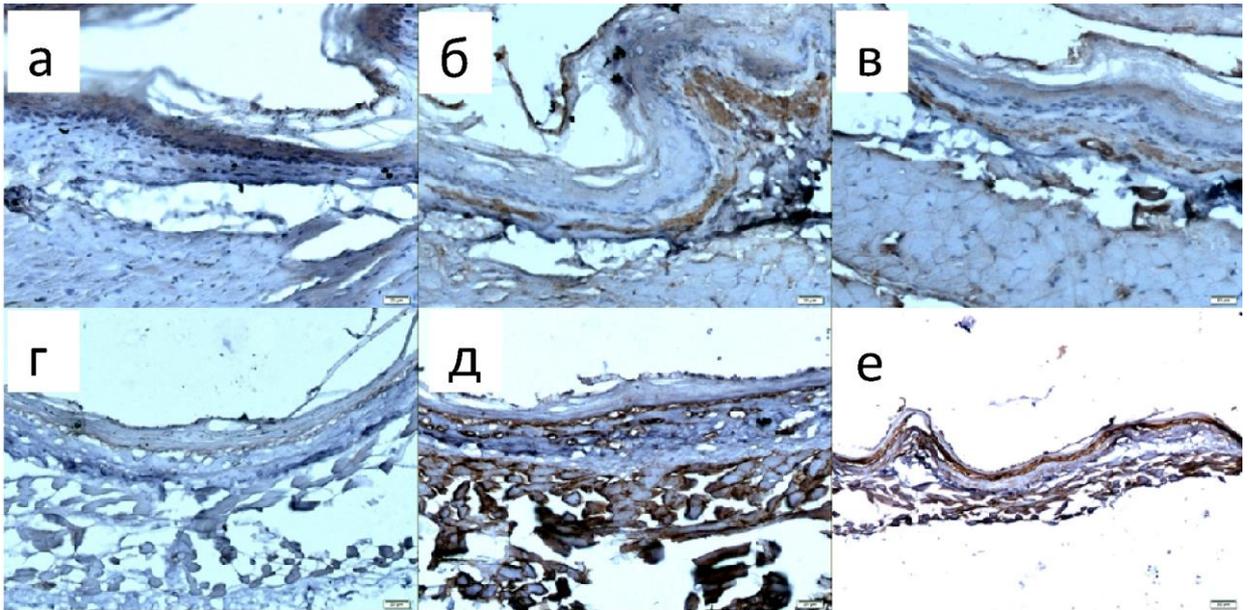


**Рисунок 3.7** – Площадь просвета пищевода (\* $p < 0,0001$ ). Натив – площадь просвета нативного пищевода, ПР.1 – площадь просвета децеллюляризованного пищевода (оригинальный протокол), ПР.2 – площадь просвета децеллюляризованного пищевода (модифицированный протокол)

**Таблица 3.1** – Площадь просвета пищевода

№ образца	Площадь просвета, мм <sup>2</sup>		
	Нативный пищевод	Оригинальный протокол	Модифицированный протокол
1	1,015399	5,76029	2,402001
2	1,010611	5,872751	2,419651
3	1,022859	5,802501	2,35384
4	1,018158	5,487106	2,333047
5	0,9447	5,45298	2,479928
6	1,002676	5,432405	2,361464
7	1,003223	5,743355	2,427561
8	1,08935	5,673849	2,424533
9	1,012259	6,389112	2,404743
10	1,071188	5,548764	2,404659
mean ± SD	1,019 ± 0,039	5,716 ± 0,282	2,401 ± 0,042

Иммуногистохимическое исследование показало, что в децеллюляризованной ткани пищевода исходная локализация белков внеклеточного матрикса сохранена (коллаген IV типа, ламинин и фибронектин). Большая часть упомянутых белков выявлялась в зоне базальной мембраны и в составе соединительной ткани, расположенной в мышечных слоях пищевода и адвентиции (рисунок 3.8).

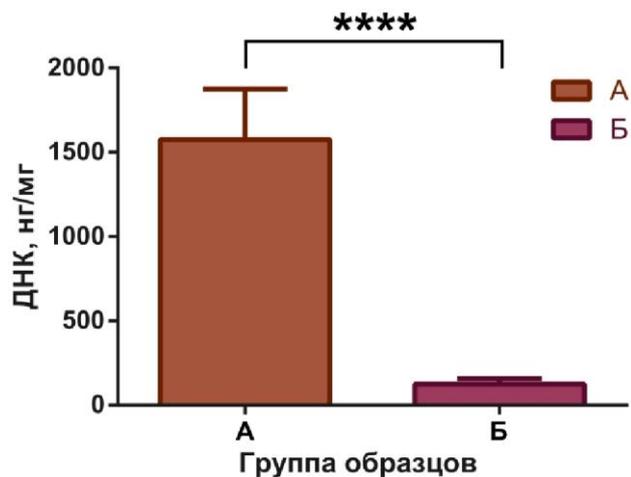


**Рисунок 3.8** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к фибронектину (а, г), ламинину (б, д), коллагену IV типа (в, е); нативный пищевод (верхний ряд), децеллюляризованный пищевод (нижний ряд); парафиновые срезы, x400.

Окрашивание DAB-хромогеном компонентов ВКМ

В процессе децеллюляризационной обработки удалить 100 % клеточного материала практически невозможно. Существуют разные способы оценки содержания остаточных клеточных компонентов, в частности ДНК. Проведенные исследования показали, что в процессе децеллюляризационной обработки пищевода было удалено 92,0 % ДНК. При исследовании нативного органа содержание ДНК составило  $1576,37 \pm 279,6$  нг/мг, а в децеллюляризованном –  $123,85 \pm 22,61$  нг/мг. Это свидетельствует об элиминации значительной части клеточных элементов и дает возможность использовать ацеллюлярный матрикс для дальнейших исследований (рисунок 3.9, таблица 3.2).

Таким образом, предложенный модифицированный детергентно-энзиматический метод децеллюляризации пищевода позволяет максимально сохранить компоненты внеклеточного матрикса пищевода (коллаген IV типа, ламинин, фибронектин), при этом снизить концентрацию антигенов, в частности ДНК.



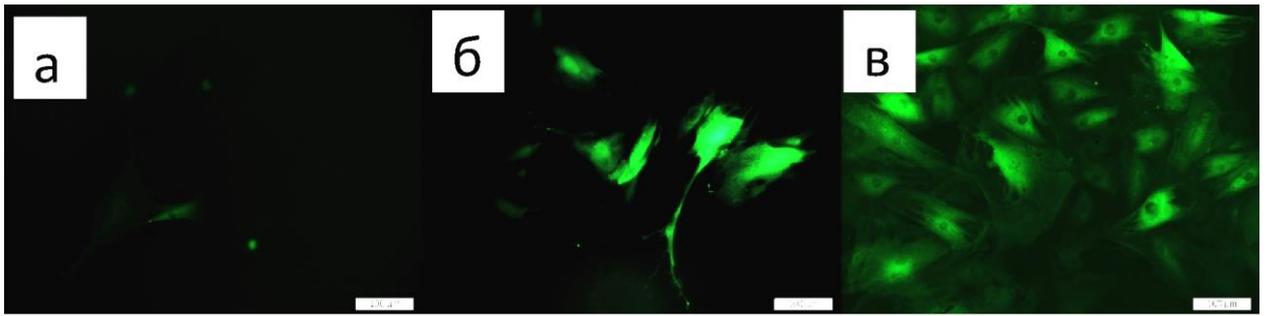
**Рисунок 3.9** – Относительное содержание ДНК до и после децеллюляризации пищевода крысы. А – нативный пищевод; Б – децеллюляризованный пищевод (\* $p < 0,0001$ )

**Таблица 3.2** – Содержание ДНК в пищеводе

№ образца	Содержание ДНК, нг/мг	
	Нативный пищевод	Децеллюляризованный пищевод
1	1153,891	101,9503
2	1765,445	117,8284
3	1484,499	119,7109
4	1642,744	108,8955
5	1669,66	124,7695
6	1246,344	158,5679
7	1641,722	113,848
8	1287,087	169,756
9	1858,401	103,5628
10	2013,947	119,671
mean $\pm$ SD	1576,374 $\pm$ 279,6	123,856 $\pm$ 22,61

### 3.3. Культивирование GFP-позитивных клеток и статическая рецеллюляризация ацеллюлярного каркаса

Процесс культивирования проводили на пластике МСК после трансдукции, при этом для демонстрации типированных клеток использовали флуоресцентную микроскопию (рисунок 3.10).

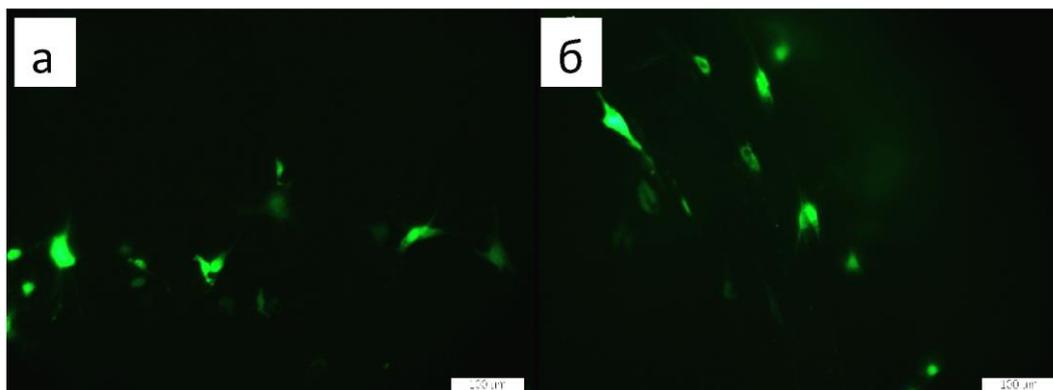


**Рисунок 3.10** – GFP-позитивные клетки при культивировании на пластике:  
а – 3; б – 5; в – 10 сутки после посева; зеленое свечение соответствует зоне цитоплазмы  
GFP-клеток, х200

Оказалось, что на 3-и сутки культивирования (рисунок 3.10 а) клеточная популяция характеризовалась гетерогенностью формы клеток, так как наряду с веретеновидными клетками появлялись клетки округлой формы, часть которых не прикреплена к пластику. К 10-м суткам культивирования клетки достигали практически 90 % конфлюэнтности. Практически во всех участках цитоплазмы клеток выявлялась выраженная флуоресценция в зеленом спектре (рисунок 3.10 в).

Следующим этапом была рецеллюляризация матриксов пищевода с использованием клеточной суспензии (200 мкл). Обработывали поверхность биологического каркаса как с внешней, так и с внутренней стороны (со стороны просвета пищевода). Первым сроком были 3-и сутки после рецеллюляризации ацеллюлярного матрикса снятыми с флакона клетками. GFP-позитивные МСК заселяли биологический каркас распределяясь равномерно в области серозной оболочки пищевода и в зоне слизистой оболочки. При этом часть клеток мигрировала в область подслизистой основы. Такое распределение клеток стало возможным благодаря применению комбинированного метода нанесения клеточной суспензии на каркас (рисунок 3.11 а). В процессе культивирования было отмечено, что к 7-м суткам количество МСК на каркасе существенно не снижалось. Кроме того, показатели флуоресценции сохранялись на прежнем уровне. МСК принимали фибробластоподобную форму, которая также отмечалась у них при культивировании во флаконах (рисунок 3.11 б). При иммуногистохимическом исследовании определяли число клеток,

экспрессирующих Ki-67. От общего количества клеток доля активно пролиферирующих составила 2,66 %.

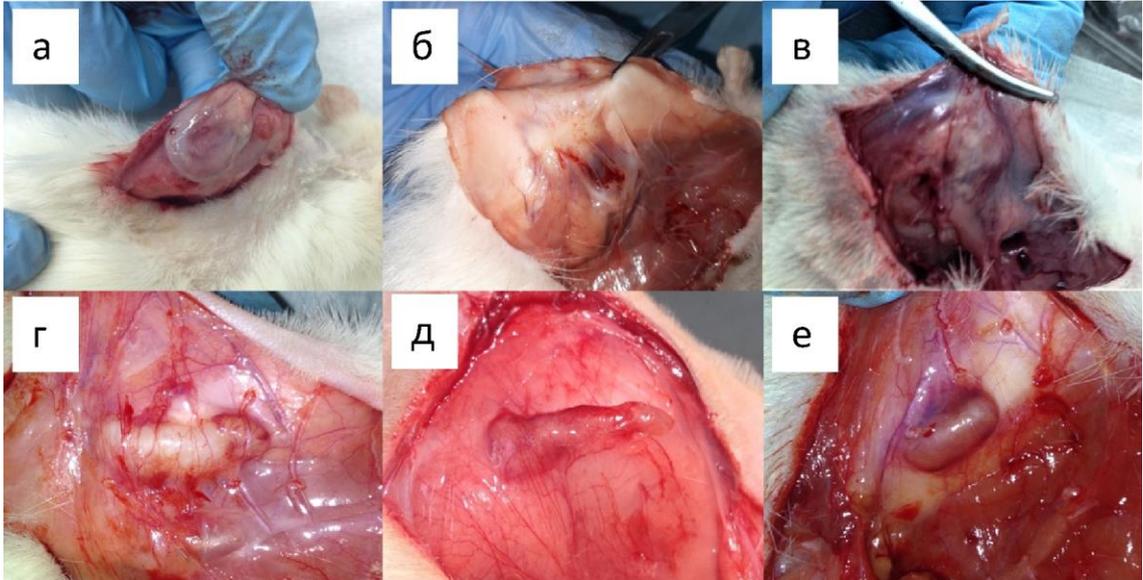


**Рисунок 3.11** – GFP-позитивные клетки, нанесенные на биологический каркас пищевода крысы: а – 3; б – 7 сутки; зеленый сигнал соответствует зоне цитоплазмы GFP-позитивных клеток, x200

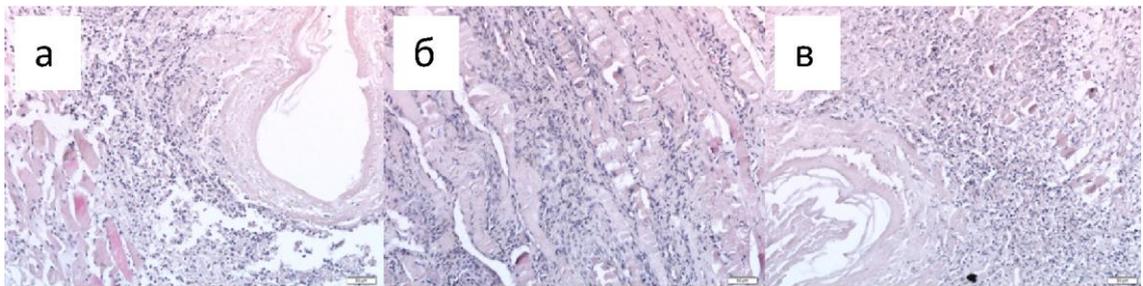
При статическом заселении GFP-позитивными клетками цитотоксичность каркаса пищевода составляла 2,4 %. При этом жизнеспособность МСК на децеллюляризованном пищеводе после проведения процесса рецеллюляризации составила 37,3 % (Е.В. Куевда и др, 2017).

### **3.4. Характеристика тканеинженерных конструкций пищевода после эксплантации**

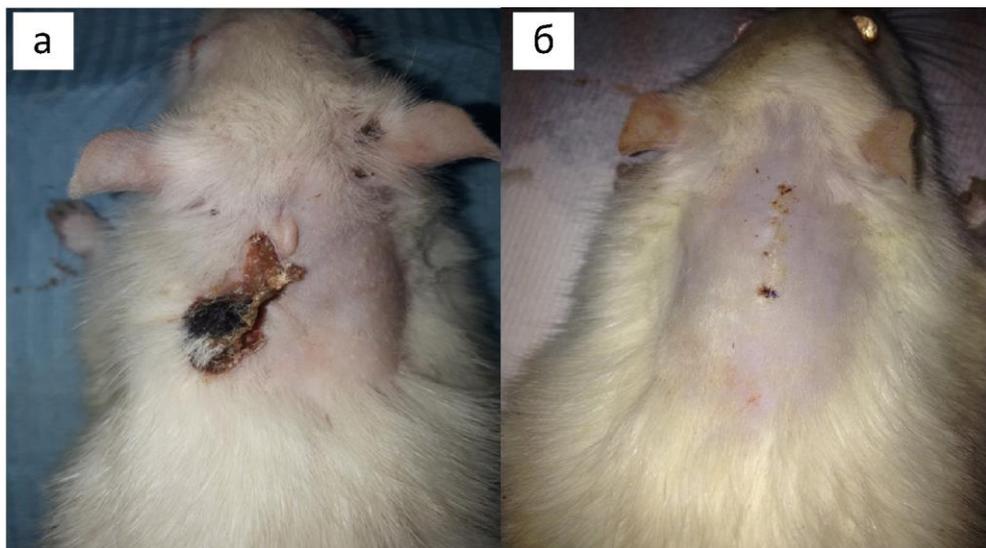
Изучение эксплантированных образцов было проведено на 7-е, 14-е и 21-е сутки после имплантации. На 7-е сутки при подкожной имплантации образцов нативного пищевода вокруг него формировалась выраженная соединительнотканная капсула толщиной до 160–170 мкм. На фоне выраженного отека имела место инфильтрация имплантата нейтрофилами и лимфоцитами и макрофагами (рисунок 3.12 а, б, в; рисунок 3.13 а, б, в). В дальнейшем развивающаяся выраженная воспалительная реакция (рисунок 3.13 б, в) при подкожной имплантации (рисунок 3.14 а) приводила к образованию кожного дефекта.



