

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»**

На правах рукописи

Боброва Мария Михайловна

**Разработка и исследование скаффолдов на основе децеллюляризованной
ткани печени для биоинженерных конструкций**

14.01.24- трансплантология и искусственные органы

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

Агапов Игорь Иванович

Москва- 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Метод децеллюляризации как перспективная технология регенеративной медицины (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1. Технология децеллюляризации.....	13
1.2. Межклеточный матрикс печени.....	17
1.3. Децеллюляризации печени. Структура и состав полученного матрикса.....	19
1.4. Витализация печеночного матрикса и трансплантация рецеллюляризованной печени.....	23
1.5. Области применения технологии децеллюляризации.....	25
1.5.1. Децеллюляризация хряща.....	25
1.5.2. Децеллюляризация сухожилий.....	29
1.5.3. Децеллюляризация мышечной ткани.....	30
1.5.4. Децеллюляризация кости.....	30
1.5.5. Децеллюляризация сердца.....	31
1.5.6. Децеллюляризация почки.....	33
1.5.7. Децеллюляризация легких.....	33
1.5.8. Децеллюляризация мочевого пузыря.....	34
1.5.9. Децеллюляризация кишечника.....	35
1.6. Изделия на основе децеллюляризованного межклеточного матрикса.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1. Материалы.....	40
2.2. Клеточные линии.....	41
2.3. Лабораторные животные.....	42
2.4. Методы.....	42
2.4.1. Децеллюляризация печени крысы.....	42
2.4.2. Анализ сосудистого русла матрикса печени крысы.....	43
2.4.3. Гистологическое исследование.....	43
2.4.4. Изучение механических свойств децеллюляризованной ткани печени крысы.....	44
2.4.5. Изучение механических свойств полученных скаффолдов.....	45
2.4.6. Получение макрочастиц из децеллюляризованной ткани печени крысы.....	46
2.4.7. Получение микрочастиц из децеллюляризованной ткани печени крысы.....	46
2.4.8. Изготовление скаффолдов в виде пленок.....	47
2.4.9. Анализ содержания ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани.....	48
2.4.10. Анализ фракции остаточной ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани.....	49

2.4.11.	Анализ структуры образцов методом сканирующей электронной микроскопии.....	49
2.4.12.	Анализ структуры образцов методом сканирующей зондовой нанотомографии.....	50
2.4.13.	Анализ цитотоксичности образцов.....	51
2.4.14.	Анализ пролиферативной активности клеток на децеллюляризованном матриксе	52
2.4.15.	Анализ пролиферативной активности клеток на скаффолдах и лиофилизированных фрагментах децеллюляризованной ткани.....	53
2.4.16.	Изготовление образцов децеллюляризованного матрикса печени	54
2.4.17.	Анализ биохимического состава децеллюляризованной ткани печени	54
2.4.18.	Биодеградация децеллюляризованного матрикса печени	55
2.4.19.	Проведения эксперимента по заживлению полнослойной кожной раны крысы <i>in vivo</i>	56
2.4.20.	Статистическая обработка результатов экспериментов...	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ		58
3.1.	Децеллюляризация печени крысы	58
3.2.	Анализ сосудистой системы децеллюляризованной печени крысы	59
3.3.	Гистологический анализ структуры полученной децеллюляризованной печени крысы	59
3.4.	Исследование механических свойств децеллюляризованной печени крысы	60
3.5.	Получение макрочастиц межклеточного матрикса печени крысы	64
3.6.	Оценка пролиферативной активности клеток Her-G ₂ на макрочастицах межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы.	64
3.7.	Анализ содержания ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани печени крысы.....	66
3.8.	Получение лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы.....	67
3.9.	Анализ биохимического состава децеллюляризованной ткани печени	67
3.10.	Биодеградация децеллюляризованной ткани печени	70
3.11.	Структура конструкций на основе децеллюляризованной ткани печени крысы	71
3.12.	Анализ цитотоксичности, адгезии и пролиферации лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы	75

3.13. Проведение эксперимента по заживлению кожного покрова крысы <i>in vivo</i>	78
3.14. Получение микрочастиц межклеточного матрикса печени крысы	81
3.15. Изготовление скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованой ткани печени	82
3.16. Структура скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованой ткани печени	83
3.17. Исследование механических свойств скаффолдов	87
3.18. Анализ цитотоксичности, адгезии и пролиферации скаффолдов на основе фиброина шелка	90
3.19. Проведение эксперимента по заживлению кожного покрова крысы <i>in vivo</i>	95
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	101
4.1. Децеллюляризация печени крысы	101
4.2. Композитные скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ	121
СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Разработка быстрых и эффективных способов восстановления поврежденных или утраченных органов и фрагментов тканей - это важнейшая задача современной регенеративной медицины. Существующие медицинские имплантаты из синтетических материалов имеют некоторые преимущества (в том числе и улучшенные механические свойства), но методы получения таких имплантатов не позволяют повторить необходимые архитектуру, микро- и наноструктурные особенности и функциональную активность нативных тканей. Эта проблема может быть решена использованием в регенеративной медицине биологических конструкций, включающих в себя компоненты нативной ткани. Децеллюляризация органов, то есть получение лишенного клеток межклеточного матрикса за счет перфузии с растворами детергентов, является одной из новых технологий в регенеративной медицине для создания трансплантатов и изделий. При использовании данного метода сохраняется состав, архитектура, сосудистое русло и биологическая активность межклеточного матрикса. Компоненты межклеточного матрикса в составе изделий создают естественное микроокружение, благоприятное для клеток, схожее с нативным, а также межклеточный матрикс может быть прекрасным материалом для клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировки, так как межклеточный матрикс - это не инертный компонент, а динамический регулятор функционирования клеток (Londono R. et al. 2015). Метод децеллюляризации позволяет получить васкуляризованный межклеточный матрикс печени с разветвленной системой пор (Baptista P.M. et al., 2011). Основными компонентами матрикса являются коллаген (тип I, III, IV, небольшое количество VI, XIV и XVIII типа), фибронектин, ламинин, эластин, гликозаминогликаны и протеогликианы и связанные с ними факторы роста клеток и цитокины. Таким образом, нативный трехмерный

матрикс является перспективным материалом для тканевой инженерии и регенеративной медицины (Nelson C.M. et al., 2006; Stellaro T.R. et al., 2010).

Необходимо отметить, что трехмерная микро- и наноструктура (система микро- и нанопор, микро- и нанофибрилл) биосовместимых матриксов имеет определяющее значение для эффективности их использования при замене участков поврежденных или утраченных органов и тканей. Метод сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ), основывающийся на объединении техники ультрамикротомии с последовательным анализом поверхности наноразмерных структур после произведенного среза методом сканирующей зондовой микроскопии, позволяет исследовать нативную трехмерную микро- и наноструктуру биоматериалов с разрешением в десятки нанометров (Efimov A.E. et al., 2014; Mochalov K.E. et al., 2013). Использование данной методики для наномасштабного контроля трехмерной морфологии, структуры, а также пространственной организации матрикса является ключевым аспектом, необходимым для получения высокоэффективных клеточных конструкций с нативными структурными и биологическими свойствами.

Цель исследования

Разработка биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени, исследование их структуры и биологических свойств.

Задачи исследования

1. Разработать методики, позволяющие получить биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов из фиброина шелка.

2. Исследовать особенности микро- и наноструктуры, механических свойств, биодegradации разработанных скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени.
3. Исследовать биологические свойства разработанных биодegradируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени.
4. Оценить регенеративный потенциал разработанных биодegradируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи.

Научная новизна

1. Разработаны оригинальные методики получения большого спектра биодegradируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов из фиброина шелка.
2. Впервые изучены и охарактеризованы микро- и наноструктурные особенности биодegradируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов методом сканирующей зондовой нанотомографии.
3. Впервые показано, что особенности микро- и наноструктуры и топографии поверхности, физико-механические свойства определяют высокий уровень регенеративного потенциала и биологических свойств биодegradируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов в модели *in vitro*.
4. Впервые показан высокий регенеративный потенциал биодegradируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов *in vivo* в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи.

Практическая значимость

Разрабатываемые методы позволят создать перспективные биомедицинские конструкции для биоинженерии, поскольку разработанные в ходе работы биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени могут стать универсальными бесклеточными платформами для создания персонализированных биомедицинских клеточных продуктов. Полученные конструкции после витализации собственными клетками пациента могут стать одними из эффективных продуктов для регенеративной медицины.