**Рисунок 3.12** – Подкожная имплантация пищевода крыс. Нативный пищевод: а – 7 сутки; б – 14 сутки; в – 21 сутки. Децеллюляризированный пищевод: г – 7 сутки; д – 14 сутки; е – 21 сутки

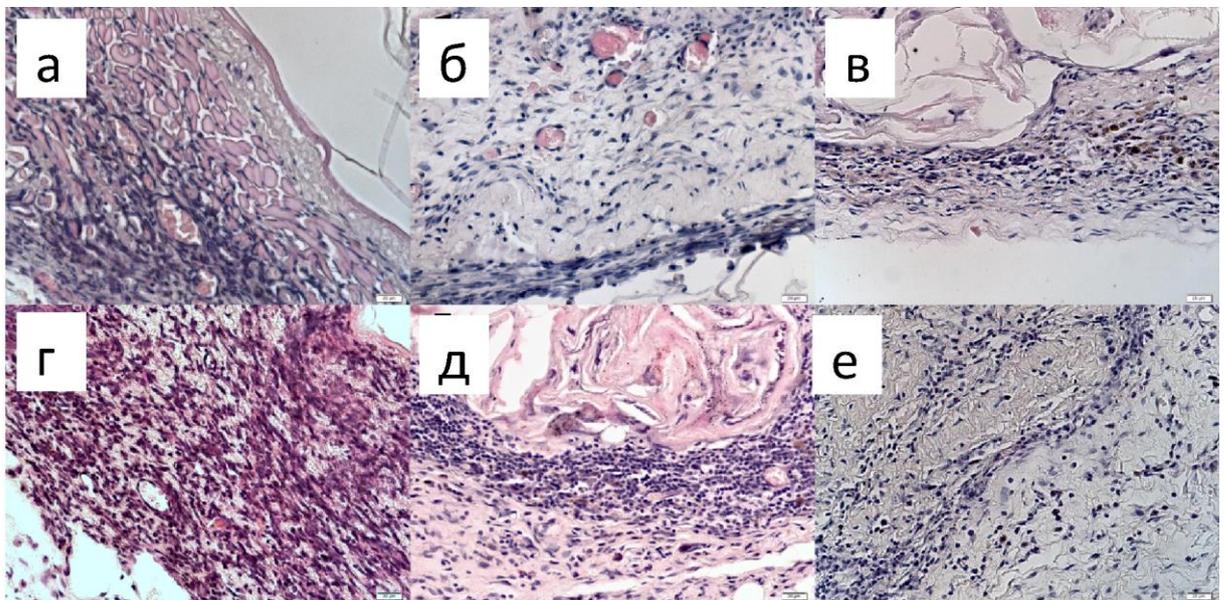


**Рисунок 3.13** – Подкожная имплантация нативного пищевода крысы: а – 7; б – 14; в – 21 сутки; окрашивание гематоксилином и эозином; x200



**Рисунок 3.14** – Подкожная имплантация пищевода крыс. 7 сутки: а – нативный пищевод, б – децеллюляризированный пищевод

При подкожной имплантации на 7-е сутки вокруг образцов децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода отмечался отек тканей, образование большого количества сосудов в зоне имплантации, слабая воспалительная реакция и формирование зрелой грануляционной ткани до 40–50 мкм с пролиферирующими фибробластами и большим количеством сосудов диаметром до 18 мкм (рисунок 3.15 а, г). В имплантатах обнаруживались базофильно окрашенные клетки вытянутой (фибробластоподобной) формы, отмечалась лимфомакрофагальная инфильтрация. На 14-е сутки объем имплантата снижался, вероятно, за счет уменьшения отека тканей и расстояния между коллагеновыми волокнами децеллюляризованного матрикса, снижение выраженности воспалительной клеточной инфильтрации. Отмечалось прорастание импланта новообразованными тонкостенными сосудами диаметром до 14 мкм (рисунок 3.15 б, д).

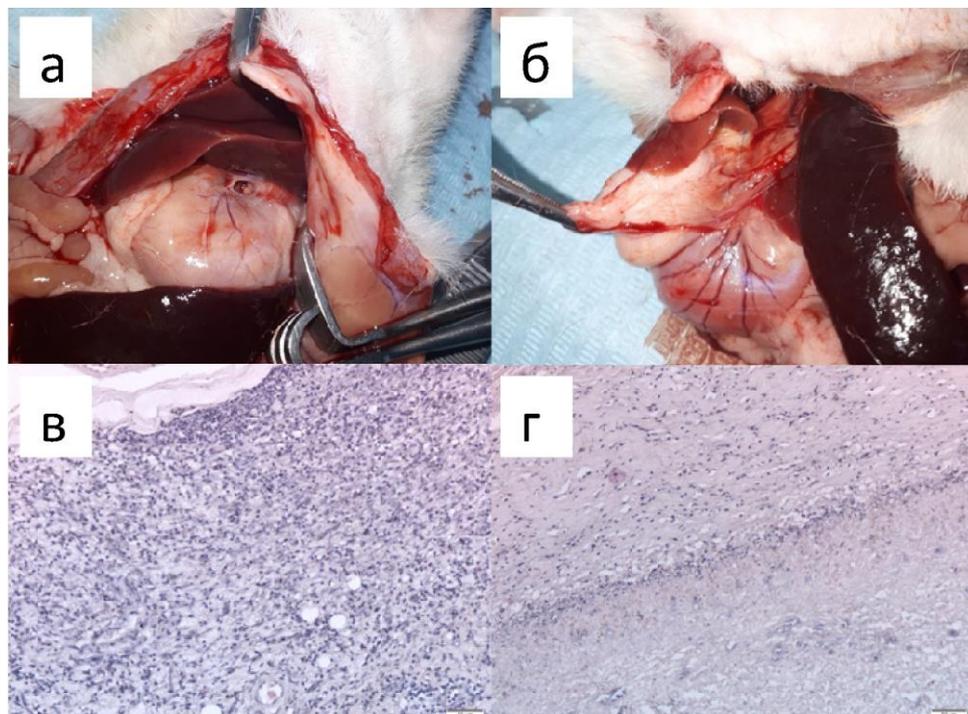


**Рисунок 3.15** – Подкожная имплантация децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода крыс: а, б, в – децеллюляризованный пищевод; г, д, е – рецеллюляризованный пищевод; а, г – 7; б, д – 14; в, е – 21 сутки; окрашивание гематоксилином и эозином; x200

На 21-е сутки регистрируется дальнейшее уменьшение размеров импланта, снижение выраженности воспалительной клеточной инфильтрации вокруг него с преобладанием базофильно окрашенных клеток фибробластоподобной формы. В зоне имплантации образцов появляется большое количество сосудов диаметром до 10 мкм (рисунок 3.15 в, е).

Вместе с тем при оценке полученных результатов оказалось, что более выраженная инфильтрация характерна для рециеллюляризованного пищевода, при этом преобладали мононуклеарные клетки. Результаты окрашивания гематоксилином и эозином позволили дать общую картину клеточной инфильтрации. Дифференциация ядер GFP-позитивных клеток в таком случае вызывает затруднения.

При имплантации в область брюшной части пищевода происходило образование воспалительного инфильтрата с вовлечением образца, брюшной части пищевода, печени и желудка (рисунок 3.16). Воспалительные изменения в зоне имплантации нативного пищевода при имплантации его в брюшную полость приводили к гибели животных на 10–15-е сутки.

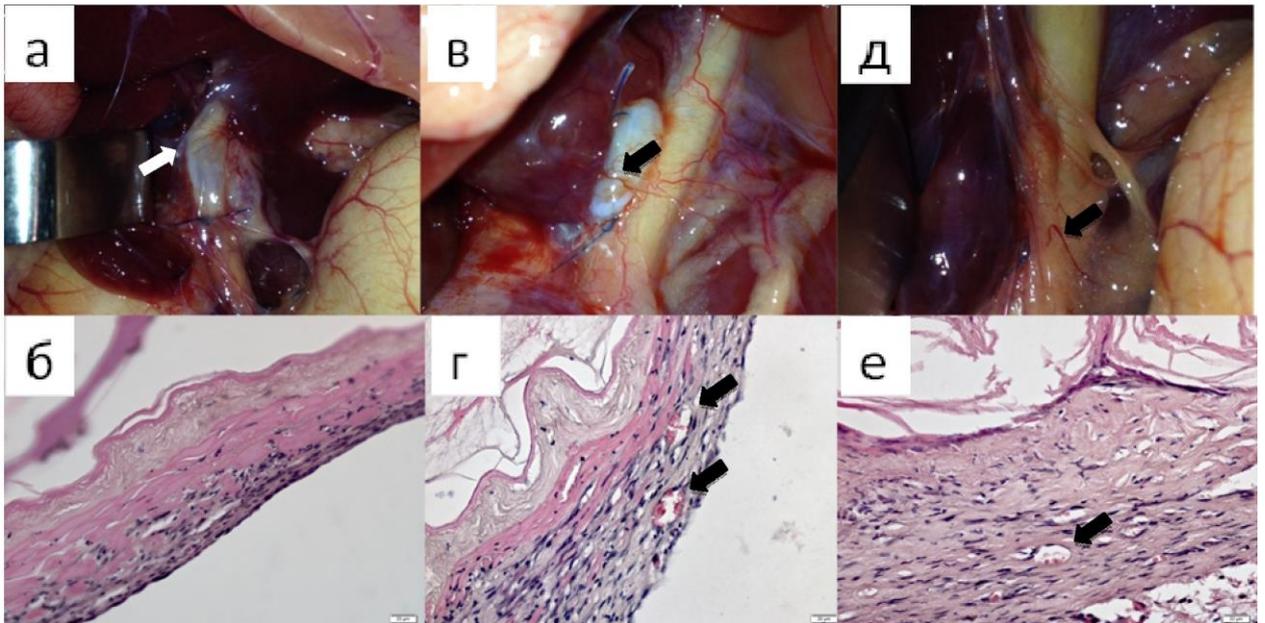


**Рисунок 3.16** – Имплантация в область брюшной части нативного пищевода крысы: а, в – 7; б, г – 14 сутки; окрашивание гематоксилином и эозином; x200

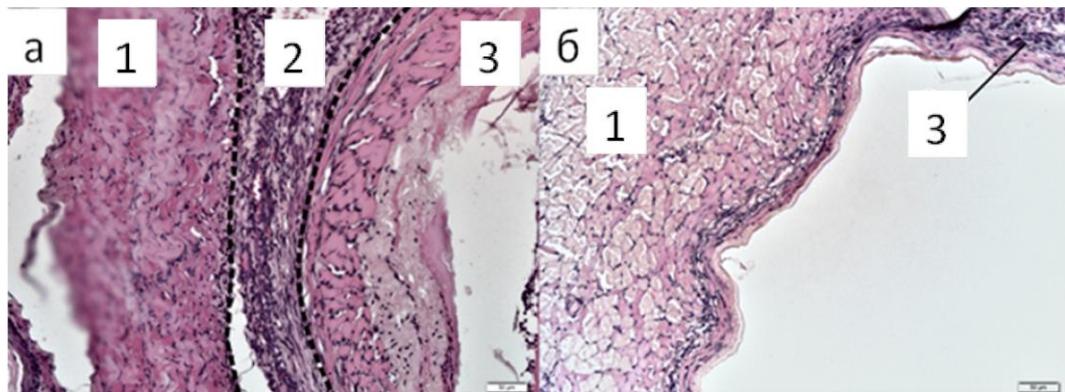
Результаты исследования показали, что восстановление кровоснабжения образцов децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода, при имплантации в область брюшной части пищевода, происходит за счет прорастания сосудов из прилегающих участков нативного пищевода (рисунок 3.17 а, в, д). На 7-е сутки отмечался отек образцов децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода, образование большого количества сосудов диаметром до 15 мкм в зоне имплантации (рисунок 3.17 а, б). В имплантатах обнаруживаются базофильно окрашенные клетки фибробластоподобной формы, отмечается слабо выраженная лимфомакрофагальная инфильтрация. На 14-е сутки на фоне снижения отека тканей и уменьшения имплантата в размере происходит снижение клеточной инфильтрации с сохранением преобладания базофильно окрашенных клеток фибробластоподобной формы. В имплантатах появляются новообразованные тонкостенные сосуды диаметром до 12 мкм (рисунок 3.17 в, г). На 21-е сутки отмечалось в имплантатах кроме базофильно окрашенные клетки вытянутой формы появляется небольшое число мононуклеарных клеток. В зоне имплантации образцов и в самих имплантатах выявляется большое количество сосудов диаметром до 10 мкм. Местами происходит формирование спаечного процесса между срединной долей печени и имплантатом (рисунок 3.17 д, е).

При оценке полученных образцов установлена более выраженная инфильтрация образцов рецеллюляризованного пищевода, при чем мононуклеарными клетками. Такой же эффект наблюдался при проведении подкожных тестов. При окрашивании гематоксилином и эозином можно оценить лишь общую инфильтрацию образцов клетками, преимущественно мононуклеарного типа. Дифференциация ядер GFP-позитивных клеток и в данном случае вызывает затруднения.

В некоторых случаях определение границ имплантата было затруднено, что связано с интеграцией тканеинженерной конструкции с окружающими тканями (рисунок 3.18 а, б).



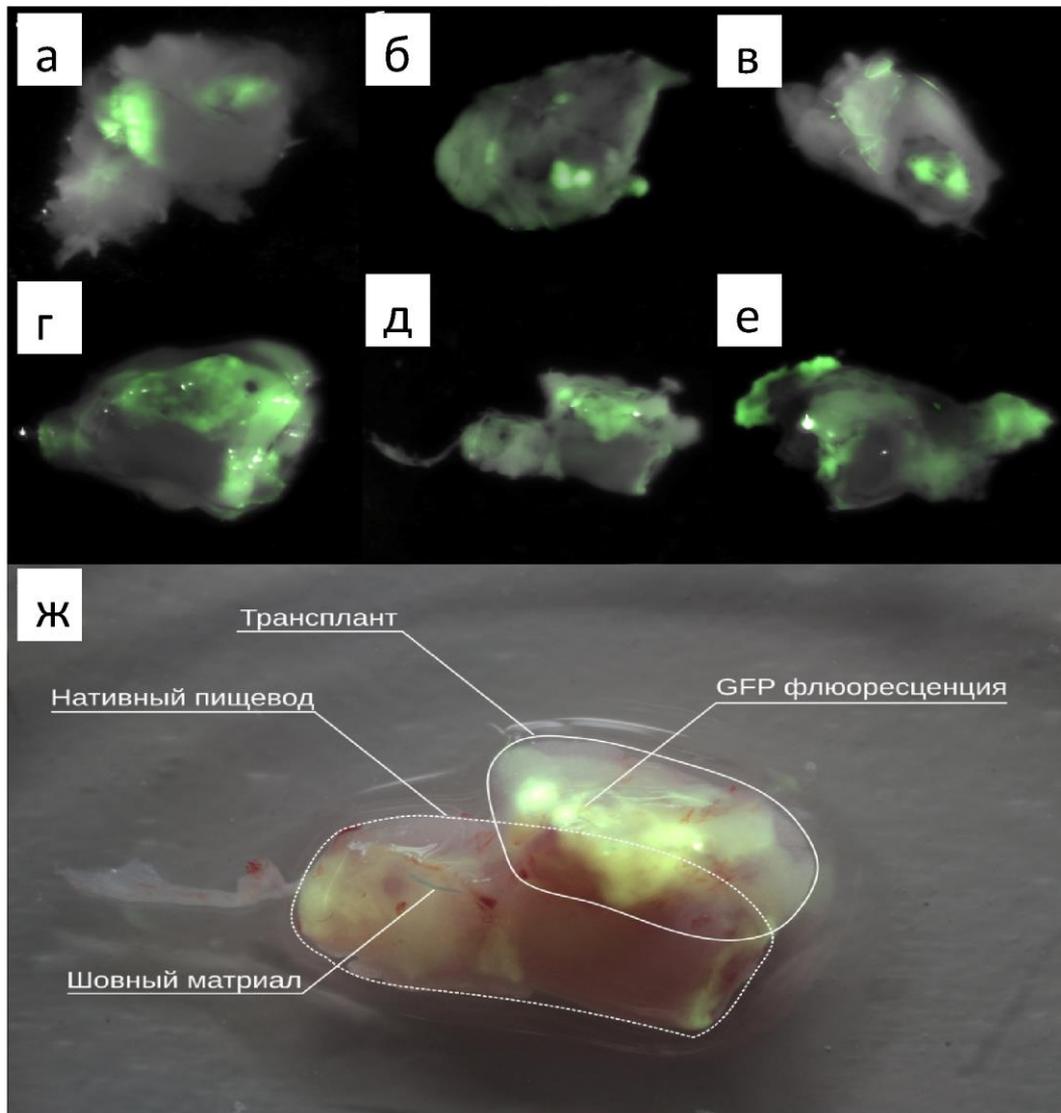
**Рисунок 3.17** – Имплантация в область брюшной части децеллюляризованного пищевода: а, б – 7; в, г – 14; д, е – 21 сутки; стрелкой указаны сосуды; окрашивание гематоксилином и эозином; x200.