Методология и методы диссертационного исследования

В ходе выполнения диссертационной работы был использован комплекс молекулярно-биохимических, гистологических, физико-химических, клеточных, микроскопических методов исследований:

1. Получение децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar.
2. Изготовление макрочастиц из децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, Изготовление микрочастиц из децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, изготовление лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, изготовление скаффолдов в виде пленок, содержащих микрочастицы децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar.
3. Изучение структуры разработанных биodeградируемых скаффолдов методами сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии.
4. Изучение механических свойств децеллюляризованной ткани и скаффолдов с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar на разрывной машине, изучение скорости биodeградации биосовместимых конструкций в ферментативной среде.

5. Методы культивирования мышечных фибробластов 3Т3 и клеток культуры гепатокарциномы человека Hep-G₂ на разработанных биodeградируемых скаффолдах, оценка адгезии и пролиферации клеток с применением 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ), и флуоресцентной микроскопии.
6. Оценка и сравнение регенеративного потенциала лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени и скаффолдов в виде пленок, содержащих микрочастицы децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar, в экспериментальной модели заживления полнослойной раны кожи крысы.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод получения микрочастиц межклеточного матрикса со средним размером 1-5 мкм позволяет получить композитные 2D скаффолды с наноструктурированной поверхностью.
2. Полученные по оригинальной методике фрагменты межклеточного матрикса и композитные 2D скаффолды с включенными в состав микрочастицами межклеточного матрикса печени являются биосовместимыми, поддерживают адгезию и пролиферацию клеток.
3. Разработанные по оригинальной методике биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в модельной системе ускоряют заживление раны кожи и характеризуются высоким уровнем регенеративного потенциала.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечена достаточным объёмом экспериментальных исследований (2 линии клеток – Hep-G₂ и 3Т3 для экспериментов по исследованию биосовместимости *in vitro* и 20

самцов крыс породы Wistar для экспериментов по исследованию биосовместимости *in vivo*) и применением современных лабораторных и инструментальных методов анализа (сканирующая электронная микроскопия, сканирующая зондовая микроскопия, сканирующая зондовая нанотомография, биохимические методы исследований, методы работы с клеточными линиями), а также адекватных методов статистической обработки данных.

Апробация работы состоялась 9 июля 2019 года на совместной конференции научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова»).

Результаты и материалы, полученные в рамках диссертационного исследования, представлены на 8 российских конференциях: VII Всероссийский съезд трансплантологов, XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», II Национальный конгресс по регенеративной медицине, XXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», VIII Всероссийский съезд трансплантологов, Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017», Третий российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация и донорство органов», IX Всероссийский съезд трансплантологов; и 3 международных конференциях: XLIII Congress of the European Society for Artificial Organs, 44th ESAO and 7th IFAO Congress, 45th ESAO Congress.

Внедрение результатов исследования в практику

Технология децеллюляризации ткани печени и метод получения композитных скаффолдов на основе фиброина шелка разработаны и внедрены в практику ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова». Технология исследования биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени методом сканирующей зондовой нанотомографии внедрена в практику ООО «СНОТРА» (участник Фонда Сколково).

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, участвовала в разработке концепции и в составлении плана экспериментальных исследований. Самостоятельно проводила децеллюляризацию печени крысы, изготавливала биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани, создавала модель оценки регенеративного потенциала полученных биodeградируемых скаффолдов. Проводила исследования биосовместимости скаффолдов *in vitro*, изучение структуры методами сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 статей, из них 10 в российских журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, а также в одну из международных баз Web of Science или Scopus, и 3 статьи в зарубежных журналах. Также по результатам диссертационной работы получено пять российских патентов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 180 источников, в том числе 16 отечественных и 164 зарубежных. Работа изложена на 146 страницах машинописного текста, иллюстрирована 34 рисунками, содержит 7 таблиц.

ГЛАВА 1. Метод децеллюляризации как перспективная технология регенеративной медицины (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Технология децеллюляризации

Разработка быстрых и эффективных способов восстановления поврежденных или утраченных органов и тканей - важнейшая задача современной регенеративной медицины. Методы получения существующих медицинских имплантатов из синтетических материалов не позволяют повторить необходимые архитектуру, микро- и наноструктурные особенности и функциональную активность нативных тканей. Эта проблема может быть решена при использовании биологических конструкций, включающих в себя межклеточные компоненты нативной ткани, повышающие биосовместимость изделий, под которой понимается способность материала, изделий или устройств выполнять свои функции без отрицательных реакций организма «хозяина» (Севастьянов В.И., 1999).

Лечение терминальных стадий заболеваний печени: вирусного гепатита, врожденного нарушения обмена веществ, цирроза, травм,- является одной из главных проблем современной медицины (Nari G.A. et al., 2013). Трансплантация печени - единственное доступное лечение тяжелой печеночной недостаточности, но в настоящее время ортотопическая трансплантация ограничивается острой нехваткой донорских органов. В России в 2017 году в листе ожидания трансплантации печени состояло 1666 человек, при этом показатель смертности в период ожидания трансплантации составил 8,5% (141 человек), что выше аналогичного показателя по ожиданию трансплантации почки и сердца (Готье С.В., Хомяков С.М., 2018). Одной из главных проблем трансплантационной хирургии является отторжение пересаженного органа. Отторжение трансплантированных тканей происходит в результате того, что иммунная система реципиента распознает чужеродные тканевые антигены гистосовместимости на клетках трансплантата и реагирует на них. Наиболее

важные из этих антигенов закодированы в главном комплексе гистосовместимости (МНС, от англ. major histocompatibility complex). Т-лимфоциты способны непосредственно распознавать чужеродные молекулы МНС и реагировать на них. Гены МНС кодируют два класса гликопротеидов: 1) МНС I класса - располагаются на всех ядродержащих клетках и тромбоцитах. Их часто называют классическими трансплантационными антигенами. Необходимы для распознавания трансформированных и зараженных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами; 2) МНС II класса - располагаются только на антигенпрезентирующих клетках (АПК). Обеспечивает взаимодействие между Т-хелперами и АПК в ходе иммунного ответа (А. Ройт и др., 2000). Гены МНС I располагаются в трех локусах на хромосоме 6: HLA-A, HLA-B, HLA-C (HLA- от англ. human lymphocyte antigen). Каждый из трех генов имеет различные аллели, которые определяют разнообразие «своих» антигенов. Чем больше различия между аллелями донора и реципиента, тем больше вероятность отторжения (Д. Грин и др., 2008). Недостаток подходящих для пересадки органов является предпосылкой для развития тканевой инженерии по решению терапевтических проблем при использовании аллотрансплантатов и разработки технологий, позволяющих применение ксентрансплантатов (Sites A.H. et al., 2006).

Гепатоцитарная трансплантация предлагает альтернативный путь лечения людей с болезнями печени, и годы работы лабораторий и клинических исследований показали его относительную эффективность. Несмотря на оптимистические и обнадеживающие результаты применения трансплантации клеток печени в эксперименте и клинике, остается немало проблем, требующих своего решения. К таковым относится развитие иммунного ответа при использовании алло- и ксеногенных клеток и необходимость применения эффективных иммуносупрессоров, а так же разработки инкапсулирования изолированных гепатоцитов или их специальной обработки ферментами для пролонгирования сроков их функционирования в организме (Kobayashi N et al., 1999; Zhou P. et al., 2011). Однако проблемы с обеспечением достаточного количества жизнеспособных гепатоцитов и их минимальная эффективность

приживления ограничили этот технологический подход. Кроме того, имеют место и другие осложнения, присущие гепатоцитарной трансплантологии, такие как тромбоз портальной вены, гипертензия, легочная эмболия (Бао J. et al., 2011; Soto-Gutierrez A. et al., 2011). Таким образом, хроническая острая нехватка донорских органов, доступных для трансплантации, длительность ожидания операции (в США срок ожидания в 2006г. составил в среднем 321 день), срочность операции (донорская печень должна быть пересажена в течение 12 ч) и исключительная дороговизна традиционной пересадки печени создают необходимые предпосылки для поиска альтернативных, более экономичных и эффективных стратегий трансплантации печени (Uygun B.E. et al., 2010).

Искусственные трансплантаты используются для поддержания функций печени смертельно больных пациентов при ожидании подходящего донора органа. Но это не может быть постоянной альтернативой ортотопической трансплантации печени. Напротив, стратегия тканевой инженерии создания *ex vivo* новых тканей на основе нативного трехмерного матрикса, может стать постоянной альтернативой классической трансплантации печени (Griffith L.G., Naughton G. 2002). Печень является комплексным паренхиматозным органом со сложной структурой и требующей постоянной перфузии для обеспечения кислородом, питательными веществами и детоксикации крови (Kulig K.M., Vacanti J.P., 2004). Таким образом, основной проблемой тканевой инженерии является создание сложных функциональных структур и васкуляризация трансплантата. При этом воссоздание микроструктуры печени на сегодняшний день ограничивается техническими проблемами. Кроме того, используемые для создания матрикса ткани печени синтетические биоматериалы не способны стимулировать лиганд-опосредованную регенерацию тканей из-за отсутствия конкретных лигандов для рецепторов соответствующих клеток (Lutolf M.P., Hubbell J.A., 2005). Было показано, что нативный межклеточный матрикс играет важную роль в поддержании не только структуры печени, но и в регенерации ткани (Vracko R., 1974). Матрикс также влияет на функции и пролиферацию гепатоцитов (Stellaro T.R. et al., 2010).

Децеллюляризация органов, то есть получение лишенного клеток межклеточного матрикса, является одной из новых технологических методик в регенеративной медицине для создания трансплантатов печени (Vorotnikova E. et al., 2010). Метод децеллюляризации сохраняет состав, трехмерную структуру, сосудистое русло, биологическую активность межклеточного матрикса. Таким образом, такой нативный трехмерный матрикс является прекрасным материалом для клеточной адгезии, дифференцировки и пролиферации (Nelson C.M., Bissel M.J., 2006; Stellaro T.R. et al., 2010).

Метод децеллюляризации сохраняет структурные и функциональные особенности нативной капиллярной сети, позволяя осуществлять витализацию печеночного матрикса взрослыми гепатоцитами и прогенеторными клетками с последующей перфузией культуры *in vitro*. Заселенный клетками трансплантат поддерживает специфические функции печени, включая секрецию альбумина, синтез мочевины и экспрессию цитохрома P450 на сопоставимых уровнях с нативной печенью. Заселенные клетками матриксы печени могут быть трансплантированы в тело донора, поддерживая выживание гепатоцитов и их функцию с минимальным ишемическим повреждением (Uygun B.E. et al., 2010).

По данным литературы успех по имплантации децеллюляризованной ткани связан с молекулярными биоспецифичными взаимодействиями, обнаруженными в белковых структурах межклеточного матрикса. Белки матрикса, которые составляют большую часть этих материалов, эволюционно консервативны. Это помогает объяснить отсутствие иммунного ответа организма реципиента после трансплантации (Barnes C.A. et al., 2010).

Метод децеллюляризации открывает широкие перспективы для его практического применения в трансплантологии не только в области создания полномасштабных биоинженерных конструкций, но и в области изготовления сосудов, микроносителей, гидрогелей, покрытий (Badylak S.F. et al., 2009).

1.2. Межклеточный матрикс печени

Межклеточный матрикс печени состоит из следующих основных компонентов: структурных белков (коллагена, эластина), адгезивных белков (фибронектина, ламинина, тенасцина), гликозаминогликанов, протеогликанов (Ren H. et al., 2013).

Из 25 видов коллагена, описанных к настоящему времени, 10 были обнаружены в печени. Коллаген составляет более 90% от общего количества белка в межклеточном матриксе печени. Значительный прогресс достигнут в выявлении новых компонентов этого семейства белков и в понимании того, каким образом эти молекулы могут взаимодействовать стехиометрически, оказывая влияние на жизнедеятельность клеток. Также было выявлено, что молекулы матрикса принимают участие в различных процессах, в том числе исполняют роль трансмембранных переносчиков внеклеточных сигналов. В печени так называемый фибриллообразующий коллаген (тип I, III, IV) преимущественно локализуется рядом с капсулой вокруг крупных сосудов и портальной триады, а в субэндотелиальном пространстве расположены отдельные фибриллы, содержащие коллаген I и III типа. Кроме того, может присутствовать небольшое количество коллагена VI, XIV и XVIII типа. Другой фибриллярный белок в составе межклеточного матрикса – эластин который в сочетании с коллагеном обеспечивает упругость и растяжимость тканей (Caralt M. et al., 2014; Martinez-Hernandez A. , Amenta P.S, 1993).

Сравнительно большая доля белков межклеточного матрикса приходится на фибронектин. В печени представлены два вида фибронектина: растворимый (плазменный) и нерастворимый (тканевый). Обе формы фибронектина вовлекаются в разнообразные процессы: способствуют адгезии клеток, стимулируют пролиферацию и миграцию клеток, контролируют дифференцировку и поддержание цитоскелета клеток, активно участвуют в воспалительных и репаративных процессах. Молекулы фибронектина богаты RGD-последовательностями (последовательность аминокислот L-аргинин-

глицин-L-аспарагиновая кислота), которые способствуют адгезии клеток через интегрины (Londono R. et al., 2015; Schwartz M.A., Ginsberg M.H. , 2002).

В базальных мембранах роль основного адгезивного белка выполняет ламинин. Главные функции ламинина определяются его способностью к адгезии клеток и моделированию клеточного поведения. Он может влиять на рост, морфологию, дифференцировку и подвижность клеток. Ламинин играет роль адгезивного белка для различных эпителиальных и мезенхимальных клеток (Londono R. et al., 2015).

Помимо перечисленных белков в небольших количествах присутствуют в межклеточном матриксе печени другие гликопротеины, в том числе, субэндотелиальные отложения тенасцина. Молекула тенасцина имеет сложную структуру, поскольку на одной из ее терминалей располагаются лиганды, препятствующие адгезии клеточных мембран, а на другой локализуются белки, обеспечивающие образование межклеточных контактов, т.е. тенасцин обладает как адгезивными, так и антиадгезивными свойствами (Северин Е.С. 2003).

В межклеточном матриксе печени обнаружены следующие гликозаминогликаны - гепарин, гепарансульфат. Гепарин - кислый серосодержащий гликозаминогликан, важный антикоагулянт противосвертывающей системы крови. Гепарансульфат входит в состав протеогликанов базальных мембран и выполняет антикоагулирующие функции. Гликозаминогликаны способны образовывать связи с факторами роста и цитокинами (Северин Е.С. 2003; Londono R. et al., 2015).

Ковалентно связываясь с белком, гликозаминогликаны образуют протеогликаны. Это неоднородная группа макромолекул, различающихся по молекулярной массе и количеству белковых цепей, которые оказывают непосредственное влияние на выполняемые молекулой функции. Протеогликаны в основном состоят из гепарансульфатпротеогликана, включая перлекан, небольшое количество декорина, бигликана, фибромодулина, глипикана, синдекана и люмикана. Молекулы протеогликанов регулируют движение клеток и диффузию различных молекул в межклеточное пространство в зависимости от их

размера и заряда. Протеогликианы играют важную роль в передаче химических сигналов между клетками. Они могут связывать различные факторы роста, цитокины и ферменты, тем самым контролируя активность и секрецию белков.

Как упоминалось ранее, некоторые компоненты межклеточного матрикса, такие как гликозаминогликаны и протеогликаны, могут связывать факторы роста и цитокины. (Canning P. et al., 2014; Londono R. et al., 2015) Таким образом, внеклеточный матрикс служит резервуаром сигнальных молекул, освобождение которых регулируется внешними стимулами. Процесс высвобождения факторов роста и цитокинов является сложным и контролируется рядом факторов, в том числе сродством, конформационными изменениями и деградацией компонентов межклеточного матрикса в нормальных и патологических процессах. Например, с перлеканом связаны следующие сигнальные молекулы: основной фактор роста фибробластов, фактор роста гепатоцитов, интерлейкин-3, интерферон гамма, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор. Так же активность трансформирующего ростового фактора бета может контролироваться путем связывания с компонентами межклеточного матрикса декорином и бигликаном (Londono R. et al., 2015). По мимо выше перечисленных факторов роста в межклеточном матриксе печени присутствуют следующие: тромбоцитарный фактор роста, связующий тканевый фактор роста, фактор некроза опухоли- α , фактор роста эндотелия сосудов (Ren H. et al., 2013).