**Рисунок 3.18** – Имплантация в область брюшной части децеллюляризованного пищевода, 7-е сутки: 1 – нативный пищевод; 2 – грануляционная ткань; 3 – децеллюляризованный пищевод; окрашивание гематоксилином и эозином; x200

Попытки выявления GFP-позитивных МСК в подкожных образцах при микроскопическом исследовании *in vivo* с применением установки iVox® Explorer<sup>TM2</sup> оказались неудачными. При проведении исследований зоны свечения не выявлялись. Локализацию GFP-позитивных клеток в окружающих тканях удалось выявить только лишь после забора подкожно имплантированных образцов. Более интенсивное свечение клеток отмечалось

на 7-е и 21-е сутки после имплантации. Интересно отметить более низкую степень свечения на 14-е сутки регистрировалась хуже (рисунок 3.19 а–в).

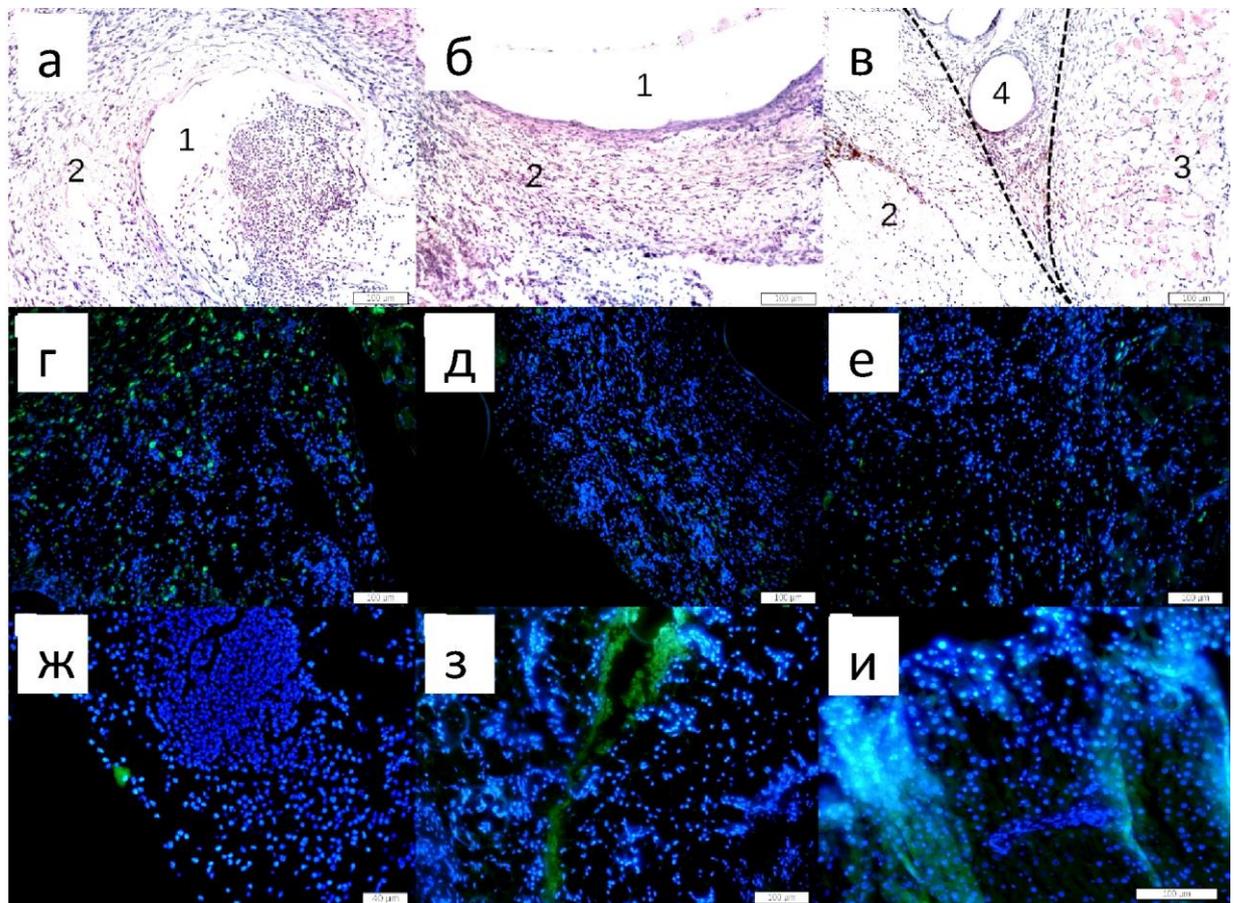


**Рисунок 3.19** – Флуоресцентная микроскопия эксплантов после проведения подкожных имплантаций (верхний ряд) и имплантаций в область брюшной части пищевода (нижний ряд): а, г – 7; б, д – 14; в, е – 21 сутки после трансплантации, x20; ж – макрофотография экспантированного пищевода на 14 – е сутки после выполнения имплантации в область брюшной части пищевода

Характер свечения после имплантации в область брюшной части пищевода выраженнее, чем при проведении подкожных имплантаций образцов (рисунок 3.19 г–е). Зона свечения значительно превосходила результаты, которые были получены при использовании Olympus IX51.

Клетки обнаруживались на всех поверхностях имплантированных в область брюшной части засеянных каркасов пищевода. Кроме того, клетки выявлялись также в толще тканей (рисунок 3.19 ж). Данный факт свидетельствует о том, что нанесенные на поверхность матрикса GFP-позитивные клетки прикрепилась к ВКИ, сохраняя при этом способность к пролиферации и синтезу белка.

GFP-позитивные клетки выявлялись на биологическом каркасе при гистологическом окрашивании эксплантов пищеводов (рисунок 3.20 а–и).



**Рисунок 3.20** – Экспланты пищевода через 7 (а, г, ж), 14 (б, д, з) и 21 (в, е, и) сутки после имплантации в область брюшной части пищевода. Парафиновые срезы: а–в – окрашивание гематоксилин-эозином (1 – область просвета пищевода, 2 – зона каркаса, 3 – нативный пищевод, 4 – область вхождения иглы; штриховая линия отграничивает зону нативного пищевода от имплантата); г–е – выявление M1-рецепторов макрофагов с применением антител к маннозным рецепторам (зеленый сигнал), синий сигнал – DAPI; ж–и – зона свечения цитоплазмы GFP-позитивных клеток (зеленый сигнал), синий сигнал – DAPI, x200

В течение 1-й недели после имплантации изучение макрофагов с помощью иммуногистохимической реакции к M1-рецепторам (Anti-Mannose Receptor antibody) позволила установить преобладание данного типа клеток, которые относятся к активным продуцентам эффекторных молекул (активных форм кислорода и метаболитов азота) и провоспалительных цитокинов (интерликины 1, 3, 6, ФНО $\alpha$ ). Через 2 и 3 недели после имплантации количество провоспалительных макрофагов было заметно ниже (рисунок 3.20 г–е). Окрашивание флуорофором DAPI на 7-е сутки после эксплантации демонстрирует значительную клеточную инфильтрацию при единично встречающихся GFP-позитивных клетках (рисунок 3.20 ж). На 14-е сутки выявляется свечение каркаса (рисунок 3.20 з), вероятно связанное с накоплением GFP-белка в процессе жизнедеятельности клеток на матриксе и клеточной гибели. Выявление свечения каркаса на 21-е сутки может свидетельствовать о миграции собственных (эндогенных) клеток реципиента на пересаженную ТИК благодаря микроокружению, создаваемому нанесенными на каркас клетками (рисунок 3.20 и).

Таким образом, исследования показали, что восстановление кровоснабжения образцов децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода при имплантации в область брюшной части пищевода происходит за счет прорастания сосудов из прилегающих участков нативного пищевода. В образцах обнаруживаются базофильно окрашенные клетки фибробластоподобной формы, отмечается слабо выраженная лимфомакрофагальная инфильтрация. При этом флуоресценция образцов указывает на то, что нанесенные со стороны просвета пищевода GFP-позитивные клетки прикрепилась к ВКМ, сохраняя при этом тенденцию к пролиферации и синтезу белка.

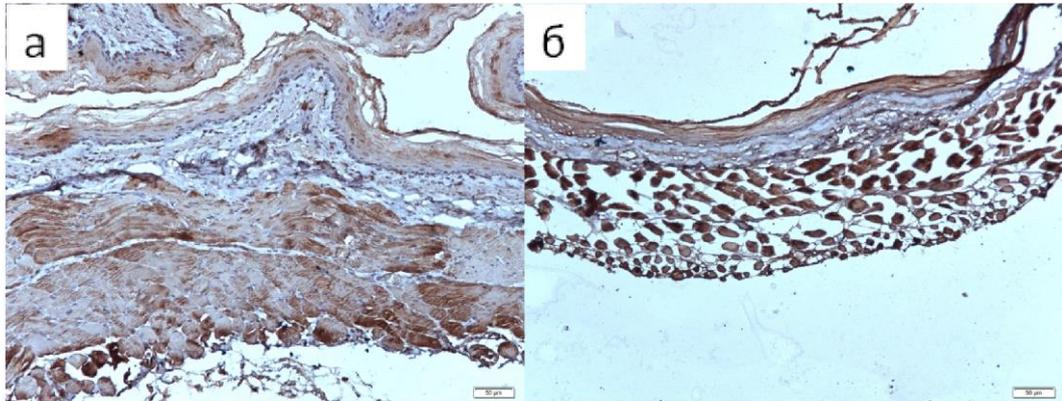
### **3.5. Иммуногистохимическая оценка процессов ангиогенеза в ТИК пищевода**

Иммуногистохимическое исследование с антителами к VEGF показало, что процесс децеллюляризации не приводит к полной элиминации данного фактора, о чем свидетельствует диффузная экспрессия данного маркера в децеллюляризованном пищеводе. В зоне подслизистой и мышечной оболочек выявлялись позитивно окрашенные сосуды диаметром до 11 мкм. Результат ИГХ-выявления VEGF представлен в виде окрашивания данного фактора DAB-хромогеном в коричневый цвет.

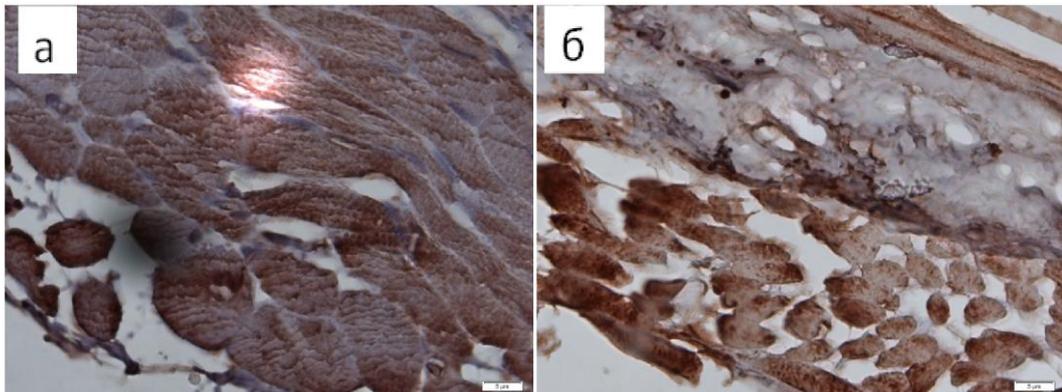
Содержание VEGF в зоне мышечной оболочки оказалось выше чем в остальных частях стенки пищевода. При этом распределение VEGF в тканях нативного и децеллюляризованного пищевода было одинаковым после процесса децеллюляризации. Таким образом, биологический каркас пищевода, полученный методом децеллюляризации, содержит молекулы VEGF, при сохранении архитектоники ВКМ (рисунок 3.21 а–б; рисунок 3.22 а–б). Сохранение молекул VEGF в биологическом каркасе может способствовать активному привлечению эндотелиальных клеток и увеличению количества образующихся кровеносных сосудов ТИК пищевода. Такой биологический каркас обладает свойством активировать и привлекать эндотелиальные клетки.

Антиген CD31, экспрессирующийся эндотелиальными клетками, использовался в качестве их маркера при иммуногистохимическом исследовании. Антитела к CD31 являются высокоспецифичными в отношении сосудистых эндотелиальных клеток. В нативном пищеводе специфическое окрашивание оказалось характерным для эндотелиального слоя сосудов в коричневый цвет. При их диаметре до 10 мкм CD31 выявляется в подслизистом и мышечном слоях. Иммуногистохимическое исследование с антителами к CD31 позволило выявить и достаточно мелкие

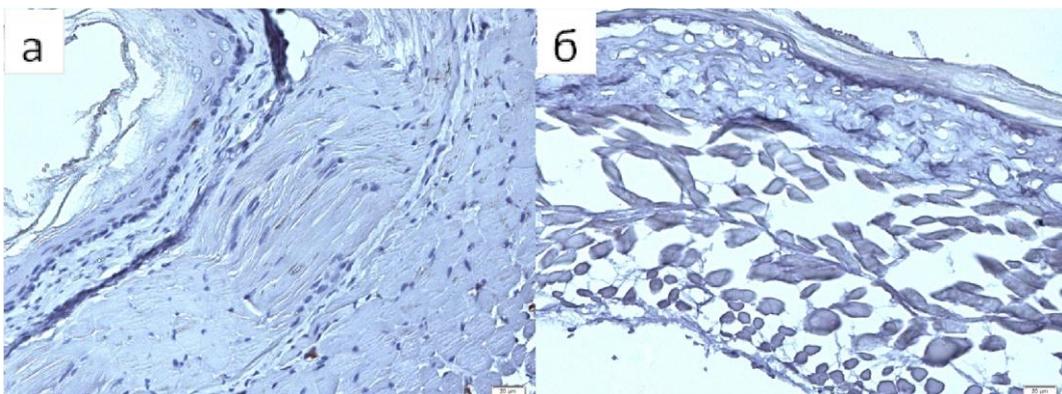
сосуды (до 4–5 мкм) ТИК пищевода, это делает данный метод наиболее предпочтительным при оценке процессов ангиогенеза. В децеллюляризованном пищеводе нет структур, экспрессирующих маркер эндотелия (рисунок 3.23, 3.24).