1.3. Децеллюляризация печени. Структура и состав полученного матрикса

Цель децеллюляризации - удаление клеточного и генетического материала, при этом свести к минимуму повреждения межклеточного матрикса. В различных протоколах децеллюляризации, описанных в литературе, применяются физические, ферментативные и химические методы освобождения матрикса от клеток (Gilbert T.W., 2006). Наиболее широко используются в современных исследованиях в качестве детергентов додецилсульфат натрия и тритон X-100

(Hussein K.H. et al., 2013; Shupe T. et al., 2010). Додecilсульфат натрия представляет собой высоко ионный детергент, который разрушает клеточные мембраны, но при высоких концентрациях в растворе (от 1%) может денатурировать белки. Напротив, тритон X-100 является неионным детергентом, разрушает липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, но не влияет на белок-белковые взаимодействия. Стоит так же отметить, что при использовании тритона X-100 содержание коллагена в матриксе после процедуры децеллюляризации не изменяется, но после перфузии в матриксе содержится 60% эластина, 50% гликозаминогликанов и 60% фактора роста гепатоцитов по сравнению с нативной тканью. В то время как при использовании 1% раствора додecilсульфата натрия содержание эластина составляло 20%, гликозаминогликанов и фактора роста гепатоцитов содержится по 10% (Ren H. et al., 2013). Целью удаления клеточного материала межклеточного матрикса является избежание иммунного ответа на ксено - и аллогенные межклеточные матриксы (Fox I.J., Roy-Chowdhury J., 2004). Показано, что в ходе децеллюляризации путем перфузии детергентов удается удалить ксеноантигены из межклеточного матрикса печени (Hussein K.H. et al., 2013, Wang Y. et al., 2015).

Перфузия органа через портальную вену с растворами детергентов является оптимальным путем децеллюляризации печени, поскольку таким методом происходит эффективная доставка детергента к клеткам и удаление дебриса из ткани. При этом, как упоминалось выше, одним из основополагающих преимуществ является сохранение глиссоновой капсулы и сосудистого русла, что демонстрируется не только перфузией раствора красителя, но и при анализе методом сканирующей электронной микроскопии. Более того, обеспечивается сохранность не только крупных сосудов, но и большинства микрокапилляров (Uygun B.E. et al., 2010). Так же методом сканирующей микроскопии показано, что после децеллюляризации в матриксе остаются структуры портальной триады печени (Baptista P.M et al., 2011). Кроме того, доказана возможность восстановления физиологического потока крови через портальную и печеночную вены (Uygun B.E. et al., 2010).

При перфузии растворов детергентов через портальную вену показано сохранение пористой структуры межклеточного матрикса. Трехмерная архитектура межклеточного матрикса играет важную роль в обеспечении адгезии, пролиферации и поддержания функций гепатоцитов. Важна не только высокая пористость матрикса, но и рельеф поверхностей пор и расположения лигандов для рецепторов разных типов клеток печени (Brown D.N. et al., 2010; Badylak S.F. et al., 2009). Размер пор децеллюляризованного межклеточного матрикса составляет 20-30 мкм, что является местами расположения гепатоцитов, удаленных при децеллюляризации (Uygun B.E. et al., 2010).

Локализация специфических молекул межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани по сравнению с нативной печенью была показана с помощью иммуногистохимического анализа. Продемонстрировано, что коллагены I, III, IV типов, ламинин и фибронектин располагаются вокруг сосудов и в паренхиме межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани. Так же иммуногистохимия образцов нативной печени выявило, что коллагены I, III, IV типов располагаются в основном вокруг крупных сосудов, в соответствии с их локализацией в базальной мембране сосудов, и во всей паренхиме органа. Ламинин был сосредоточен около крупных сосудов и почти отсутствовал в паренхиме матрикса нативной печени. Напротив, фибронектин в большей степени располагается в паренхиме и в небольших количествах вокруг сосудов. В обоих матриксах, децеллюляризованном и нативном, матрикс вокруг желчных протоков и канальцев состоял из ламинина, фибронектина и коллагена IV типа. Помимо этого, было выявлено наличие в межклеточном матриксе декорина в количестве, сопоставимом с содержанием в нативной печени. Из этого можно сделать вывод о сохранности структуры и состава межклеточного матрикса децеллюляризованной печени (Baptista P.M et al., 2011).

Межклеточный матрикс - это не инертный компонент, а динамический регулятор функционирования клеток. Состав базальной мембраны в пределах субэндотелиального пространства влияет на поддержание различных функций гепатоцитов, звездчатых и эндотелиальных клеток. Замещение нормального

матрикса интерстициальным с низкой плотностью или изменение его состава напрямую нарушает функцию гепатоцитов, что ведет за собой нарушения функций органа. Такой матрикс с высокой плотностью также активизирует звездчатые клетки и ведет к уменьшению фенестрированности синусоидального эндотелия, что может препятствовать транспорту растворенных веществ из синусоида к гепатоциту. Поэтому так важно сохранение распределения компонентов межклеточного матрикса в разных участках печени (Shirakigawa N. et al., 2012).

Механические свойства матриксов были описаны как очень важные биофизические параметры для регуляции функционирования и дифференцировки клеток, а так же их морфологии (Pei M. et al., 2011). В свою очередь, механические свойства ткани печени зависят от состояния органов, метода децеллюляризации и метода измерения параметров механики (Marchesseau S. et al., 2010). По данным группы ученых под руководством Giorgio Mattei (Mattei G. et al., 2014), при измерении модуля объемного сжатия (λ) ткани свиной печени не наблюдается достоверных отличий в значениях этого параметра у нативной печени в различных ее долях или замороженной при -20°C , что согласуется с результатами других исследований (Marchesseau S. et al., 2010; Tamura A. et al., 2002). Так же были сделаны выводы о влиянии децеллюляризации печени с ионными (0,1% SDS + 1% Triton X-100) и неионными (1% Triton X-100) детергентами на изменение модуля объемного сжатия: λ нативной печени составила $1,62 \pm 0,13$ кПа, λ децеллюляризованной печени с ионными детергентами - $1,25 \pm 0,07$ кПа, а с неионными $1,31 \pm 0,09$ кПа. Последние две величины значительно отличаются от модуля сжатия нативной печени, позволяя сделать вывод, что удаление клеток является причиной снижения значения λ , а протокол децеллюляризации значительно не влияет на данный показатель. То есть сами клетки сами способствуют увеличению модуля сжатия тканей, по сравнению с межклеточным матриксом (Evans D.W. et al., 2013).

1.4. Витализация печеночного матрикса и трансплантация децеллюляризованной печени

Основная проблема в реконструкции органа большого объема это доставка достаточного количества клеток на всю толщину ткани. Широко применяемые методы для витализации матрикса, в которых используется статический, динамический или перфузионный посев в биореакторе (Brug K.J. et al., 2000), позволяют проникать клеткам всего на несколько миллиметров от поверхности матрикса, а проникновение дальше вглубь зависит от активной миграции клеток. Альтернативой этому служит описанный в ранних работах по децеллюляризации печени метод прямой инъекции гепатоцитов, что приводит к повреждению микроархитектуры матрикса и неравномерному распределению клеток (Ott H.C. et al., 2008). Перфузией клеточной суспензии через сосудистую сеть достигается равномерное распределение клеток по матриксу без повреждения целостности межклеточного матрикса, большая эффективность, поскольку требуется меньше клеток (Baptista P.M et al., 2011).

Децеллюляризованная ткань витализируется клетками в два этапа: 1-ый этап - витализация эндотелиальными клетками, 2-ой этап - витализация гепатоцитами. Формирование эндотелия является необходимым для предотвращения тромбоза и обеспечения нормального функционирования сосудов. Поскольку в таком матриксе есть доступ к нескольким сосудам, было показано, что наиболее эффективная витализация матрикса эндотелиальными клетками происходит при перфузии матрикса через нижнюю полую вену по ретроградному пути, а не через портальную. В таком случае, эндотелиальные клетки избирательно распределяются по большим сосудам и капиллярам вплоть до области перипортального пространства печеночной дольки, не достигая перипортального пространства дольки, где заканчиваются разветвления портальной вены. При перфузии культуры через портальную вену, эндотелиальные клетки распределяются во всем объеме матрикса, а не в перипортальном пространстве от центральной вены. Напротив, витализация

матрикса печени гепатоцитами должна происходить через портальную вену, по физиологичному пути (Baptista P.M et al., 2011). Одновременное использование двух разных маршрутов для перфузии клеточных культур позволяет охватить всю сосудистую сеть для витализации матрикса эндотелиальными клетками, что имеет существенное значение в обеспечении предотвращения свертывания крови. Было доказано, что на эндотелизированном матриксе наблюдается значительное сокращение адгезии тромбоцитов, по сравнению с невитализированными эндотелиальными клетками матриксе (Baptista P.M et al., 2011).

Децеллюляризованная ткань печени может быть витализирована первичными крысиными гепатоцитами путем пошаговой перфузии, с эффективностью более 90% (Uygun В.Е. et al., 2010). Эффективность витализации намного выше, чем уровни приживления *in vivo* после гепатоцитарной трансплантации. Для рецеллюляризации матрикса необходимо 50 миллионов первичных крысиных гепатоцитов, что составляет примерно 5 % от количества клеток в нативной крысиной печени, поскольку этого количества достаточно, чтобы восстановить печеночную функцию в животных моделях. Это число может быть увеличено до 200 миллионов, что составляет 20 % от нативной крысиной печеночной гепатоцитарной массы (Uygun В.Е. et al., 2010). После витализации матрикса, гепатоцитарная жизнеспособность и метаболическая функция были поддержаны в перфузионном культивировании. Было показано, что уровень метаболической активности гепатоцитов на децеллюляризованной ткани печени сопоставим с уровнем активности гепатоцитов в нативной ткани и значительно выше, чем уровень активности клеток печени при гепатоцитарной трансплантации. Витализированный межклеточный матрикс печени поддерживает такие функции печени, как синтез альбумина, производство мочевины, детоксикация аммиака и др. Подобные результаты могут быть объяснены влиянием состава нативного межклеточного матрикса на гепатоциты. Структурные и адгезивные белки в составе матрикса обеспечивают микроокружение для прикрепления и

пространственной организации гепатоцитов. Более того, связанные с компонентами межклеточного матрикса факторы роста, многочисленные разнообразные компоненты матрикса, описанные выше, способствуют поддержанию активности гепатоцитов. Все это составляет микросреду, необходимую для поддержания адгезии, пролиферации, дифференцировки и метаболической активности клеток (Ren H. et al., 2013).

После витализации клетками реципиента, такой децеллюляризованный матрикс может быть трансплантирован в тело реципиента. Для успеха такой операции важно не только восстановление функций печени в организме, но и отсутствие иммунного ответа на имплантированный орган. И метод децеллюляризации органов позволяет получить матрикс, имплантация которого не вызывает иммунного ответа реципиента как при аллотрансплантации, так и при ксенотрансплантации (Mirmalek-Sani S.H. et al., 2013).

Децеллюляризованная печень используется для проектирования сложных гепатоцитарных структур в регенеративной медицине, которые после вторичного заселения гепатоцитами реципиента выполняют функции нормальной печени. Несмотря на преимущества децеллюляризации, необходимы дальнейшие усовершенствования методики освобождения от клеток для возможного применения для человека и витализации клетками печеночного матрикса. Для полной реконструкции печени потребуется перфузия непаренхиматозных клеток, таких как звездчатые клетки, желчные эпителиальные клетки и Клетки Купфера.

1.5. Области применения технологии децеллюляризации

1.5.1. Децеллюляризация хряща

Повреждения хрящевой ткани может быть вызвано такими причинами как травмы, различные заболевания, возрастные изменения структуры ткани, а также врожденные аномалии (Groen W.M. et al., 2017; Nasiri B., Mashayekhan S.,

2017; Naykal S. et al., 2014). Несмотря на привлекательность технологии децеллюляризации для получения межклеточного матрикса с нативной структурой, в случае с хрящевой тканью ее плотность и особенности строения являются лимитирующими факторами применения децеллюляризации для освобождения ткани от клеток и адекватной витализации в последующем (Yang Q. Et al., 2008). Несмотря на это, существуют работы, в которых удалось подобрать подходящие протоколы для децеллюляризации хряща сустава (Schneider C. et al., 2016), мениска (Chen Y. et al., 2017; Sandmann G.H. et al., 2009), трахеи (Macchiarini P. et al., 2008; Hamilton N.J. et al., 2015), гортани (Baiguera S. et al., 2011) и хряща носовой перегородки (Kang D.W. et al., 2017, Schwarz S. et al., 2012).

В литературе на сегодняшний день проанализировано большое разнообразие способов децеллюляризации, хотя все еще не существует общего протокола для разных типов хрящевой ткани (Korpershoek J.V. et al., 2017). Применяются как физические методы вымывания клеток, так и химические (с использованием додецилсульфат натрия, этилендиминтетрауксусной кислоты, тритона X-100 и трис-HCl), а также используются ферменты для качественного вымывания клеток (ДНКазы и РНКазы). Часто применяется и их комбинации, объединяя методы в многоэтапную и длительную процедуру, но, не смотря на комплексность протоколов, количество остаточной ДНК в обработанной ткани может быть больше допустимого количества (Graham M.E. et al., 2016). Для оптимизации протоколов децеллюляризации многие авторы перед использованием детергентов добавили стадию механического измельчения хрящевой ткани для увеличения площади поверхности и, как следствие, улучшения проникновения детергентов вглубь ткани. Добавление этого этапа позволило уменьшить время воздействия экспонирования ткани в химических агентах, что в свою очередь способствовало сохранению микроархитектуры ткани, а так же сохранению гликозаминогликанов и структурных белков, включая коллаген II типа (Sutherland A.J. et al., 2015; , Cheng C.W. et al., 2014). Более того, было показано, что добавление процедуры замораживания-

оттаивания тоже благоприятно влияет на эффективность последующей децеллюляризации, поскольку из-за кристаллов льда образуется большое количество пор после размораживания, что облегчает проникновение детергентов в ткань (Kiyotake E.A. et al., 2016). В некоторых работах для воссоздания структуры межклеточного матрикса децеллюляризованную ткань гомогенизируют и подвергают воздействию уксусной кислоты с последующей лиофилизацией (Stocco E. et al., 2014), также возможно добавление стадии перешивки для улучшения механических свойств скаффолда (Yang Q. et al., 2008).

Протокол децеллюляризации гортани (Baiguera S. et al., 2011) был подобран в соответствие с уже использованными при получении межклеточного матрикса трахеи (Elliott M.J. et al., 2012; Gonfiotti A. Et al., 2014; Baiguera S. et al., 2010). Был использован детергентный способ децеллюляризации с применением ферментов: 4% раствор дезоксихолата натрия с ДНКазой в 1М растворе хлорида натрия, с последующей инкубацией в дистиллированной воде. Далее он был модифицирован, была добавлена стадия замораживания-оттаивания и дополнительная инкубация в растворах хлорида кальция и сульфата магния (Tint D. et al., 2018). Однако даже при модификации протокола, децеллюляризация трахеи проходила в течение 3-8 недель и требовала нескольких циклов вымывания клеток. Для ускорения этого процесса был предложен вакуумный метод, в ходе которого процедуру децеллюляризации удалось сократить до 9 дней (Butler C.R. et al., 2017).

Метод децеллюляризации применяется и для создания имплантов, используемых в риноплатике. Реконструкция носа, особенно при больших объемах реконструируемой ткани, является сложной задачей, в том числе принимая во внимание недостаток донорского материала. Был предложен метод децеллюляризации трупного носового хряща без использования ферментативной обработки. Децеллюляризованный уже с использованием ДНКазы хрящ носовой перегородки был рассмотрен для реконструкции голосовых связок (Kang D.W. et al., 2017).

Как отмечалось ранее, после децеллюляризации важно провести адекватную витализацию полученного межклеточного матрикса. В ранних работах предлагалось использование мезенхимальных стволовых клеток или первичных хондроцитов (Stocco E. et al., 2014, Huang Z. et al., 2016; Huang, Z. et al., 2017). При рецеллюляризации трахеи для дальнейшей имплантации было предложено использовать аутологичные клетки эпителия слизистой оболочки носовой полости или бронхов в совокупности со стволовыми клетками костного мозга (Macchiarini P. et al., 2008), или стволовые клетки жировой ткани (Chistiakov D.A., 2010; Batioglu-Karaaltin A. et al., 2015). Но в случае с хрящевой тканью, встает вопрос о целесообразности витализации межклеточного матрикса перед имплантацией, поскольку существуют работы, в которых показано, что в экспериментах с витализированным матриксом трахеи и невитализированным матриксом нет достоверных различий в выживаемости животных (Wood M.W. et al., 2014; Hung S.H. et al., 2016). Тем не менее, в ряде работ подчёркивается важность витализации трансплантата перед его применением в реконструктивной медицине (Go T. et al., 2010).