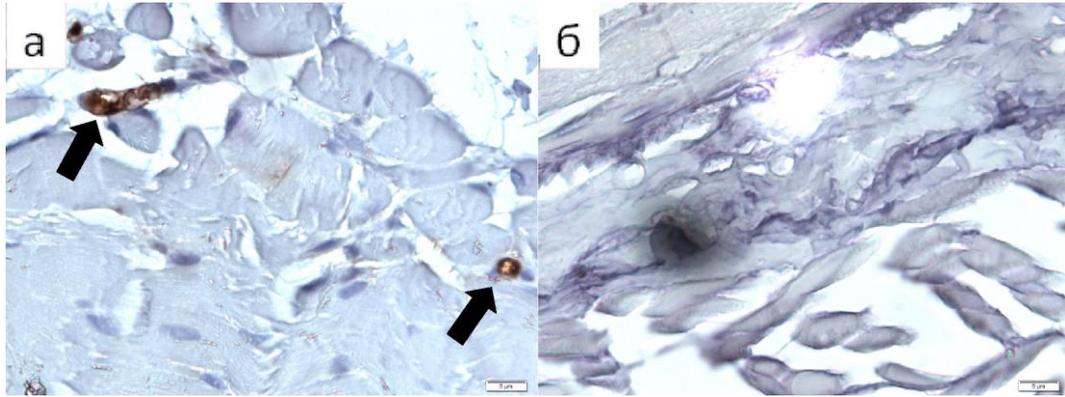
**Рисунок 3.21** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGF:  
а – нативный пищевод; б – децеллюляризованный пищевод; x200



**Рисунок 3.22** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGF:  
а – нативный пищевод; б – децеллюляризованный пищевод; x1000



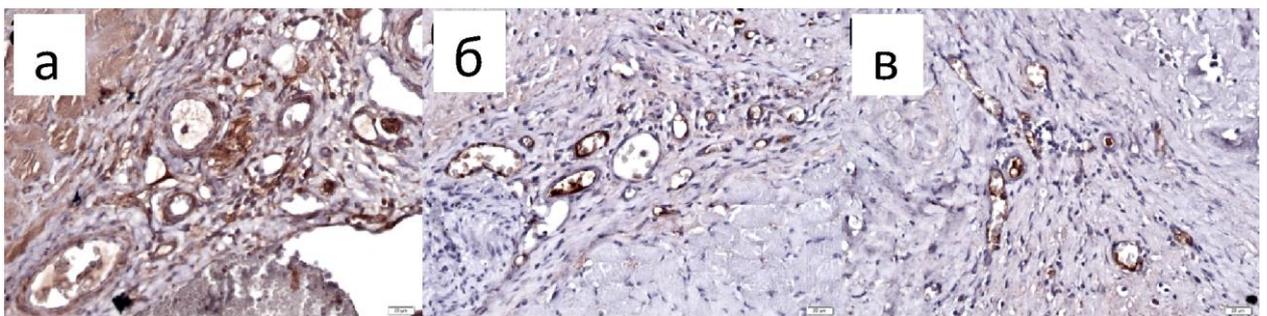
**Рисунок 3.23** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31:  
а – нативный пищевод; б – децеллюляризованный пищевод; x200



**Рисунок 3.24** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31:  
а – нативный пищевод; б – децеллюляризованный пищевод; x1000.  
Стрелками указаны сосуды

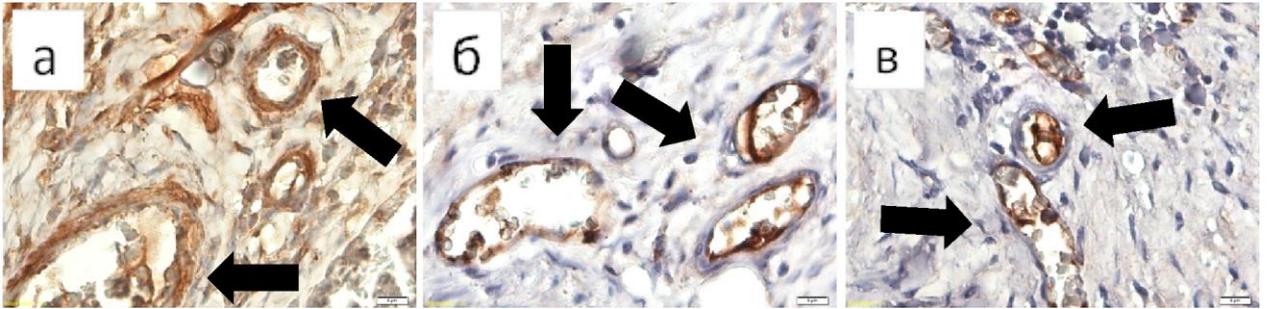
Описанные данные свидетельствуют, что процесс децеллюляризации приводит к полной элиминации CD31-позитивных клеток. Таким образом, в биологическом каркасе пищевода после децеллюляризации нарушается прежде всего структура сосудистой стенки.

Для характеристики сосудистой сети мы провели иммуногистохимическое изучение образцов ТИК пищевода с избирательным выявлением эндотелиальных клеток. В стенке имплантированного децеллюляризованного пищевода выявлены сосуды, большая часть сосудов обнаруживалась на границе с нативным пищеводом (рисунок 3.25, 3.26).



**Рисунок 3.25** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGF, имплантация в область брюшной части децеллюляризованного пищевода:  
а – 7; б – 14; в – 21 сутки, x200

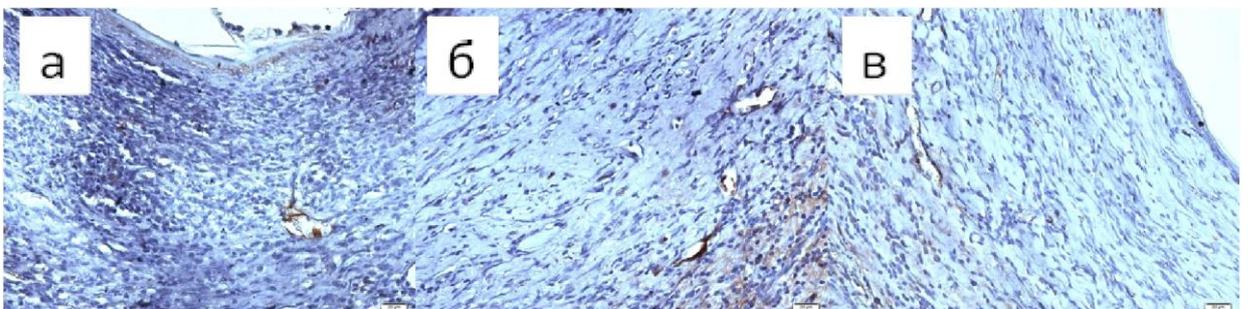
На 7-е сутки после имплантации экспрессия VEGF в ТИК пищевода проявлялась позитивной реакцией стромы и эндотелия сосудов, что свидетельствует об активации процессов ангиогенеза и образовании новой



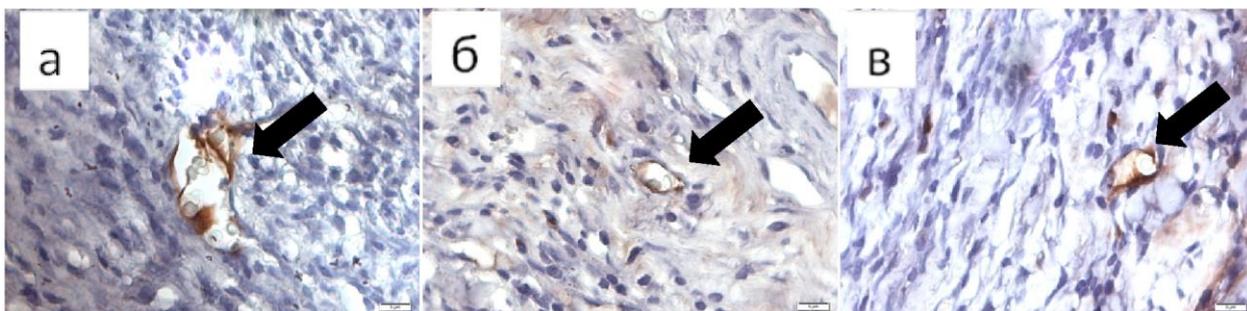
**Рисунок 3.26** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к VEGF, имплантация в область брюшной части децеллюляризованного пищевода:  
а – 7; б – 14; в – 21 сутки, x1000. Стрелками указаны сосуды

сосудистой сети. Позитивное окрашивание регистрировалось в полнокровных сосудах, диаметр которых на границе с нативным пищеводом достигал 12 мкм (рисунок 3.25 а; рисунок 3.26 а). На 14-е сутки окрашивание ДАВ-хромогеном выявлялось в основном в сосудах, экспрессия в строме была ниже чем на 7-е сутки после трансплантации. В имплантате выявлялись тонкостенные сосуды диаметром до 10 мкм. На границе ТИК и нативного пищевода выявлялись сосуды большего калибра, чем в самой ТИК пищевода (рисунок 3.25 б; рисунок 3.26 б). На 21-е сутки экспрессия VEGF в ТИК пищевода проявлялась позитивной реакцией в эндотелии сосудов диаметром до 9 мкм (рисунок 3.25 в; рисунок 3.26 в).

На 7-е сутки после имплантации экспрессия CD31 в ТИК пищевода проявлялась позитивной реакцией в эндотелии сосудов. Это были сосуды разного калибра (от 4 до 14 мкм), которые распределялись по всему объему ткани (рисунок 3.27 а; рисунок 3.28 а).



**Рисунок 3.27** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31, имплантация в область брюшной части рецеллюляризованного пищевода:  
а – 7; б – 14; в – 21 сутки, x200

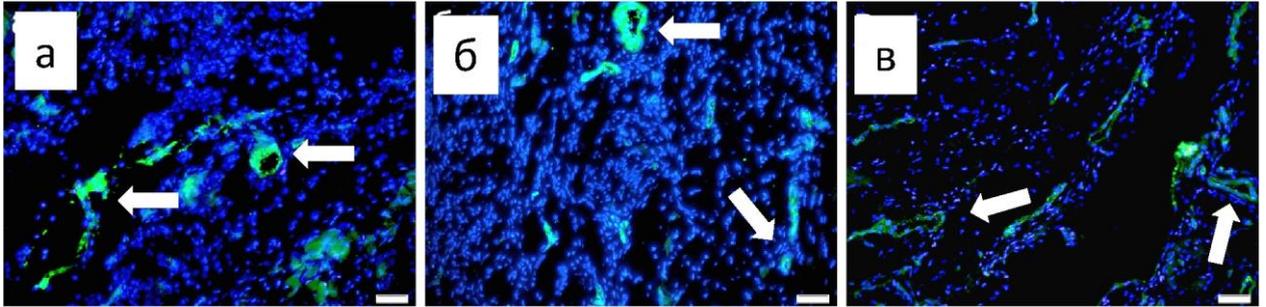


**Рисунок 3.28** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31, имплантация в область брюшной части рецеллюляризованного пищевода:  
а – 7; б – 14; в – 21 сутки, x1000. Стрелками указаны сосуды

На 14-е сутки окрашивание сохранялось в сосудах, наиболее крупных (до 12 мкм), которые располагались на границе с нативным пищеводом (рисунок 3.27 б; рисунок 3.28 б). На 21-е сутки экспрессия CD31 в ТИК пищевода проявлялась позитивной реакцией в эндотелии сосудов, диаметр которых достигал 10 мкм (рисунок 3.27 в; рисунок 3.28 в). Выявление CD31-позитивных сосудов, распределенных по всему объему ткани, свидетельствует о том, что данные участки тканей хорошо кровоснабжаются.

При исследовании криосрезов эксплантированного децеллюляризованного пищевода выявлялась позитивная реакция с фактором фон Виллебранда (рисунок 3.29 а–в). На 7-е после имплантации экспрессия фактора фон Виллебранда в ТИК пищевода проявлялась позитивной реакцией в эндотелии крупных сосудов диаметром до 16 мкм. Большая часть флуоресцирующих сосудистых структур выявлялась в участках ТИК, находившихся в контакте с нативным пищеводом. Данный факт может быть связан с тем, что основными мишенями окрашивания при использовании антител к фактору фон Виллебранда были крупные и средние сосуды (рисунок 3.29 а). На 14-е сутки выявлялось свечение в сосудах диаметром до 13 мкм, наиболее крупные из которых располагались на границе с нативным пищеводом (рисунок 3.29 б). На 21-е сутки экспрессия фактора фон Виллебранда в ТИК пищевода проявлялась позитивной реакцией в эндотелии крупных сосудов, диаметр которых достигал 11 мкм (рисунок 3.29 в). Сосуды

малого калибра с помощью данного метода достоверно не выявлялись во всех образцах. Данный маркер может использоваться не только для морфологической, но и для функциональной оценки активности эндотелия сосудов.



**Рисунок 3.29** – Иммуногистохимическая реакция с антителами к фактору Виллебранда, имплантация в область брюшной части децеллюляризованного пищевода:  
а – 7; б – 14; в – 21 сутки, x200. Стрелками указаны сосуды

Образование новой зрелой сосудистой сети по всему объему ткани способно обеспечивать перфузию достаточного количества крови для обеспечения всех клеток ТИК кислородом и питательными веществами. При этом полученные результаты указывают на то, что исходной сохранение сосудистой сети в процессе децеллюляризации пищевода не является критическим фактором, так как восстановление кровоснабжения ТИК, вероятно, происходит в основном за счет врастания сосудов со стороны нативного пищевода, но под влиянием ангиогенных факторов, которые содержатся в биологическом каркасе. Можно утверждать, ТИК пищевода, которая включает в себя культуру МСК, обеспечивает более интенсивное образование кровеносных сосудов в области имплантации, что должно обеспечивать более интенсивное замещение собственными тканями и ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса. По-видимому, проангиогенный эффект аллогенных МСК реализуется за счет паракринных механизмов – продукцией ангиогенных факторов и поляризации М2-макрофагов.

## ГЛАВА 4.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

При создании нами тканеинженерного пищевода возникла проблема подбора подходящего протокола децеллюляризационной обработки, который позволял бы эффективно элиминировать клеточный компонент органа, снижая при этом антигенность каркаса, но при этом способствовали сохранению структуры внеклеточного матрикса. Создание универсального для всех тканей и органов протокола децеллюляризации представляется невозможным, поскольку требования к нему могут различаться в связи с разной плотностью тканей и целей создания каркаса (Д.П. Самчук и др., 2017). Максимально полная элиминация клеточных элементов из биологического каркаса с применением жестких параметров децеллюляризационной обработки тканей сопровождается обширными повреждениями структуры и нарушению состава ВКМ. Снижения выраженности воспалительной реакции и фиброзных изменений после пересадки можно достичь элиминацией определенного (оптимального) количества клеточных антигенов, содержащихся в биологическом каркасе (Р.З. Накохов и др., 2017). Сохранение биомеханической прочности является одним из ключевых моментов в процессе создания ТИК пищевода. Данный факт связан с тем, что пищевод в процессе функционирования подвергается значительным нагрузкам и растягивается, соответственно, он должен обладать определенными эластическими свойствами. Тканеинженерный пищевод должен иметь характеристики, максимально соответствующие свойствам ВКМ нативного органа (G. Totonelli et al., 2012; G. Totonelli et al., 2013; Р.З. Накохов и др., 2017).

Наши исследования показали, что дезоксихолат натрия является оптимальным детергентом при создании тканеинженерного пищевода, так как в децеллюляризированной ткани органа не нарушалась исходная

локализация белков ВКМ (ламелина, коллагена IV типа, фибронектина). Данные компоненты выявлялись в основном в области базальной мембраны. Сохранение основных элементов базальной мембраны в процессе децеллюляризационной обработки должно обеспечивать оптимальную адгезию и пролиферацию засеянных на биологический каркас клеток. Применение восстанавливающих агентов может привести к элиминации коллагена IV типа, так как дисульфидные связи лежат в основе его полимеризации. Именно они, также как и лизин-гидроксилизиновые связи, способствуют образованию тетрамерной структуры из четырех трехспиральных мономеров коллагена IV типа (П.П. Яблонский и др., 2015). Следует также учитывать, от взаимодействия эндотелия с компонентами ВКМ зависят процессы миграции и пролиферации эндотелиальных клеток при формировании сосудистой сети. Кроме того, следует учитывать, что VEGF165 и VEGF121 способны связываться с компонентами ВКМ. Воздействие протеолитических ферментов приводит к их высвобождению из ВКМ. Процесс регенерации тканей сопровождается повышением концентрации VEGF-A с последующей активацией механизмов ангиогенеза. На следующем этапе происходит стабилизация эндотелиоцитов во вновь образованной сосудистой сети. VEGF-A в условиях отсутствия перицитов оказывает значительное влияние на процессы ангиогенеза путем торможения апоптотической гибели эндотелиальных клеток в незрелых сосудистых структурах (М.В. Мнихович и др., 2013).

На основании полученных нами результатов можно утверждать, что ацеллюлярный матрикс пищевода, изготовленный методом децеллюляризации, создает микроокружение, необходимое для оптимальной жизнедеятельности клеток как *in vitro*, так и в организме животного. Это подтверждается тем, что клетки сохраняли метаболическую активность на каркасе после имплантации. Биологический каркас, изготовленный этим путем децеллюляризации способен к стимуляции пролиферации

соответствующей клеточной линии в течение репопуляции, в том числе и эндотелиоцитов, с помощью процесса презентации лигандов и различных биологически активных молекул (А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова, 2013; М.В. Мнихович и др., 2013).

Одним из результатов модификации протокола стало обеспечение щадящего режима обработки пищевода, что способствовало уменьшению его растяжения в процессе децеллюляризационной обработки. Максимально возможное сохранение физических свойств (эластичности) биологического каркаса, является одной из основных задач в процессе создания ТИК пищевода. Связано это с тем, что ТИК должна спадаться в условиях функционального покоя органа и в то же время обладать достаточными эластическими свойствами для обеспечения продвижения пищевого комка (Р.М. Срапо et al., 2011).

В условиях применения разработанного авторского протокола общая продолжительность децеллюляризационной обработки материала составила 29 ч 10 мин. При этом, следует отметить, что время агрессивного воздействия детергента составляет 3 ч. Период активного воздействия децеллюляризирующих веществ является одним из важнейших моментов, от которого зависит максимально возможное сохранение компонентов и структуры ВКМ. Сохранность анатомо-гистологических свойств ВКМ пищевода в условиях щадящего режима децеллюляризационной обработки является важнейшим условием в процессе создания ТИК.

К повышению качества децеллюляризации пищевода приводят следующие факторы:

- повышение скорости подачи растворов, что приводит к повышению гидростатического давления в просвете пищевода;

- увеличение времени воздействия детергента (4 % дезоксихолат натрия);

- увеличение времени промывки пищевода раствором PBS (Р.З. Накохов и др., 2017).