Успешность децеллюляризации показана и в экспериментах по получению межклеточного матрикса хряща мениска. В ряде работ используются как химические методы (Sandmann G.H. et al., 2009), так и ферментативные методы децеллюляризации ткани (Nordberg R.C. et al., 2016). Витализацию полученного межклеточного матрикса проводили, используя крысиные хондроциты (Minehara H. et al., 2011), стволовые клетки жировой ткани человека (Nordberg R.C. et al., 2016) и стволовые клетки, выделенные из синовиальной жидкости (Liang Y. et al., 2018). Было показано, что из-за плотной структуры матрикса мениска, проникновение клеток в толщу матрикса затруднено, вследствие чего было предложено использование инъекционного способа доставки клеток (Nordberg R.C. et al 2016) или использования хемотаксических клеток (Minehara H. et al., 2011).

Для децеллюляризации эластичного хряща ушной раковины были рассмотрены множество подходов вымывания клеток, в виду плотности ткани.

Помимо использования комбинации химических и ферментативных способов децеллюляризации (Utomo L. et al., 2015; Rahman S. et al., 2018), так же применялись циклы замораживания-оттаивания для облегчения удаления клеток. Более того был предложен метод перфузионной децеллюляризации через кожную артерию (Duisit J. et al., 2018). Хотя имеются данные об рецеллюляризации путем перфузии стволовых клеток жировой ткани крысы в полученный межклеточный матрикс хряща ушной раковины, адекватная витализация хряща остается актуальной проблемой данной области.

1.5.2. Децеллюляризация сухожилий

Эффективность метода децеллюляризации была продемонстрирована и в случае с сухожилиями, разработано несколько техник удаления клеток (Raghavan S.S. et al., 2012; , Chiou G.J. et al., 2015). При этом для децеллюляризации используются ахилловы сухожилия и сухожилия сгибателей верхних конечностей. Витализацию полученного межклеточного матрикса удачно проводили, используя фибробласты дермы человека (Pridgen B. et al., 2011; Woon C.Y.L. et al., 2011), стволовые клетки жировой ткани (Schmitt T. et al., 2013) и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (94). Было показано, что увеличить эффективность рецеллюляризации полученного матрикса можно путем предварительной инъекции раствора коллагена (Martinello T. et al., 2014) или эмбриональной бычьей сыворотки (Long C. et al., 2017).

Одним из основополагающих параметров, учитываемых при выборе трансплантата сухожилия, являются его механические свойства. В ряде работ была исследована прочность на разрыв децеллюляризованной ткани сухожилия на границе раздела сухожилие-кость (Whitlock P.W. et al., 2012). Было показано, что механические свойства, децеллюляризованного матрикса сухожилия сгибателя пальцев не отличаются от таковых свойств нативной ткани (Bronstein J.A. et al., 2013; Fox P.M. et al., 2013).

1.5.3. Децеллюляризация мышечной ткани

Реконструкция обширных дефектов скелетной мускулатуры важная проблема регенеративной медицины, возникающая при травмах различных частей тела, инфекциях, осложнениях, сопутствующих другим заболеваниям. Поэтому разработка методов создания трансплантатов на основе децеллюляризации является чрезвычайно актуальной. Но было выяснено, что после децеллюляризации разных мышц свойства полученного межклеточного матрикса также сильно отличаются (Wilson K. et al., 2016). При этом витализация полученного матрикса нецелесообразна, но оценку биосовместимости и миграции клеток в трансплантат производили. Было выявлено, что мышечный трансплантат предотвращал висцеральную грыжу у кроликов, признаков отторжения и системной инфекции не наблюдалось. Также были обнаружены признаки пролиферации клеток-предшественников мышечных волокон на периферии трансплантата через 3 недели после трансплантации (Porzionato A. et al., 2015). Отмечается, что скорость деградации децеллюляризованной мышечной ткани *in vivo* соответствует скорости регенерации поврежденной мышцы. Это важный показатель, поскольку децеллюляризованную ткань следует рассматривать не как постоянные трансплантаты, а как матрикс-основу для реконструкции нативной ткани на месте дефекта (Wilson K. et al., 2016).

1.5.4. Децеллюляризация кости

Необходимость восстановления дефекта кости может возникнуть в результате травм и заболеваний, и в таких случаях в клинике применяются аутологичные фрагменты костной ткани, но этот подход ограничен такими факторами как доступность, инфекции, заболевания костной ткани пациента, длительное дренирование раны, послеоперационные боли (Cheng C.W. et al., 2014). Также применяются костные аллотрансплантаты, но в этом случае велик

риск иммунного ответа и инфекции, что привело к возможному созданию трансплантата на основе децеллюляризованной ткани (Ebraheim N.A. et al., 2001; Varetas K.; Taylor P., 2011). Представленный протокол децеллюляризации основывался на перфузии и центрифугировании дистиллированной воды при нагревании, а затем кость подвергали воздействию ультразвука в стерилизующем растворе при нагревании, а затем инкубации в 70% этиловом спирте при комнатной температуре. В результате децеллюляризации происходило освобождение костного матрикса от красного костного мозга. Более того, такой матрикс поддерживал жизнеспособность и остеогенную активность мезенхимальных стволовых клеток, что свидетельствует о сохранности компонентов межклеточного матрикса и факторов роста, ассоциированных с ними (Smith C.A. et al., 2015). При этом было выявлено, что децеллюляризованная костная ткань доноров разных возрастов имели разную остеогенную активность: костная ткань от более возрастных доноров эффективнее стимулировали остеогенную активность мезенхимальных стволовых клеток (Smith C.A. et al., 2017).

1.5.5. Децеллюляризация сердца

Заболевания сердца является одной из главных причин смертности в наши дни (Yasui H. et al., 2014). Несмотря на прогресс в лечении сердечной недостаточности, трансплантация сердца по-прежнему остается актуальной для пациентов с терминальной стадией заболевания. Но трансплантация имеет ряд недостатков и главный из них это нехватка донорских органов. Конечно, на данный момент существуют новые подходы для терапии заболеваний, но все они направлены на лечение отдельных областей сердца (Pfister O. et al., 2014). Необходим метод для создания полномасштабного трансплантата сердца.

Метод децеллюляризации так же применяется для получения матрикса сердца, поскольку межклеточный матрикс играет основополагающую роль в таких процессах как фиброз, воспаление, ангиогенез, сократительная функция,

жизнеспособность кардиомиоцитов (Becker M. et al., 2017). Существует ряд трудностей, связанных с анатомическим строением скелетной мускулатуры, но они на сегодняшний день преодолимы. Подобраны условия и концентрации детергентов для получения межклеточного матрикса сердца (Ott H.C. et al., 2008). Более того, проведены исследования по заселению такого матрикса кардиомиоцитами путем коронарной перфузии суспензии клеток. Жизнеспособность культуры поддерживалась в межклеточном матриксе в течение 30 дней. И после 2-3 дней наблюдалось спонтанное сокращение ткани, длившееся до 30 дней. Кроме этого, была достигнута синхронность сокращений большей части участков сердца, но оставались независимые регионы со спонтанной сократимостью. Синхронность является важным фактором для создания искусственных органов, поскольку асинхронность регионов потенциально увеличивает риск возникновения аритмии. Удалось показать, что ткани сердца сокращались как целый орган, чего до применения децеллюляризации не было достигнуто ранее в тканевой инженерии сердца (Yasui H. et al., 2014). Данная методика имеет большие перспективы в области создания трансплантата сердца.

Помимо децеллюляризации целого сердца, получаемый межклеточный матрикс сердца используются в качестве патчей для локального восстановления миокарда. Фрагменты децеллюляризованного миокарда могут быть наложены на поверхность эпикарда или введены путем инъекций непосредственно в ткань миокарда (Sanchez P.L. et al., 2015). Фрагменты межклеточного матрикса могут служить платформами для доставки клеток, которые способствуют выживанию и инфильтрации клеток, а также их пролиферации в зоне некроза миокарда (Oberwallner B. et al., 2014).