Следует учитывать, что указанные параметры влияют не только на качество децеллюляризации пищевода, но и на биомеханические свойства биологического каркаса. Увеличение скорости подачи растворов и времени промывки раствором PBS приводит к растяжению пищевода и увеличению площади просвета органа. Увеличение времени воздействия детергента приводит к выраженному повреждению внеклеточного матрикса, снижению содержания факторов, которые способствуют активации ангиогенеза после трансплантации тканеинженерной конструкции. Кроме того, следует учитывать, что при последующей рецеллюляризации биологического каркаса МСК токсическое воздействие остатков детергента может привести к нарушению процесса адгезии клеток к матрикс, что приведет в дальнейшем к невозможности реализации их функций. Исследования по оценке влияния остатков детергентов на МСК после промывки каркасов подтверждают данный факт (Д.С. Сергеевичев и др., 2013). Доказано, что количество промывок каркаса влияет на степень токсичности остатков децеллюлярирующих агентов на МСК. При этом следует учитывать, что длительная промывка биологического каркаса пищевода раствором PBS приводит к снижению его биомеханических свойств. Многократное и длительное промывание раствором PBS может привести снижению качества и потере биомеханических свойств биологического каркаса, что недопустимо. Подбор оптимальных параметров и времени промывки каркаса раствором PBS позволяет максимально снизить остаточное количество детергентов и провести успешную рецеллюляризацию биологических каркасов с помощью МСК (Д.С. Сергеевичев и др., 2013).

Процесс децеллюляризационной обработки тканей и органов направлен на оптимальное удаление клеточного материала (при одновременном сохранении исходной структуры и состава ВКМ) с применением различных способов воздействия (Р.З. Накохов и др., 2017; Е.А. Губарева и др., 2012). Использование децеллюляризованных тканей в

качестве биологических каркасов основано на том, что основными носителями антигенов являются клетки, которые ответственны за инициацию реакции отторжения трансплантата. Компоненты ВКМ обеспечивают для культивируемых клеток функционально адекватное микроокружение (Н. Wang et al., 2015; N. Momtahan et al., 2015; А.Б. Шехтер и др., 2015; T.J. Keane et al., 2015; П.Ю. Шалковская и др., 2017; И.А. Васютин и др., 2017; Ю.В. Белов и др., 2018). Исследования показали, что ацеллюлярные матриксы имеют определенные свойства и могут быть использованы в процессе разработки естественного биологического каркаса для ТИК (Е.А. Губарева и др., 2012; R.H. Fu et al., 2014; P.T. Moser et al., 2014; L.F. Tapias et al., 2014; G. Agmon et al., 2016; T.J. Keane et al., 2016; A.H.A. Zahmati et al., 2017; A. Schmitt et al., 2017).

В настоящее время ведется активная разработка ТИК, состоящих из каркаса и культивируемых на нем клеток различных типов и степени дифференцировки: гладкомышечных клеток и эпителиоцитов, фибробластов, стволовых и других. Большое внимание уделяется архитектонике и составу каркасов, так как кроме оптимальных механических свойств, которые необходимы для успешного хирургического использования, они должны способствовать адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток. Кроме того, они должны быть биосовместимыми (не обладать токсическими, иммуногенными и аллергогенными свойствами), биорезорбируемыми (причем резорбция должна осуществляться в течение заданного временного периода), не сопровождаться воспалительной реакцией и в дальнейшем замещаться собственными нативными тканями организма. Каркас должен обладать пористостью, которая будет способствовать миграции клеток и прорастанию в него сосудов реципиента для питания и приживания ТИК (А.Б. Шехтер и др., 2015; D.A. Taylor et al., 2018).

Большинство исследователей одним из важнейших условий считают биосовместимость каркасов с клетками, так как от этого зависит дальнейшая

судьба используемого ТИК. Необходимо понимание не только того как клетки реагируют на микроокружение, которое представлено компонентами каркаса, но и оценивать реакцию организма трансплантат (на тканевом и системном уровнях) (Р.З. Накохов и др, 2017; И.В. Гилевич, 2017).

Каркасы должны по своей архитектонике, механическим свойствам, биосовместимости способствовать восстановлению ткани и в той или иной степени имитировать ее. Биологические каркасы получают при децеллюляризационной обработке нативного органа, обеспечивая оптимальный уровень элиминации клеток при максимально возможной сохранности архитектоники и механических свойств (А.В. Косулин, 2018). Матрикс, полученные путем динамической децеллюляризации в биореакторе, характеризуются увеличенной силой и напряжением разрыва при оценке их прочности. Вероятно процесс децеллюляризации оказывает влияние на биомеханические свойства получаемого каркаса (А.В. Черных и др., 2017).

Попытки исследователей разработать ТИК для замещения участков пищевода не позволили решить существующие проблемы в области биоинженерии данного органа. Применение метода децеллюляризационной обработки материала с целью снижения иммуногенных свойств приводило к развитию побочных эффектов, которые были связаны с использованием данной методики. Успешная трансплантация ТИК пищевода в основном зависит от иммуногенных характеристик биологического каркаса. Но не стоит забывать о том, что не менее важной задачей в процессе создания биоинженерного пищевода является максимально возможное снижение отрицательных эффектов децеллюляризационной обработки биологического материала (G. Totonelli et al., 2012; G. Totonelli et al., 2013; С.Т. Турсуналиев и др., 2015; О. Syed et al., 2014; Е.А. Губарева и др., 2012; Р.З. Накохов и др., 2017).

Детергенты, используемые при децеллюляризационной обработке, должны способствовать разрушению клеток и элиминации их компонентов

из окружающих тканей. Кроме того, они должны оказывать минимальное повреждающее воздействие на ВКМ. Для этого возможно использование кислот, оснований, гипо- и гипертонических растворов, ферментов, хелатирующих веществ, спиртов, а также физических методов децеллюляризации. Следует учитывать, что для понижения иммуногенности биологического каркаса гибели клеток недостаточно, потому что присутствующие в тканях клеточные элементы могут ускорить процесс биодegradации каркаса. Данные вещества также могут отрицательно влиять на ВКМ, нарушая его механические свойства. Необходимыми параметрами для разрушения клеток, элиминации клеточных элементов и снижения повреждающего воздействия на структуру и состава ВКМ обладают детергенты (П.П. Яблонский и др., 2015).

ВКМ рассматривается в соответствии с его значением в поддержании структуры и формы определенного органа. Он является динамическим соединением с соответствующей клеточной популяцией. Фенотип определенной популяции, в том числе белковый состав, генетический профиль, функциональность, зависит от микроокружения, включающего определенные факторы (рН, концентрация кислорода, биохимию и механические силы среды (А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова, 2013). Резидентные клетки способны секретировать молекулы, способствующие оптимальному функционированию и коммуникации с окружающими клетками. ВКМ может быть использован как индуктивный каркас, который будет способствовать ремоделированию тканей после хирургической операции. Механизм данного процесса заключается в высвобождении латентных пептидов, которые являются хемоаттрактантами и митогенами для эндогенных стволовых и прогениторных клеток. Кроме того, обеспечиваются модуляция врожденного иммунного ответа и молекулярные стимулы для поддержания фенотипа и функции клеток, что приводит к их тканеспецифической дифференцировке (А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова, 2013).

Компоненты ВКМ формируют пространственную пористую структуру матрикса, определяющую его биомеханические свойства. Они же обеспечивают распространение в тканях питательных субстратов и миграцию клеток-предшественников (S.A. Hurd et al., 2015; В.Н. Александров и др., 2017). Выбор в пользу максимально щадящих параметров децеллюляризационной обработки биологического материала приводит к менее выраженному повреждению ВКМ и оказывает положительное влияние на биомеханические и ангиогенные свойства ТИК. Они являются важными биофизическими параметрами, так как оказывают влияние на морфологию клеток, их дифференцировку и пролиферацию (G. Totonelli et al., 2012; G. Totonelli et al., 2013; Р.З. Накохов и др., 2017).

Методика получения биологического каркаса оказывает влияние на дальнейшую реакцию окружающих тканей на имплантацию ТИК. При недостаточной отмывке после процесса децеллюляризации в организме реципиента может возникнуть иммунная реакция на биологический каркас, которая приведет к быстрой деградаци и отсутствию лечебного эффекта (Д.П. Самчук и др., 2017). Доказано, что недостаточно полная элиминация клеточных компонентов нарушает восстановительные процессы после трансплантации ТИК. В процессе децеллюляризационной обработки ткани требуется максимальное соблюдение баланса между максимальной промывкой биологического каркаса от клеточных элементов и сохранением структуры и компонентов ВКМ (Д.П. Самчук и др., 2017).

Одним из основных моментов после трансплантации тканеинженерной конструкции пищевода является активация механизмов регенерации, интеграции тканеинженерного органа с окружающими тканями (G. Totonelli et al., 2013). Исследования показали, что СК (кроме костного мозга) содержатся в определенных нишах различных органов (в легком, верхних дыхательных путях, эпидермисе, в мышцах, мозге и т.д.) и участвуют в процессах репарации и регенерации (И.В. Гилевич, 2017). Число данных

клеток не велико, и они находятся в состоянии покоя. Активация таких клеток происходит при определенных условиях, в частности, при повреждении тканей и органов.

Остается открытым вопрос о том, за счет какого механизма МСК участвуют в процессах тканевого заживления. Это может происходить путем их активации непосредственно в очаге повреждения, либо за счет миграции МСК из ниш (костного мозга) в периферическую кровь (И.В. Гилевич, 2017).

Важное значение, с точки зрения разработки подходящих методов тканевой инженерии, имеет морфологический анализ ТИК в процессе их биологической резорбции после пересадки реципиенту (В. Papeburg, 2009; N.F. Huang и др., 2011; T.J. Keane et al., 2012; А.Б. Шехтер и др., 2015).

Подкожная имплантация биологических каркасов является важным этапом при изучении качества децеллюляризации тканей и органов. Она позволяет оценить эффективность удаления клеточно-ассоциированных белки и их влияние на тканевую реакцию после имплантации (И.В. Гилевич, 2017). Кроме этого, данная процедура позволяет оценить реакцию на остаточные количества детергента, которые, возможно, адгезировали к ВКМ.

Нами было отмечено, срок биодеградаци ТИК в основном определяется количеством остаточной ДНК в децеллюляризованном органе. Уменьшение количества остаточной ДНК в биологическом каркасе в процессе децеллюляризационной обработки пищевода сопровождается увеличением срока биологической деградации ТИК. При этом количество остаточной ДНК в биологическом каркасе напрямую зависит от скорости перфузии пищевода растворами, продолжительности воздействия детергента. Кроме того, большую роль играет процесс промывки каркаса раствором PBS на заключительном этапе. Реакция окружающих тканей на имплантацию определяется не только качеством децеллюляризационной обработки биологического материала и эффективностью элиминации клеточных антигенов, но проведенной предимплантационной подготовкой образца.

Важным фактором, определяющим успех трансплантации, является максимальное соблюдение стерильности на всех этапах создания ТИК пищевода. Морфологический анализ подкожных имплантатов позволяет оценить биосовместимость на тканевом уровне ТИК пищевода (Е.В. Куевда и др., 2017).

Полученные нами результаты также позволяют рассматривать подкожную имплантацию децеллюляризованных каркасов как важный этап оценки тканевой реакции на имплантацию ТИК пищевода. Необходимо всестороннее изучение данной методики, которая может дать ответ на многие вопросы, в частности, является ли источник каркаса или метод его обработки главным фактором, определяющим ответную реакцию организма реципиента (Сотниченко и др., 2018).

Ангиогенез играет ключевую роль в тканевой инженерии пищевода. Отсутствие адекватного кровоснабжения после трансплантации ТИК пищевода может привести к его ишемическому некрозу. Быстрая васкуляризация трансплантированной ТИК пищевода необходима для выживания клеток и интеграции с окружающими трансплантат тканями. Проангиогенный эффект биологического каркаса может в значительной степени ускорить регенеративные процессы после трансплантации ТИК пищевода и способствовать образованию новой сосудистой сети.

Проведение иммуногистохимического анализа для оценки ангиогенных свойств ТИК, которые были имплантированы подкожно, мы считаем нецелесообразным. При морфологическом анализе гетеротопических имплантатов децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода в стенке имплантов выявлялось больше сосудов, чем при имплантации ТИК в область брюшной части пищевода. Связано это с тем, что подкожная жировая клетчатка обильно кровоснабжается и не моделирует те условия, в которых оказывается ТИК после имплантации в область брюшной части пищевода.

В биологических каркасах, получаемых методом децеллюляризации, сохраняется структура органа, в том числе относительно сохранная сосудистая сеть. Сохранность сосудистой сети органа при создании ТИК пищевода методом децеллюляризации не является критическим фактором. Объясняется это тем, что кровоснабжение пищевода носит сегментарный характер, что подразумевает наличие разных источников кровоснабжения для шейного, грудного и брюшного отделов пищевода (G. Totonelli et al., 2012; G. Totonelli et al., 2013). Такой тип кровоснабжения исключает возможность микрохирургического соединения сосудистой сети тканеинженерного пищевода с сосудистой системой реципиента, так как отсутствует единый магистральный сосуд, кровоснабжающий орган. Восстановление кровоснабжения трансплантата, вероятно, осуществляется за счет образования новой сосудистой сети, в частности путем врастания сосудов со стороны нативного пищевода (Е.В. Куевда и др, 2017).

Происхождение эндотелиоцитов, формирующих сосудистую сеть в тканеинженерной конструкции пищевода, определяется наиболее вероятным механизмом васкуляризации – врастание капилляров из соседних тканей реципиента. При этом МСК могут оказывать паракринное влияние на формирование и стабилизацию сосудистых структур (А.Ю. Ефименко и др, 2011). Сосудистая сеть в толще тканеинженерной конструкции пищевода может быть сформирована из мигрировавших в нее прогениторных эндотелиальных клеток из костного мозга реципиента (G. Totonelli et al., 2012; G. Totonelli et al., 2013; Р.З. Накохов и др., 2017).

Накопление в тканях при гипоксии индуцибельного фактора с последующей активацией синтеза проангиогенных факторов, в частности VEGF, это естественный механизм, который направлен на адекватную компенсацию ишемии тканей за счет формирования новой сосудистой сети и улучшения микроциркуляции (Е.А. Великанова и др, 2014). Наши исследования показали, что процесс децеллюляризации не приводит к

полному удалению данного фактора. Это подтверждается обнаружением молекул в биологическом каркасе пищевода при иммуногистохимическом исследовании. Распределение VEGF в тканях нативного и децеллюляризованного пищевода остается одинаковым до и после процесса децеллюляризации. Сохранение молекул VEGF в биологическом каркасе должно способствовать активации эндотелиальных клеток и формированию сосудистой сети в ТИК пищевода после трансплантации (Е.А. Великанова и др, 2014).

Иммуногистохимические исследования с антителами к CD31 и фактору фон Виллебранда широко используются для оценки процессов ангиогенеза в различных тканях. Наши исследования показали превосходство использования маркера эндотелия CD31 над фактором фон Виллебранда при оценке ангиогенных процессов в ТИК пищевода после трансплантации. Связано это с тем, что использование маркера CD31 позволяет выявить даже самые мелкие сосуды в трансплантате, в то время как позитивная реакция на фактор фон Виллебранда выявлялась главным образом в крупных сосудах. Преимуществом использования антител к фактору фон Виллебранда является возможность оценки функциональной активности эндотелия. Таким образом, CD31 является наиболее чувствительным маркером при исследовании сосудистой сети в ТИК пищевода, но оценка функциональной активности эндотелия возможна при использовании антител к фактору фон Виллебранда. Учитывая тот факт, что CD31-позитивные клетки были полностью элиминированы в процессе децеллюляризации (о чем свидетельствуют данные иммуногистохимического исследования), обнаружение данного маркера в ТИК пищевода после трансплантации свидетельствует о формировании новой сосудистой сети. Выявление фактора фон Виллебранда в ТИК пищевода подтверждает данный факт.

Разработка ТИК пищевода позволит решить как этические, так и иммунологические проблемы трансплантологии. Тканевая инженерия

должна обеспечить разработку и применение имплантируемых, длительно функционирующих ТИК пищевода. Данные ТИК должны способствовать созданию специализированной ткани пищевода. Это приведет к развитию в зоне повреждения органа восстановительного (дефибрирующего) типа регенерации. Данный тип регенерации предпочтительнее, чем заместительный (фиброзирующий) тип. Для решения этих задач в ТИК должны присутствовать низкодифференцированные тканеспецифичные клетки. Таковыми являются прогениторные непаренхиматозные и паренхиматозные клетки, которые обладают высоким дифференцировочным, а также пролиферативным потенциалом. Они способны оказывать положительное влияние на клеточно-матриксные и клеточно-клеточные взаимоотношения. Кроме того, данные клетки способны регулировать свою тканеспецифическую активность при прикреплении к биodeградируемым и биосовместимым каркасам (выполняющим функции ВКМ) (Н.А. Онищенко и др., 2015).

## ВЫВОДЫ

1. Модифицированный способ децеллюляризации пищевода крысы с применением дезоксихолата натрия и ДНКазы позволяет обеспечить щадящий режим обработки биологического материала, что способствует достаточно полному удалению клеточного компонента органа и сохранению структуры внеклеточного матрикса (коллаген IV типа, ламинин, фибронектин) и биомеханических свойств биологического каркаса.

2. После децеллюляризации уровень остаточной ДНК достоверно снижается до 8 %, но сохраняются структурные белки внеклеточного матрикса (коллаген IV типа, ламинин, фибронектин), которые не обладают видовой специфичностью и антигенной активностью.

3. Биологический каркас на основе децеллюляризованного пищевода не является токсичным для мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (200 000 кл.), способствует их адгезии, с сохранением жизнеспособности и метаболической активности.

4. Анализ биологической совместимости тканеинженерной конструкции пищевода с аллогенными мезенхимными стволовыми клетками костного мозга, а также результаты имплантаций *in vivo* не выявили наличия признаков реакции тканевого отторжения имплантата.

5. Тканеинженерная конструкция пищевода на основе биологического каркаса, полученного методом децеллюляризации, обладает проангиогенными свойствами, о чем свидетельствует выявление в нем молекул VEGF, а также обнаружение сосудов в стенке имплантированного тканеинженерного пищевода.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для лучшего сохранения проангиогенных и биомеханических свойств биологического каркаса пищевода крысы, полученного методом децеллюляризации нативного органа, рекомендуется скорость перфузии 6 мл/мин.

2. При статичной рецеллюляризации децеллюляризованного пищевода нанесение клеток на биологический каркас необходимо производить с внешней и внутренней (просвет органа) стороны с целью их равномерного распределения.

3. При морфологическом анализе образцов децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода следует учитывать, что результаты при подкожной имплантации и имплантации в область брюшной части пищевода могут отличаться по выраженности процессов биодegradации и восстановления кровоснабжения образцов (преобладание данных процессов при подкожной имплантации), в связи с разными условиями в указанных анатомических зонах.

4. Оценку проангиогенных свойств тканеинженерной конструкции пищевода необходимо производить после имплантации образцов непосредственно в анатомическую область расположения нативного органа.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

<b>Ang</b>	– angiopoietin
<b>BDNF</b>	– brain-derived neurotrophic factor
<b>CD</b>	– cluster of differentiation
<b>DAPI</b>	– 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>FGF</b>	– fibroblast growth factor
<b>GDNF</b>	– cell line-derived neurotrophic factor
<b>GFP</b>	– green fluorescent protein
<b>GIMP</b>	– GNU image manipulation program
<b>HGF</b>	– hepatocyte growth factor
<b>HIF</b>	– hypoxia-inducible factor
<b>IGF</b>	– insulin-like growth factor
<b>iPSC</b>	– induced pluripotent stem cells
<b>KDR</b>	– kinase insert domain receptor
<b>MMPs</b>	– matrix metalloproteinases
<b>NGF</b>	– nerve growth factor
<b>NO</b>	– оксид азота
<b>Oct</b>	– octamer-binding transcription factor
<b>PA</b>	– plasminogen activator
<b>PCL</b>	– polycaprolactone
<b>PDGF</b>	– platelet-derived growth factor
<b>TGF</b>	– transforming growth factor
<b>TIFF</b>	– tagged image file format
<b>TNF</b>	– tumor necrosis factor
<b>TSP</b>	– thrombospondin
<b>VASH</b>	– vasohibin
<b>VEGF</b>	– vascular endothelial growth factor
<b>VEGFR</b>	– vascular endothelial growth factor receptor

- АФК** – активные формы кислорода
- ВКМ** – внеклеточный матрикс
- Г-КСФ** – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
- иРНК** – информационная РНК
- МНС** – major histocompatibility complex
- МСК** – мезенхимные стволовые клетки
- ПЭК** – предшественники эндотелиальных клеток
- СК** – стволовые клетки
- ТИК** – тканеинженерная конструкция
- ХСН** – хроническая сердечная недостаточность
- ЭДТА** – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЭСК** – эмбриональные стволовые клетки

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверин, В. И. Первый опыт реваскуляризации трансплантата при пластике пищевода у детей в нестандартных ситуациях / В. И. Аверин, В. Н. Подгайский, Л. Н. Нестерук [и др.] // Новости хирургии. – 2012. – Т. 20. – № . 1. – С . 80–84.

2. Агапова, О. И. Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка для регенеративной медицины / О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, М. М. Мойсенович [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. 17. – № 2. – С. 37–44.

3. Александров, В. Н. Трансплантация тканеинженерной трахеи как альтернативы аллогенной трахеи / В. Н. Александров, Л. И. Калюжная-Земляная, Д. В. Фирсанов [и др.] // Вестник хирургии имени ИИ Грекова. – 2017. – Т. 176. – № . 4. – С. 110–114.

4. Белевич, В. Л. Доброкачественные стенозы пищевода и его анастомозов : состояние проблемы / В. Л. Белевич, Д. В. Овчинников // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2012. – № . 1. – С. 309–313.

5. Белов, Ю. В. Применение заплаты из децеллюляризованного ксеноперикарда в хирургии брахиоцефальных артерий / Ю. В. Белов, А. В. Лысенко, П. В. Леднев [и др.] // Kardiologia i Serdechno-Sosudistaya Khirurgia. – 2018. – Т. 11. – № . 2. – С. 31–34.

6. Васильев, А. В. «Дорожная карта» регенеративной медицины / А. В. Васильев, М. Батин // Гены и клетки. – 2010. – Т. 5. – № . 2. – С. 89–90.

7. Васютин, И. А. Реконструкция уретры с помощью технологий тканевой инженерии / И. А. Васютин, А. В. Люндуп, А. З. Винаров [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72. – № . 1. – С. 17–25.

8. Вашакмадзе, Л. А. Выбор варианта реконструкции у больных, перенесших одномоментные или последовательные вмешательства на пищеводе и желудке / Л. А. Вашакмадзе, В. М. Хомяков, В. В. Черемисов // Медицинский альманах. – 2011. – № 5. – С. 49–59.

9. Великанова, Е. А. Влияние сосудисто-эндотелиального ростового фактора в свободной и липосомальной формах на ангиогенез в условиях экспериментального инфаркта миокарда / Е.А. Великанова, А. С. Головкин, Р. А. Мухамадияров // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10. – С. 482–486.

10. Воротников, А. В. Направленная миграция и мезенхимальные прогениторные клетки : участие в воспалении, репарации и регенерации ткани / А. В. Воротников, Ю. Г. Суздальцева, Ю. П. Рубцов [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина. – 2012. – С. 57–91.

11. Гилевич, И. В. Тканеинженерные конструкции на основе синтетического каркаса и недифференцированных костномозговых моноклеарных клеток в лечении стенозов трахеи : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.17 / Гилевич Ирина Валериевна. – Краснодар, 2017. – С. 99.

12. Губарева, Е. А. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс / Е. А. Губарева, А. С. Сотниченко, И. В. Гилевич [и др.] // Гены и клетки. – 2012. – Т. 7. – № 4. – С. 38–45

13. Губарева, Е. А. Децеллюляризация пищевода низших приматов / Е. А. Губарева, С. Сьоквист, А. С. Сотниченко [и др.] // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 4. – С. 64–69.

14. Ефименко, А. Ю. Влияние возраста на ангиогенные свойства мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани / А. Ю. Ефименко, Е. Е. Старостина, Н. И. Калинина [и др.] // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6. – № 3. – С. 48–57.

15. Закирова, Е. Ю. Выделение, анализ и применение аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани

собаки для лечения ложного сустава большеберцовой кости / Е. Ю. Закирова, М. Н. Журавлева, Р. Ф. Масгутов [и др.] // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 3. – С. 70–75.

16. Искакова, С. С., Жармаханова Г. М., Характеристика проангиогенных факторов и их патогенетическая роль / С. С. Искакова, Г. М. Жармаханова, М. Дворацка // Наука и здравоохранение. – 2014. – № 4. – С. 17–27.

17. Калинина, Н. И. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей / Н. И. Калинина, В. Ю. Сысоева, К. А. Рубина [и др.] // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2011. – Т. 3. – № 4. – С. 32–39.

18. Климашевич, А. В. Профилактика и лечение рубцовых стриктур пищевода / А. В. Климашевич, В. И. Никольский, О. В. Богонина // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 4. – С. 63–68.

19. Климашевич, А. В. Результаты миниинвазивного лечения постожоговых рубцовых стриктур пищевода / А. В. Климашевич // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журн. им. академика Б.В. Петровского. – 2014. – № 3. – С. 99–104.

20. Климович, В. Б. Иммуномодулирующая активность мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток / В. Б. Климович // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16. – № 2. – С. 107–126.

21. Королёв, М. П. Эндоскопическое лечение детей со стенозами пищевода различной этиологии / М. П. Королёв, С. В. Гольбиц, А. П. Иванов [и др.] // Вестник хирургии им. ИИ Грекова. – 2012. – Т. 171. – № 2. – С. 52–57.

22. Корсаков, И. Н. Тканеинженерные конструкции для восстановления скелетной мышечной ткани / И. Н. Корсаков, Д. П. Самчук, И. И. Еремин [и др.] // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – № 1. – С. 34–37.

23. Косулин, А. В. и др. Тканеинженерные конструкции для компенсации синдрома короткой // Вестник Военно-медицинской академии. – 2018. – Т. 62. – № 2. – С. 259–264.

24. Куевда, Е.В. и др. Подходы к решению проблемы выбора каркасов биоинженерных органов / Е. В.Куевда, Е. А. Губарева, А. С. Сотниченко [и др.] // Материалы Первой всероссийской научной конференции молодых ученых-медиков «Инновационные технологии в медицине XXI века». 6–7 ноября 2012. Москва. – С. 295–297.

25. Куевда, Е. В. и др. Эффективность предимплантационной рецеллюляризации ацеллюлярных матриксов пищевода крыс на примере использования gfr-позитивных клеток / Е. В.Куевда, Е. А. Губарева, Р. З. Накохов [и др.] // Цитология. – 2017 – Т. 59. – № 10. – С. 711–717.

26. Куртукова, М. О. Факторы, регулирующие ангиогенез / М. О. Куртукова, И. О. Бугаева, А. Н. Иванов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 246.

27. Лызиков, А. Н. Стволовые клетки в регенеративной медицине : достижения и перспективы / А. Н. Лызиков, Б. Б. Осипов, А. Г. Скуратов [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – Т. 45. – № 3. – С. 4–8.

28. Макаревич, П. И. Трансплантация клеточных пластов из мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани эффективно индуцирует ангиогенез в ишемизированных скелетных мышцах / П. И. Макаревич, М. А. Болдырева, К. В. Дергилёв [и др.] // Гены & Клетки. – 2015. – Т. 10. – № 3. – С. 67–68.

29. Маслов, Л. Н. Гипоксическое прекондиционирование стволовых клеток как новый подход к повышению эффективности клеточной терапии инфаркта миокарда / Л. Н. Маслов, Ю. К. Подоксенов, А. Г. Портниченко [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 12. – С. 16–25.

30. Мнихович, М. В. Ангиогенез : морфогенетические механизмы, роль межклеточных взаимодействий / М. В. Мнихович, Д. Гершзон, М. Брикман // *Biomedical and biosocial anthropology*. – 2013. – № 20. – С. 226–236.

31. Мурашко, Д. С. Диагностика и реконструктивные хирургические вмешательства при заболеваниях искусственного пищевода / Д. С. Мурашко, В. М. Дурлештер // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 1. – С. 140–147.

32. Накохов, Р. З. Морфологическая оценка качества децеллюляризации пищевода крыс / Р. З. Накохов, Е. А. Губарева, Е. В. Куевда [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2017. – Т. 19. – № 2. – С. 98–103.

33. Непомнящих, Л. М. Регенерация миокарда : Пролиферативный потенциал кардиомиоцитов и индукция кардиомиогенеза при альтеративной и пластической недостаточности сердца / Л. М. Непомнящих, Е. Л. Лушникова, П. М. Ларионов [и др.] // *Вестник РАМН*. – 2010. – Т. 5. – С. 3–11.

34. Онищенко, Н. А. Разработка имплантируемых клеточно- и тканеинженерных конструкций вспомогательной печени для лечения печёночной недостаточности / Н. А. Онищенко, Ю. С. Гулай, М. Ю. Шагидулин [и др.] // *Гены и клетки*. – 2015. – Т. 10. – № 1. – С. 6–17.

35. Попандопуло, А. Г. Бесклеточный экстрацеллюлярный матрикс как основа тканеинженерного трансплантата сердечного клапана / А. Г. Попандопуло, М. В. Петрова // *Клітинна та органна трансплантологія*. – 2013. – № 1. – С. 48.

36. Рукша, Т. Г. Внеклеточный матрикс кожи : роль в развитии дерматологических заболеваний / Т. Г. Рукша, М. Б. Аксененко, Г. М. Климина [и др.] // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2013. – № 6. – С. 32–39.

37. Самчук, Д. П. Методические подходы к созданию тканеинженерных мышечных графтов / Д. П. Самчук, А. А. Пулин, И. И. Еремин [и др.] // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2017. – Т. 2. – № 4. – С. 80–85.

38. Севастьянов, В. И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / В. И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 16. – № 3. – С. 93–108.

39. Севастьянова, В. В. Стимуляция ангиогенеза матрицами из поликапролактона, содержащими VEGF / В. В. Севастьянова, Г. Ю. Васюков, В. В. Борисов [и др.] // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2013. – № 4. – С. 28–34.

40. Сергеевичев, Д. С. Децеллюляризация как способ предотвращения активации иммунного ответа на аллогенные легочные клапаны сердца / Д. С. Сергеевичев, В. В. Сергеевичева, А. И. Субботовская [и др.] // Гены и клетки. – 2013. – Т. 8. – № 4. – С. 55–60.

41. Сергеевичев, Д. С. Токсическое влияние детергентов на мезенхимальные стромальные клетки человека при заселении графтов / Д. С. Сергеевичев, В. В. Сергеевичева, А. И. Субботовская [и др.] // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2013. – № 2. – С. 67–71.

42. Скажутина, Т. В. Внутрисветные дилатирующие методы лечения доброкачественных рубцовых структур пищевода / Т. В. Скажутина, В. Л. Цепелев, А. В. Степанов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 277–277.

43. Сотниченко, А. С. Децеллюляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца / А. С. Сотниченко, Е. А. Губарева, И. В. Гилевич [и др.] // Гены и клетки. – 2013. – Т. 8. – № 3. – С. 86–94.

44. Сотниченко, А. С. и др. К вопросу о морфологических критериях децеллюляризации органов и тканей / А. С. Сотниченко, Е. А. Губарева,

Е. В. Куевда [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19. – № 3. – С. 65–69.

45. Турсуналиев, С. Т. Получение бесклеточного матрикса пищевода овец для тканевой инженерии / С. Т. Турсуналиев, А. К. Наханов, Ж. К. Кыдырбаев [и др.] // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2015. – № 2. – С. 500–503.

46. Ханвердиев, Р. А. Сравнительный обзор методов пластики пищевода у детей с атрезией пищевода / Р. А. Ханвердиев, А. Ю. Разумовский // Детская хирургия. – 2012. – № 2. – С. 47–50.

47. Хмельницкая, К. А. Современные представления о клеточно-молекулярных механизмах ангиогенеза / К. А. Хмельницкая, А. Я. Гудкова, Е. В. Шляхто // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика ИП Павлова. – 2015. – Т. 22. – № 1. – С. 6–13.

48. Хрусталева, М. В. Современная концепция эндоскопического лечения рубцовых стриктур пищевода и пищеводных анастомозов / М. В. Хрусталева, Э. А. Годжелло, Ю. И. Галлингер // Хирургия. Журнал им. НИ Пирогова. – 2013. – № 2. – С. 97–104.

49. Черных, А. В. К вопросу о перспективах развития тканевой инженерии (обзор литературы) / А. В. Черных, Ю. В. Малеев, А. Н. Шевцов [и др.] // Оренбургский медицинский вестник. – 2016. – Т. 4. – № 4. – С. 68–77.

50. Черных, А. В. Современные направления трансплантологии с использованием высокотехнологичных методик / А. В. Черных, Ю. В. Малеев, А. Н. Шевцов [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2017. – Т. 10. – № 2. – С. 96–102.

51. Чикинев, Ю. В. Комплексная оценка результатов эзофагогастропластики / Ю. В. Чикинев, Е. А. Дробязгин, В. Г. Кулико [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2010. – Т. 30. – № 5. – С. 106–112.

52. Чикинев, Ю. В. Пластика пищевода при его доброкачественных сужениях / Ю. В. Чикинев, Е. А. Дробязгин, А. В. Коробейников [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2009. – Т. 2. – № 2. – С. 37–40.