1.5.6. Децеллюляризация почки

Для пациентов с терминальными стадиями заболеваний почек есть методики поддержания функций органа, например диализ, во время ожидания ортотопической трансплантации. Однако это временные меры и необходима разработка новых методов создания трансплантата. Были проведены работы по использованию метода децеллюляризации почки (Nakayama K.H. et al., 2010) в которых было доказано сохранение структурно-функциональных единиц почки, сосудистой сети органа и состава межклеточного матрикса. Так же были исследована структура децеллюляризованной почки, ее биологические и физические свойства (Yu Y.L. et al., 2014).

Децеллюляризацию почки человека проводили после удаления почечной капсулы, вымывание клеток производили путем перфузии растворов детергенов (Nagaо R.J. et al., 2015). При децеллюляризации почки человека было показано успешное удаление клеточного материала из матрикса ткани, при этом сохранялась сосудистая, кортикальная и медуллярная архитектура, система канальцев и мочеточник (Orlando G. et al., 2013; Song J.J. et al., 2013). Более того, было продемонстрировано сохранение экспрессии факторов роста, способствующих адгезии, пролиферации и миграции клеток, ангиогенезу и регуляции почечных функций, таких как клубочковая инфильтрация (Peloso A. et al., 2015).

1.5.7. Децеллюляризация легких

В настоящее время, в области инженерии легкого не так часто используют клеточную терапию и применяют методы тканевой инженерии, как для других тканей и органов. Некоторые применяемые системы для восстановления микроструктуры альвеол не позволяют воссоздать ткань, способную к газовому обмену. Успешное использование метода децеллюляризации для тканей дыхательной системы, описанного в 2008 году для получения

децеллюляризованной трахеи, ее последующее заселение клетками и успешной имплантации пациенту (Macchiarini P. et al., 2008), подтолкнуло исследователей использовать метод децеллюляризации для целого легкого.

Было не только показано сохранение микроархитектуры нативной ткани, но и воспроизведение функции газообмена при имплантации вновь заселенного матрикса легкого крысе (Petersen T.H. et al., 2010). Способ витализации используемые клетки варьируются в различных работах. Так показан способ перфузии (Wagner D.E. et al., 2014) и инъекции клеток (O'Neil J.D. et al., 2013), при этом используются комбинации фибробластов легких, клетки трахеи и бронхов, различные типы альвеолярных эпителиальных клеток (Gilpin S.E., Wagner D.E. 2018).

1.5.8. Децеллюляризация мочевого пузыря

Для восстановления мочевого пузыря после различных заболеваний был так же применен метод децеллюляризации. Было разработано несколько успешных протоколов с использованием ферментов (Sievert K.D. et al., 2006) или детергентов (Atala A. et al., 2006). Показано, что этот метод позволяет не только создать целостный орган с полным удалением клеточного материала и сохранением эластичных и коллагеновых волокон, но и успешно восстановить его слизистую оболочку. Также было отмечено, что механические свойства (прочность на разрыв, параметры деформации, модуль упругости) остались неизменными по сравнению с нативной тканью (Dahms S.E. et al., 1998). Более того, использование децеллюляризованной ткани показало хорошие результаты по терапии больных с заболеваниями мочеполовой системы (El- Kassaby A. et al., 2008).

1.5.9. Децеллюляризация кишечника

Обширная резекция тонкой кишки или исключение тонкой кишки из процессов переваривания и всасывания, межкишечных свищей или наложения анастомозов, могут вызвать синдром короткой кишки. Основная проблема, сопутствующая этому заболеванию, это уменьшение площади абсорбирующей поверхности с последующим нарушением всасывания. Высокий уровень частоты заболевания, ухудшения качества жизни и смертность, связанные с синдромом короткой кишки являются предпосылками к созданию тканеинженерных конструкций для восстановления участков тонкого кишечника (Grandi F. et al., 2018).

Был разработан прокол эффективной децеллюляризации тонкого кишечника, основанный на замораживании-оттаивании, после которого следовала обработка ткани 6% диметилсульфоксидом, 1% тритоном X-100 и ДНКазой. Полученный после децеллюляризации межклеточный матрикс кишки сохранял архитектуру нативной ткани, была выявлена сохранность структурных белков и ангиогенных факторов, таких как фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтин (Patil P.V. et al., 2013).

1.6. Изделия на основе децеллюляризованной ткани

Децеллюляризация органа является перспективным методом регенеративной медицины не только в области создания полномасштабных биоинженерных конструкций, таких как трансплантат органа, но и в ряде других областей: 1) создание специфических микроносителей для клеток, 2) получение гидрогелей из лиофилизированной децеллюляризованной ткани путем ее обработки пепсином с последующим растворением в натрий-фосфатном буфере, 3) изготовление покрытий из раствора компонентов межклеточного матрикса ферментативно расщепленной лиофилизированной децеллюляризованной ткани (Badylak S.F. et al., 2009).

Микроносители могут быть использованы как вспомогательный материал при трансплантации, в сухом виде или в виде суспензий для инъекций как минимально инвазивный метод лечения. Например, микрочастицы из децеллюляризованной ткани кожи используются для регенерации кожных покровов (Zuo H. et al., 2012).

Традиционно применяемая трансплантация гепатоцитов имеет практические ограничения в основном за счет трудностей, связанных с получением достаточного количества функционирующих гепатоцитов, необходимых для терапевтической эффективности (Storm S.S. et al., 1997). Кроме того, первичные гепатоциты легко утрачивают жизнеспособность и свои функции в культуре как *in vitro*, так и после трансплантации (Zhang W. et al., 2010). Одним из способов решения данных проблем может стать культивирование гепатоцитов на гидрогеле из межклеточного матрикса печени или покрытие поверхностей искусственных носителей компонентами матрикса печени для последующего культивирования и трансплантации гепатоцитов. (Hou Y.-T. et al., 2010, Wang T. et al., 2013). Компоненты межклеточного матрикса в составе изделий создают естественное микроокружение, благоприятное для гепатоцитов, аналогичное микроокружению гепатоцитов в нативной ткани. Такие функциональные носители разрабатываются для тканевой инженерии печени, клеточной терапии и трансплантации. Более того, показано, что покрытия из децеллюляризованной ткани печени и гидрогель на его основе обеспечивают более эффективную адгезию и пролиферацию гепатоцитов в сравнении с классическими матрицами, такими как коммерческий коллаген и Matrigel (Lee J.S. et al., 2014).

В реконструктивной хирургии часто необходимо восстановление жировой ткани в случае послеоперационной, врожденной или посттравматической потери, которая может привести к образованию рубцовой ткани или потери функции. В литературе описано применения децеллюляризованного большого сальника человека трупных доноров (Porzionato A. et al., 2013), а также сальника свиней (Soffer-Tsur N. et al., 2014). Большой сальник используется в различных хирургических процедурах в виду его высокой степени васкуляризации, высокой

ангиогенной активности, высокой производительности факторов роста. Децеллюляризацию сальника проводили многими способами, используя физические, химические (Choi J.S. et al., 2011; Wu I. et al., 2012) и ферментативные методы (Wang J.Q. et al., 2013; He Y. et al., 2018; Song M. et al., 2018), а также их комбинации (Omid E. et al., 2014.; Baker N.A. et al., 2017; Flynn, L.E., 2010.). Полученный межклеточный матрикс является пористой комплексной трехмерной структурой из коллагена и эластичных волокон, включающую в себя сосудистое русло. Децеллюляризованная жировая ткань не является токсичной для клеток, поддерживает их адгезию и пролиферацию, создает микроокружение для адипогенеза, ангиогенеза и инфильтрации клеток, а также при подкожной имплантации не наблюдалось признаков воспаления и отторжения (Han T.T. et al., 2015).

Полученную децеллюляризованную жировую ткань использовали в качестве материала для различных изделий: гидрогелевые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани (Young D.A. et al., 2011), а также композитные в комбинации с хитозаном (Cheung H.K. et al., 2014), хондроитинсульфатом (Brown S.F. et al., 2015), фиброином шелка (Kayabolen A. et al., 2017), полиэтиленгликолем (Li S. et al., 2018); инъектируемые микрочастицы децеллюляризованной ткани (Wang L. et al., 2013); микроносители из межклеточного матрикса (Yu C. et al., 2017) и в композите с альгинатом (Turner A.E. et al., 2012), лиофилизированные микрочастицы децеллюляризованной ткани (Giatsidis G. et al., 2018). Так же в одной из работ рассматривается потенциал децеллюляризованной жировой ткани в качестве универсального материала для создания персонализированных изделий для регенеративной медицины при помощи 3D-принтера (Noor N. et al., 2019). При этом жировая ткань используется в качестве источника межклеточного матрикса для гидрогеля и в качестве источника стволовых клеток, которыми впоследствии будет витализирован распечатанный скаффолд. Одним из преимуществ подобного подхода является создание анатомически и биохимически персонализированного неиммуногенного изделия.