53. Шалковская, П. Ю. Спектроскопия комбинационного рассеяния для оценки процесса децеллюляризации клапанов сердца баранов / П. Ю. Шалковская, Д. С. Трапезников, П. Е. Тимченко // Аспирантские чтения – 2017. – 2017. – С. 247–248.

54. Шалькевич, Л. В. Перспективы трансплантации стволовых клеток в лечении детского церебрального паралича / Л. В. Шалькевич, О. В. Алейникова, Я. И. Исайкина [и др.] // Медицинские новости. – 2016. – № 10. – С. 4–8.

55. Шехтер, А. Б. Морфология коллагеновых матриц для тканевой инженерии (биосовместимость, биodeградация, тканевая реакция) / А. Б. Шехтер, А. Е. Гуллер, Л. П. Истранов [и др.] // Архив патологии. – 2015. – Т. 77. – № 6. – С. 29–38.

56. Шурыгин, М. Г. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина // Сибирский научный медицинский журнал. – 2010. – Т. 30. – № 6. – С. 89–92.

57. Яблонский, П. П. Тканевая инженерия атриовентрикулярного клапана : децеллюляризованная матрица на модели митрального аллогraftа овцы / П. П. Яблонский, С. Чеботарь, И. Тудораки [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т. 17. – № 1. – С. 74–85.

58. Ackbar, R. Decellularized ovine esophageal mucosa for esophageal tissue engineering / R. Ackbar, H. Ainoedhofer, M. Gugatschka [et al.] // Technology and Health Care. – 2012. – Vol. 20. – № 3. – P. 215–223.

59. Agmon, G. Controlling stem cell behavior with decellularized extracellular matrix scaffolds / G. Agmon, K. L. Christman // Current Opinion in Solid State and Materials Science. – 2016. – Vol. 20. – № 4. – P. 193–201.

60. Ahluwalia, A. Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 $\alpha$  in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing / A. Ahluwalia, A. S. Tarnawski // *Current medicinal chemistry*. – 2012. – Vol. 19. – № 1. – P. 90–97.

61. Anderson, J. D. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling / J. D. Anderson, H. J. Johansson, C. S. Graham [et al.] // *Stem Cells*. – 2016. – Vol. 34. – № 3. – P. 601–613.

62. Arenas-Herrera, J. E. Decellularization for whole organ bioengineering / J. E. Arenas-Herrera, I. K. Ko, A. Atala [et al.] // *Biomedical materials*. – 2013. – Vol. 8. – № 1. – P. 014106.

63. Badylak, S. F. Esophageal preservation in five male patients after endoscopic inner-layer circumferential resection in the setting of superficial cancer : a regenerative medicine approach with a biologic scaffold / S. F. Badylak, T. Hoppo, A. Nieponice [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2011. – Vol. 17. – № 11. – P. 1643–1650.

64. Badylak, S. F. Whole-organ tissue engineering : decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds / S. F. Badylak, D. Taylor, K. Uygun // *Annual review of biomedical engineering*. – 2011. – Vol. 13. – P. 27–53.

65. Bartaula-Brevik, S. Angiogenic and immunomodulatory properties of endothelial and mesenchymal stem cells / S. Bartaula-Brevik, T. O. Pedersen, A. Finne-Wistrand [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2016. – Vol. 22. – № 3–4. – P. 244–252.

66. Bertassoni, L. E. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs / L. E. Bertassoni, M. Cecconi, V. Manoharan [et al.] // *Lab on a Chip*. – 2014. – Vol. 14. – № 13. – P. 2202–2211

67. Berthiaume, F. Tissue engineering and regenerative medicine : history, progress, and challenges / F. Berthiaume, T. J. Maguire, M. L. Yarmush // *Annual review of chemical and biomolecular engineering*. – 2011. – Vol. 2. – P. 403–430.

68. Bieback, K. Mesenchymal stromal cells (MSCs) : science and f(r)iction / K. Bieback, P. Wuchter, D. Besser [et al.] // *Journal of Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 90. – № 7. – P. 773–782.

69. Bonvillain, R. W. A nonhuman primate model of lung regeneration : detergent-mediated decellularization and initial in vitro recellularization with mesenchymal stem cells / R.W. Bonvillain, S. Danchuk, D.E. Sullivan [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2012. – Vol. 18. – № 23–24. – P. 2437–2452.

70. Brown, B. N. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction / B.N. Brown, S.F. Badylak // *Translational Research*. – 2014. – Vol. 163. – № 4. – P. 268–285.

71. Caplan, A. I. The MSC : an injury drugstore / A. I. Caplan, D. Correa // *Cell Stem Cell*. – 2011. – № 9. – P. 11–15.

72. Catry, J. Circumferential Esophageal Replacement by a Tissue-engineered Substitute Using Mesenchymal Stem Cells : An Experimental Study in Mini Pigs / J. Catry, M. Luong-Nguyen, L. Arakelian [et al.] // *Cell transplantation*. – 2017. – Vol. 26. – № 12. – P. 1831–1839.

73. Chan, V. Fabrication and characterization of optogenetic, multi-strip cardiac muscles / V. Chan, D. M. Neal, S. G. Uzel [et al.] // *Lab on a Chip*. – 2015. – Vol. 15. – № 10. – P. 2258–2268.

74. Chian, K. S. Regenerative medicine for oesophageal reconstruction after cancer treatment / K. S. Chian, M. F. Leong, K. Kono // *The Lancet Oncology*. – 2015. – Vol. 16. – № 2. – P. e84–e92.

75. Chouinard-Pelletier, G. Increased shear stress inhibits angiogenesis in veins and not arteries during vascular development / G. Chouinard-Pelletier, E. D. Jahnsen, E. A. Jones // *Angiogenesis*. – 2013. – Vol. 16. – № 1. – P. 71–83.

76. Chung, E. J. Development of an omentum-cultured oesophageal scaffold reinforced by a 3D-printed ring : feasibility of an in vivo bioreactor / E. J. Chung, H. W. Ju, Y. K. Yeon [et al.] // *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. – 2018. – P. 1–11.

77. Chung , E. J. Three-layered scaffolds for artificial esophagus using poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers and silk fibroin : An experimental study in a rat model / E. J. Chung, H. W. Ju, H. J. Park [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2015. – Vol. 103. – № 6. – P. 2057–2065.

78. Crapo, P. M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P. M. Crapo, T. W. Gilbert, S. F. Badylak // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – № 12. – P. 3233–3243.

79. Dorati, R. Design of 3D scaffolds for tissue engineering testing a tough polylactide-based graft copolymer / R. Dorati, C. Colonna, C. Tomasi [et al.] // *Materials Science and Engineering : C*. – 2014. – Vol. 34. – P. 130–139.

80. Dorati, R. Design of a Bioabsorbable Multilayered Patch for Esophagus Tissue Engineering / R. Dorati, A. De Trizio, S. Marconi [et al.] // *Macromolecular bioscience*. – 2017. – Vol. 17. – № 6. – P. 1600426.

81. Dua, K. S. In-vivo oesophageal regeneration in a human being by use of a non-biological scaffold and extracellular matrix / K. S. Dua, W. J. Hogan, A. A. Adam [et al.] // *The Lancet*. – 2016. – Vol. 388. – № 10039. – P. 55–61.

82. Edgar, L. Heterogeneity of scaffold biomaterials in tissue engineering / L. Edgar, K. McNamara, T. Wong [et al.] // *Materials*. – 2016. – Vol. 9. – № 5. – P. 332.

83. Fagiani, E. Angiopoietins in angiogenesis / E. Fagiani, G. Christofori // *Cancer letters*. – 2013. – Vol. 328. – № 1. – P. 18–26.

84. Fishman, J. M. Decellularized rabbit cricoarytenoid dorsalis muscle for laryngeal regeneration / J. M. Fishman, T. Ansari, P. Sibbons [et al.] // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2012. – Vol. 121. – № 2. – P. 129–138.

85. Fitzpatrick, L. E. Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications / L. E. Fitzpatrick, T. C. McDevitt // *Biomaterials science*. – 2015. – Vol. 3. – № 1. – P. 12–24.

86. Fu, R. H. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering / R. H. Fu, Y. C. Wang, S. P. Liu [et al.] // *Cell transplantation*. – 2014. – Vol. 23. – № 4–5. – P. 621–630.

87. Galie, P. A. Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting / P. A. Galie, D. H. Nguyen, C. K. Choi // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 111. – № 22. – P. 7968–7973.

88. Garreta, E. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting / E. Garreta, R. Oria, C. Tarantino [et al.] // *Materials Today*. – 2017. – Vol. 20. – № 4. – P. 166–178.

89. Gelinsky, M. Bioreactors in tissue engineering : Advances in stem cell culture and three-dimensional tissue constructs / M. Gelinsky, A. Bernhardt, F. Milan // *Engineering in Life Sciences*. – 2015. – Vol. 15. – № 7. – P. 670–677.

90. Gilbert, T. W. Strategies for tissue and organ decellularization / T. W. Gilbert // *Journal of cellular biochemistry*. – 2012. – Vol. 113. – № 7. – P. 2217–2222.

91. Gilpin, S. E. Perfusion decellularization of human and porcine lungs : Bringing the matrix to clinical scale / S. E. Gilpin, J. P. Guyette, G. Gonzalez [et al.] // *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. – 2014. – Vol. 33. – № 3. – P. 298–308.

92. Goel, S. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases / S. Goel, D. G. Duda, L. Xu // *Physiological reviews*. – 2011. – Vol. 91. – № 3. – P. 1071–1121.

93. Gubareva, E. A. Morphological evaluation of the quality decellularization heart and diaphragm of rats / E. Gubareva, A. Sotnichenko, I. Gilewicz [et al.] // *Cell Implant and tissue engineering*. – 2012. – Vol. 3. – P. 22–27.

94. Guyette, J. P. Perfusion decellularization of whole organs / J. P. Guyette, S. E. Gilpin, J. M. Charest [et al.] // *Nature protocols*. – 2014. – Vol. 9. – № 6. – P. 1451.

95. Hagen, C. K. High contrast microstructural visualization of natural acellular matrices by means of phase-based x-ray tomography / C. K. Hagen, P. Maghsoudlou, G. Totonelli [et al.] // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 18156.

96. Han, T. T. Y. Adipose-derived stromal cells mediate in vivo adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds / T. T. Han, S. Toutounji, B. G. Amsden [et al.] // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 72. – P. 125–137.

97. Hashimoto, T. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch / T. Hashimoto, F. Shibasaki // *Frontiers in pediatrics*. – 2015. – Vol. 3. – P. 33.

98. He, M., Callanan, A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs / M. He, A. Callanan // *Tissue Engineering Part B : Reviews*. – 2012. – Vol. 19. – № 3. – P. 194–208.

99. Hoch, E., Tovar, G. E. M., Borchers, K. Bioprinting of artificial blood vessels : current approaches towards a demanding goal / E. Hoch, G. E. Tovar, K. Borchers // *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. – 2014. – Vol. 46. – № 5. – P. 767–778.

100. Hofmann, A. D. BioVaM in the rat model : a new approach of vascularized 3D tissue for esophageal replacement / A. D. Hofmann, A. Hilfike, A. Haverich [et al.] // *European Journal of Pediatric Surgery*. – 2015. – Vol. 3. – № 2. – P. 181–188.

101. Hoshiba, T. Decellularized matrices for tissue engineering / T. Hoshiba, H. Lu, N. Kawazoe [et al.] // *Expert opinion on biological therapy*. – 2010. – Vol. 10. – № 12. – P. 1717–1728.

102. Hrebikova, H. Chemical decellularization : a promising approach for preparation of extracellular matrix / H. Hrebikova, D. Diaz, J. Mokry // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. – 2015. – Vol. 159. – № 1. – P. 12–17.

103. Huang, Y. C. The potential role of microvesicles in mesenchymal stem cell-based therapy / Y. C. Huang, O. Parolini, L. Deng // *Stem Cells Dev*. – 2013. – Vol. 22. – № 6 – C. 841–844.

104. Huang, N. F. Regulation of the matrix microenvironment for stem cell engineering and regenerative medicine / N. F. Huang, S. Li // *Ann. Biomed. Eng.* – 2011. – Vol. 39 – № 4. – P. 1201–1214.

105. Hurd, S. A. Development of a biological scaffold engineered using the extracellular matrix secreted by skeletal muscle cells / S. A. Hurd, N. M. Bhatti, A. M. Walker [et al.] // *Biomaterials.* – 2015. – Vol. 49. – P. 9–17.

106. Jacobs, S. A. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells / S. A. Jacobs, V. D. Roobrouck, C. M. Verfaillie [et al.] // *Immunology and cell biology.* – 2013. – Vol. 91. – № 1. – P. 32–39.

107. Jeffries, E. M. Highly elastic and suturable electrospun poly (glycerol sebacate) fibrous scaffolds / E. M. Jeffries, R. A. Allen, J. Gao [et al.] // *Acta biomaterialia.* – 2015. – Vol. 18. – P. 30–39.

108. Jin, G. Electrospun three-dimensional aligned nanofibrous scaffolds for tissue engineering / G. Jin, R. He, B. Sha [et al.] // *Materials Science and Engineering : C.* – 2018. – Vol. 92. – P. 995–1005.

109. Jung, J. P. Solid organ fabrication : comparison of decellularization to 3D bioprinting / J. P. Jung, D. B. Bhuiyan, B. M. Ogle // *Biomaterials research.* – 2016. – Vol. 20. – № 1. – P. 27.

110. Kanai, N. Cell sheets engineering for esophageal regenerative medicine / N. Kanai, M. Yamato, T. Okano // *Annals of translational medicine.* – 2014. – Vol. 2. – № 3. – P. 1–4.

111. Kawasaki, T. Novel detergent for whole organ tissue engineering / T. Kawasaki, Y. Kirita, D. Kami [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* – 2015. – Vol. 103. – № 10. – P. 3364–3373.

112. Keane, T. J. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response / T. J. Keane, R. Londono, N. J. Turner [et al.] // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – № 6. – P. 1771–1781.

113. Keane, T. J. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance / T. J. Keane, I. T. Swinehart, S. F. Badylak // *Methods*. – 2015. – Vol. 84. – P. 25–34.

114. Keane, T. J., Saldin, L. T., Badylak, S. F. Decellularization of mammalian tissues : preparing extracellular matrix bioscaffolds / T. J. Keane, L. T. Saldin, S. F. Badylak [et al.] // *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*. – 2016. – P. 75–103.

115. Khademhosseini, A. Progress in tissue engineering / A. Khademhosseini, J. P. Vacanti, R. Langer // *Scientific American*. – 2009. – Vol. 300. – № 5. – P. 64–71.

116. Kim, B. S. Recellularization of decellularized human adipose-tissue-derived extracellular matrix sheets with other human cell types / B. S. Kim, J. S. Choi, J. D. Kim [et al.] // *Cell and tissue research*. – 2012. – Vol. 348. – № 3. – P. 559–567.

117. Kisliouk, T. Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells / T. Kisliouk, N. Levy, A. Hurwitz [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2003. – Vol. 88. – № 8. – P. 3700–3707.

118. Koch, S. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors / S. Koch, S. Tugues, X. Li [et al.] // *Biochemical journal*. – 2011. – Vol. 437. – № 2. – P. 169–183.

119. Ku, D. D. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries / D. D. Ku, J. K. Zaleski, S. Liu [et al.] // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 1993. – Vol. 265. – № 2. – P. 586–592.

120. Kuppan, P. PCL and PCL-gelatin nanofibers as esophageal tissue scaffolds : optimization, characterization and cell-matrix interactions / P. Kuppan, S. Sethuraman, U. M. Krishnan // *J Biomed Nanotechnol*. – 2013. – Vol. 9. – № 9. – P. 1540–55.

121. Kuppan, P. Tissue engineering interventions for esophageal disorders—promises and challenges / P. Kuppan, S. Sethuraman, U. M. Krishnan. // *Biotechnology advances*. – 2012. – Vol. 30. – № 6. – P. 1481–1492.

122. La Francesca, S. Long-term regeneration and remodeling of the pig esophagus after circumferential resection using a retrievable synthetic scaffold carrying autologous cells / S. La Francesca, J. M. Aho, M. R. Barron [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 4123.

123. Lawler, P. R., Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and-2 / P. R. Lawler, J. Lawler // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2012. – Vol. 2. – № 5. – P. a006627.

124. Lee, E. Decellularized material as scaffolds for tissue engineering studies in long gap esophageal atresia / E. Lee, A. Milan, L. Urbani [et al.] // *Expert opinion on biological therapy*. – 2017. – Vol. 17. – № 5. – P. 573–584.

125. Li, Y. Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering / Y. Li, H. Meng, Y. Liu // *The Scientific World Journal*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–10.

126. Lim, M. L. Whole Organ and Tissue Reconstruction in Thoracic Regenerative Surgery / M. L. Lim, P. Jungebluth, F. Ajalloueiian [et al.] // *Mayo Clinic Proceedings*. – Elsevier, 2013. – Vol. 88. – № 10. – P. 1151–1166.

127. Lopatina, T. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves : BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo / T. Lopatina, N. Kalinin a, M. Karagyaur [et al.] // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6. – № 3. – P. e17899.

128. Luc, G. Decellularized and matured esophageal scaffold for circumferential esophagus replacement : Proof of concept in a pig model / G. Luc, G. Charles, C. Gronnier [et al.] // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 175. – P. 1–18.

129. Luo, Y. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on graphene oxide-incorporated electrospun poly (lactic-co-glycolic acid) nanofibrous mats / Y. Luo, H. Shen, Y. Fang [et al.] // *ACS applied materials & interfaces*. – 2015. – Vol. 7. – № 11. – P. 6331–6339.

130. Mathapati, S. Qualitative and quantitative detection of sodium deoxycholic acid in decellularized tissue / S. Mathapati, S. Galla, K. Sankaranarayanan & // Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. – 2010. – Vol. 26. – № 2. – P. 129–131.

131. Matsumoto, K. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours / K. Matsumoto, M. Ema // The Journal of Biochemistry. – 2014. – Vol. 156. – № 1. – P. 1–10.

132. Melchiorri, A. J. Mesenchymal stem cells : roles and relationships in vascularization / A. J. Melchiorri, B. N. Nguyen, J. P. Fisher // Tissue Engineering Part B : Reviews. – 2014. – Vol. 20. – № 3. – P. 218–228.

133. Miller, J. S. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues / J. S. Miller, K. R. Stevens, M. T. Yang [et al.] // Nature materials. – 2012. – Vol. 11. – № 9. – P. 768–774.

134. Moll, G. Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses / G. Moll, R. Jitschin, L. von Bahr [et al.] // PloS one. – 2011. – Vol. 6. – № 7. – P. e21703.

135. Momtahan, N. Strategies and processes to decellularize and recellularize hearts to generate functional organs and reduce the risk of thrombosis / N. Momtahan, S. Sukavaneshvar, B. L. Roeder // Tissue Engineering Part B : Reviews. – 2014. – Vol. 21. – № 1. – P. 115–132.

136. Moser, P. T. Recellularization of organs : what is the future for solid organ transplantation? / P. T. Moser, H. C. Ott // Current opinion in organ transplantation. – 2014. – Vol. 19. – № 6. – P. 603–609.

137. Mueller, M. Mesenchymal stem/stromal cells—a key mediator for regeneration after perinatal morbidity? / M. Mueller, T. G. Wolfs, A. Schoeberlein [et al.] // Molecular and cellular pediatrics. – 2016. – Vol. 3. – № 1. – P. 6.

138. Murphy, M. B. Mesenchymal stem cells : environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine / M. B. Murphy, K. Moncivais,

A. I. Caplan // *Experimental & molecular medicine*. – 2013. – Vol. 45. – № 11. – P. e54.

139. Murphy, S. V. 3D bioprinting of tissues and organs / S. V. Murphy, A. Atala // *Nature biotechnology*. – 2014. – Vol. 32. – № 8. – P. 773.

140. Murphy, S. V. Organ engineering—combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation / S. V. Murphy, A. Atala // *Bioessays*. – 2013. – Vol. 35. – № 3. – P. 163–172.

141. Nieponice, A. Patch esophagoplasty : esophageal reconstruction using biologic scaffolds / A. Nieponice, F. F. Ciotola, F. Nachman [et al.] // *Ann Thorac Surg*. – 2014. – Vol. 97. – № 1. – P. 283–288.

142. Nillesen, S. T. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen–heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF / S. T. Nillesen, P. J. Geutjes, R. Wismans [et al.] // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28. – № 6. – P. 1123–1131.

143. Norotte, C. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting / C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – № 30. – P. 5910–5917.

144. O'brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering / F. J. O'brien // *Materials today*. – 2011. – Vol. 14. – № 3. – P. 88–95.

145. Ohki, T. Application of regenerative medical technology using tissue-engineered cell sheets for endoscopic submucosal dissection of esophageal neoplasms / T. Ohki, M. Yamato, M. Ota [et al.] // *Digestive Endoscopy*. – 2015. – Vol. 27. – № 2. – P. 182–188.

146. Okuyama, H. Patch esophagoplasty using an in-body-tissue-engineered collagenous connective tissue membrane / H. Okuyama, S. Umeda, Y. Takama [et al.] // *Journal of pediatric surgery*. – 2018. – Vol. 53. – № 2. – P. 223–226.

147. Orlando, G. Cell and organ bioengineering technology as applied to gastrointestinal diseases / G. Orlando, J. Domínguez-Bendala, T. Shupe [et al.] // *Gut*. – 2013. – Vol. 62. – № 53. – P. 774–786.

148. Ozbolat, I. T. Bioprinting toward organ fabrication : challenges and future trends / I. T. Ozbolat, Y. Yu // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2013. – Vol. 60. – № 3. – P. 691–699.

149. Ozeki, M. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells / M. Ozeki, Y. Narita, H. Kagami [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2006. – Vol. 79. – № 4. – P. 771–778.

150. Papenburg, B. Design strategies for tissue engineering scaffold / B. Papenburg // The Netherlands : Gildeprint. – 2009. – P. 198.

151. Parisi, L. Tailoring the Interface of Biomaterials to Design Effective Scaffolds / L. Parisi, A. Toffoli, G. Ghiacci [et al.] // Journal of functional biomaterials. – 2018. – Vol. 9. – № 3. – P. 50.

152. Park, K. S. Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation / K. S. Park, Y. S. Kim, J. H. Kim [et al.] // Transplantation – 2010. – Vol. 89 – № 5. – P. 509–517.

153. Park, S. Y. Tissue-engineered artificial oesophagus patch using three-dimensionally printed polycaprolactone with mesenchymal stem cells : a preliminary report / S. Y. Park, J. W. Choi, J. K. Park [et al.] // Interactive cardiovascular and thoracic surgery. – 2016. – Vol. 22. – № 6. – P. 712–717.

154. Pati, F. Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration / F. Pati, D. H. Ha, J. Jang [et al.] // Biomaterials. – 2015. – Vol. 62. – P. 164–175.

155. Peloso, A. Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering / A. Peloso, A. Dhal, J. P. Zambon [et al.] // Stem cell research & therapy. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 107.

156. Poghosyan, T. Bioartificial oesophagus in the era of tissue engineering / T. Poghosyan, S. Gaujoux, R. Sfeir [et al.] // Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. – 2011. – Vol. 52. – P. 16–17.

157. Rankin, S. M. Chemokines and adult bone marrow stem cells / S. M. Rankin // Immunology letters. – 2012. – Vol. 145. – № 1–2. – P. 47–54.

158. Rastegar, F. Mesenchymal stem cells : Molecular characteristics and clinical applications / F. Rastegar, D. Shenaq, J. Huang [et al.] // World journal of stem cells. – 2010. – Vol. 2. – № 4. – P. 67.

159. Rouwkema, J. Vascularization and angiogenesis in tissue engineering : beyond creating static networks / J. Rouwkema, A. Khademhosseini // Trends in biotechnology. – 2016. – Vol. 37. – № 9. – P. 733–745.

160. Ruan, G. X. Lactate engages receptor tyrosine kinases Axl, Tie2, and vascular endothelial growth factor receptor 2 to activate phosphoinositide 3-kinase/Akt and promote angiogenesis / G. X. Ruan, A. Kazlauskas // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288. – № 29. – P. 21161–21172.

161. Rubina, K. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation / K. Rubina, N. Kalinina, A. Efimenko [et al.] // Tissue Engineering. – 2009. – Vol. 15. – № 8. – P. 2039–2050.

162. Scarritt, M. E. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs / M. E. Scarritt, N. C. Pashos, B. A. Bunnell // Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2015. – Vol. 3. – P. 43.

163. Schmitt, A. Optimized protocol for whole organ decellularization / A. Schmitt, R. Csiki, A. Tron [et al.] // European journal of medical research. – 2017. – Vol. 22. – № 1. – P. 31.

164. Shamloo, A. Matrix density mediates polarization and lumen formation of endothelial sprouts in VEGF gradients / A. Shamloo, S. C. Heilshorn // Lab on a Chip. – 2010. – Vol. 10. – № 22. – P. 3061–3068.

165. Sharma, R. R. Mesenchymal stem or stromal cells : a review of clinical applications and manufacturing practices / R. R. Sharma, K. Pollock, A. Hubel [et al.] // Transfusion. – 2014. – Vol. 54. – № 5. – P. 1418–1437.

166. Sheikh, F. A. Hybrid scaffolds based on PLGA and silk for bone tissue engineering / F. A. Sheikh, H. W. Ju, B. M. Moon [et al.] // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2016. – Vol. 10 – № 3– P. 209–221.

167. Shi, Z. et al. Enhanced endothelial differentiation of adipose-derived stem cells by substrate nanotopography / Z. Shi, K. G. Neoh, E. T. Kang [et al.] // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2014. – Vol. 8. – № 1. – P. 50–58.

168. Sohni, A. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking / A. Sohni, C. M. Verfaillie // *Stem cells international*. – 2013. – P. 8.

169. Song, J. J., Ott, H. C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds / J. J. Song, H. C. Ott // *Trends in molecular medicine*. – 2011. – Vol. 17. – № 8. – P. 424–432.

170. Spurrier, R. G. Murine and human tissue-engineered esophagus form from sufficient stem/progenitor cells and do not require microdesigned biomaterials / R. G. Spurrier, A. L. Speer, X. Hou [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2014. – Vol. 21. – № 5–6. – P. 906–915.

171. Stone, R. I. Advancements in Regenerative Strategies Through the Continuum of Burn Care / R. I. Stone, S. Natesan, C. J. Kowalczewski [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 672.

172. Syed, O. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering / O. Syed, N. J. Walters, R. M. Day [et al.] // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10. – № 12. – P. 5043–5054.

173. Tan, B. Tissue engineered esophagus by mesenchymal stem cell seeding for esophageal repair in a canine model / B. Tan, R. Q. Wei, M. Y. Tan [et al.] // *Journal of Surgical Research*. – 2013. – Vol. 182. – № 1. – P. 40–48.

174. Tan, J. Y. Esophageal tissue engineering : An in-depth review on scaffold design / J. Y. Tan, C. K. Chua, K. F. Leong [et al.] // *Biotechnology and bioengineering*. – 2012. – Vol. 109. – № 1. – P. 1–15.

175. Tapias L. F. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs / L. F. Tapias, H. C. Ott // *Current opinion in organ transplantation*. – 2014. – Vol. 19. – № 2. – P. 145.

176. Taylor, D. A. Decellularized Matrices in Regenerative Medicine / D. A. Taylor, L. C. Sampaio, Z. Ferdous [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2018. – Vol. 74. – P. 74–89.

177. Totonelli, G. A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration / G. Totonelli, P. Maghsoudlou, M. Garriboli [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – № 12. – P. 3401–3410.

178. Totonelli, G. Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration / G. Totonelli, P. Maghsoudlou, F. Georgiades [et al.] // *Pediatric surgery international*. – 2013. – Vol. 29. – № 1. – P. 87–95.

179. Totonelli, G. Esophageal tissue engineering : a new approach for esophageal replacement / G. Totonelli, P. Maghsoudlou, J. M. Fishman // *World J Gastroenterol*. – 2012. – Vol. 18. – № 47. – P. 6900–6907.

180. Urbani, L. Long-term cryopreservation of decellularised oesophagi for tissue engineering clinical application / L. Urbani, P. Maghsoudlou, A. Milan [et al.] // *PloS one*. – 2017. – Vol. 12. – № 6. – P. e0179341.

181. Villar, G. A tissue-like printed material / G. Villar, A. D. Graham, H. Bayley // *Science*. – 2013. – Vol. 340. – № 6128. – P. 48–52.

182. Wang, F. Regeneration of the oesophageal muscle layer from oesophagus acellular matrix scaffold using adipose-derived stem cells / F. Wang, Y. Maeda, V. Zachar [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2018. – Vol. 503. – № 1. – P. 271–277.

183. Wang, H. Decellularization technology in CNS tissue repair / H. Wang, X. F. Lin, L. R. Wang [et al.] // *Expert review of neurotherapeutics*. – 2015. – Vol. 15. – № 5. – P. 493–500.

184. Wheeler, J. B., Reed, C. E. Epidemiology of esophageal cancer / J. B. Wheeler, C. E. Reed // *Surgical Clinics of North America*. – 2012. – Vol. 92. – № 5. – P. 1077–1087.

185. Wolf, M. T. Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix / M. T. Wolf, K. A. Daly, J. E. Reing [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – № 10. – P. 2916–2925.

186. Wong, M. L., Griffiths, L. G. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation : antigen removal vs. decellularization / M. L. Wong, L. G. Griffiths // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10. – № 5. – P. 1806–1816.

187. Xing, Q. Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation / Q. Xing, K. Yates, M. Tahtinen [et al.] // *Tissue Engineering Part C : Methods*. – 2014. – Vol. 21. – № 1. – P. 77–87.

188. Yagi, H. Mesenchymal stem cells : mechanisms of immunomodulation and homing / H. Yagi, A. Soto-Gutierrez, B. Parekkadan [et al.] // *Cell transplantation*. – 2010. – Vol. 19. – № 6–7. – P. 667–679.

189. Ye, H. Polyester elastomers for soft tissue engineering / H. Ye, K. Zhang, D. Kai [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2018. . – Vol. 47. – № 12. – P. 4545–4580.

190. Zahmati, A. H. Chemical Decellularization Methods and Its Effects on Extracellular Matrix / A. H. Zahmati, R. Alipoor, A. R. Shahmirzadi [et al.] // *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*. – 2017. – Vol. 2. – № 3. – P. 76–83.

191. Zheng, Y. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis / Y. Zheng, J. Chen, M. Craven [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 24. – P. 9342–9347.

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО КубГМУ

 С.Н. Алексеенко«15» ноября 2019 г

## АКТ

## об использовании предложения

Наименование предложения: «Иммуногистохимическая оценка процессов ангиогенеза при трансплантации тканеинженерной конструкции пищевода»

Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Влияние процесса децеллюляризации на ангиогенные свойства тканеинженерной конструкции пищевода»

Исполнитель: аспирант кафедры общей и клинической патофизиологии Накохов Рамазан Заурбиевич

Научный руководитель: заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор Каде Азамат Халидович

Дата использования предложения: январь 2019

Основные результаты использования и их практическая значимость: Использование материалов работы для проведения занятий и лекций на кафедре гистологии с эмбриологией со студентами и ординаторами в рамках дисциплины «Гистология, цитология и эмбриология».

заведующая кафедрой гистологии с эмбриологией ФГБОУ ВО КубГМУ  
Минздрава России, доктор медицинских наук,  
профессор

Автор предложения

 Г.М. Могильная Р.З. Накохов

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО КубГМУ



С.Н. Алексеенко

«15» ноября 2019 г

## АКТ

## об использовании предложения

Наименование предложения: «Изучение механизмов ангиогенеза при создании тканеинженерных конструкций пищевода»

Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Влияние процесса децеллюляризации на ангиогенные свойства тканеинженерной конструкции пищевода»

Исполнитель: аспирант кафедры общей и клинической патофизиологии Накохов Рамазан Заурбиевич

Научный руководитель: заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор Каде Азамат Халидович

Дата использования предложения: сентябрь 2018

Основные результаты использования и их практическая значимость: Использование материалов работы для проведения занятий и лекций на кафедре общей и клинической патологической физиологии со студентами и ординаторами в рамках дисциплин «Патофизиология. Клиническая патофизиология», «Иммунология. Клиническая иммунология».

заведующий кафедрой общей и клинической  
патофизиологии ФГБОУ ВО КубГМУ  
Минздрава России, доктор медицинских наук,  
профессор  
Автор предложения



А.Х. Каде

Р.З. Накохов

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач ГБУЗ НИИ  
"ККБ №1 им. проф. С.В. Очаповского"  
министерства здравоохранения Краснодарского края

В.А. Порханов

«13» Октябрь 2019 г

АКТ

об использовании предложения

Наименование предложения: «Протокол децеллюляризации пищевода»

Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: кандидатская диссертация «Влияние процесса децеллюляризации на ангиогенные свойства тканеинженерной конструкции пищевода»

Исполнитель: аспирант кафедры общей и клинической патофизиологии Накохов Рамазан Заурбиевич

Научный руководитель: заведующий кафедрой общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор Каде Азамат Халидович

Дата использования предложения: май 2019

Основные результаты использования и их практическая значимость:

Предложенный протокол децеллюляризации пищевода позволят сохранить компоненты внеклеточного матрикса и биомеханические свойства биологического каркаса пищевода.

заведующий лабораторией разработки  
и изучения новых методов лечения

заболеваний НИИ «ККБ № 1 им. проф. С.В. Очаповского»,

кандидат медицинских наук

Автор предложения



И.В. Гилевич

Р.З. Накохов