По литературным данным, для изготовления гидрогелей используется и децеллюляризованная ткань миокарда. После измельчения межклеточного матрикса, децеллюляризованную ткань подвергали пепсинолизу, в результате чего формировался самоорганизующийся гидрогель с сохраненной биоактивностью. Это было показано в эксперименте *in vitro* с использованием культуры мышечных фибробластов HL-1, межклеточный матрикс поддерживал высокую метаболическую активность и пролиферацию клеток. В эксперименте по моделированию ишемии, микрочастицы децеллюляризованной ткани сердца оказывали специфическое действие клеточного протектора на кардиомиоциты (Kappler B. et al., 2016).

Трансплантация поджелудочной железы является единственной надежной долгосрочной терапией для пациентов, имеющих инсулинозависимый сахарный диабет. Поскольку заболеваемость сахарным диабетом среди взрослых и детей растет с каждым годом, а при этом существуют ряд проблем при трансплантации, как недостаток донорских органов, высокая стоимость трансплантации и последующей поддерживающей иммуносупрессорной терапии, необходимость разработки новых подходов создания тканеинженерных конструкций для терапии заболеваний поджелудочной железы как никогда актуальна.

Децеллюляризацию поджелудочной железы человека проводили путем перфузии раствором тритона X-100 и гидроксида аммония или путем обработки дезоксихолатом. Далее полученный межклеточный матрикс был лиофилизирован и подвержен расщеплению в растворе пепсина в соляной кислоте, вследствие чего получали гидрогель межклеточного матрикса поджелудочной железы. Полученный гидрогель витализировали различными типами клеток поджелудочной железы, была показана биосовместимость с клеточной линией инсулиномы, бета-подобными стволовыми клетками, эндотелиальными клетками, что в последствии могло способствовать адекватной васкуляризации трансплантата. Также было продемонстрировано отсутствие иммуногенности полученного гидрогеля в *in vivo* эксперименте на мышах (Sackett S.D. et al., 2018).

Метод децеллюляризации применяли и к плаценте человека, интерес к которой связан с высоким содержанием компонентов межклеточного матрикса и эндогенных факторов роста (Wildman D.E., 2011). Удаление клеток проводили путем перфузии растворов детергентов додецилсульфат натрия и тритона X-100 (Kakabadze A., Kakabadze Z., 2015). Стоит отметить, что в полученном межклеточном матриксе сохранялась обширная сосудистая сеть, которая обеспечит адекватную доставку питательных веществ и кислорода клеткам после витализации (Kakabadze Z. Et al., 2016). Был исследован регенеративный потенциал децеллюляризованной плаценты как покрытия для заживления полнослойной кожной раны. В этом случае децеллюляризацию проводили путем гомогенизации ткани, а затем был применен комплекс физических, химических и ферментативных обработок для удаления клеток. После чего формировали тонкие скаффолды из межклеточного матрикса и подвергали лиофильному высушиванию. Полученные скаффолды исследовали в *in vivo* модели заживления кожной раны крысы. Эффективность применения подобного материала обусловлена его биологическими свойствами: противовоспалительные и антибактериальные свойства, низкая иммуногенность (Choi J.S. et al., 2013).

Большое количество экспериментальных данных по возможности применения децеллюляризованной ткани в различных сферах регенеративной медицины, а также по изучению уникальных биологических свойств межклеточного матрикса. обуславливает актуальность диссертационной работы, а также целесообразность сформулированных нами цели и задач исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. *Материалы*

Среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (Sigma, США), Среда Ham's F-12 (Flow Laboratories, Великобритания), Гентамицин-Ферейн, раствор для инъекций 4% (Ферейн, Россия), эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, США), Трипсин из поджелудочной железы свиньи, активность 285 ед/мг (ПанЭко, Россия), Этилендиаминтетрауксусная кислота (Sigma-Aldrich, США), Хлорид натрия (Sigma-Aldrich, США), Гидрофосфат натрия двузамещенный (Sigma, США), Дигидрофосфат калия (Panreac, Испания), Калия хлорид (Sigma, США), додецилсульфат натрия (Диа-М, Россия), тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США), Этанол ГОСТ 18300-72, Вода дистиллированная, подготовленная по ГОСТ 6709, Вода бидистиллированная, подготовленная с помощью системы Millipore Simplicity, степень чистоты 1 по ГОСТ Р 52501-2005, культуральные пластиковые чашки Петри диаметром 10 см и культуральные флаконы площадью 25 см² (Corning, США), пробирки культуральные на 15мл, 50 мл (Greiner bio-one, Австрия), Голубой декстран (Диа-М, Россия), медицинские инструменты: пинцеты, зажимы, хирургические ножницы по ГОСТ 19126-2007; внутривенная канюля Vasofix Certo 18 G (B.Braun, Германия), пробирки полипропиленовые микроцентрифужные типа «Эппендорф», пипетки автоматические (Eppendorf Research, Германия), фарфоровые ступка и пестик по ГОСТ 9147-80, гематоксилин (Novocastra Leica, Германия), эозин спиртовой раствор (Sigma, США), ксилол (Химмед, Россия), канадский бальзам (Sigma-Aldrich, США), ацетон (Химмед, Россия); Гепарин-натрий Браун раствор для инъекций 25000 ME (B.Braun, Германия), Марля медицинская, ГОСТ 9412-93, Тиопентал (Sandoz, Австрия), диметилсульфоксид (Panreac, Испания), Трентал® (Sanofi, Франция), тетразолиевая соль МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (Sigma, США), глицерин (Химмед, Россия), глутаровый альдегид (Sigma, США), цитодекс 3(GE Healthcare, Sweden), Хлоргесидин

биглюконат водный раствор 0,05% (ООО «РосБио», Россия), Жидкий азот по ГОСТ 9293-74, формалин (Химмед, Россия), уксусная кислота (Химмед, Россия), Histomix® (Биовитрум, Россия), хлорид кальция (Sigma-Aldrich, США), хлороформ (Химмед, Россия), ацетат аммония (Panreac, Испания), изопропанол (Химмед, Россия), агароза (Диа-М, Россия), набор эпоксидных смол (Sigma-Aldrich, США), пропиленоксид (Alfa Aesar,), дезоксихолат натрия (Sigma-Aldrich, США), хлороацетамид (Sigma-Aldrich, США), трис (Sigma-Aldrich, США), Трис (2-карбоксиил) фосфин гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США), гидроксид аммония (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США), коллагеназа 2 типа (Sigma-Aldrich, США), трифторуксусная кислота (Sigma-Aldrich, США).

2.2. Клеточные линии

Клетки линии гепатокарциномы человека Hep-G₂ инкубировали в пластиковых культуральных флаконах при 37⁰С и при 5%-ом содержании CO₂ в среде следующего состава: смешанные в равных пропорциях культуральные среды DMEM High glucose и Ham's F-12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 мг/мл раствора гентамицина, 0,324 мг/мл глутамина.

Фибробласты линии NIH 3T3 инкубировали в пластиковых культуральных флаконах при 37⁰С и при 5%-ом содержании CO₂ в среде DMEM Low glucose, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 мг/мл раствора гентамицина, 0,324 мг/мл глутамина.

2.3. Лабораторные животные

В экспериментах использовали мужских особей крыс породы Wistar (250-350 г). Животные получены из питомника лабораторных животных (Филиал «Андреевка» Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Научный Центр Биомедицинских Технологий» Федерального медико-биологического агентства). Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS) Strasbourg, 1986; директива 86/609 ESC работы с экспериментальными животными).

2.4. Методы

2.4.1. Децеллюляризация печени крысы

За 1 час до начала проведения операции крысам вводили 200 мкл гепарина для снижения тромбообразования. Далее через 30 минут вводили 200 мкл ангиопротектора, в качестве которого использовали трентал. Через 30 минут для общего парентерального наркоза крысам вводили 200 мкл тиопентала. Все препараты вводили внутривенно. Крысу помещали брюхом вверх на операционный стол и расправляли лапы. Пинцетом, оттягивая кожу на брюхе, ножницами производили продольный разрез кожи на средней линии брюшной стороны тела от полового отверстия до грудины. Кожу отворачивали и закрепляли. Брюшную полость вскрывали, сделав продольный разрез по средней линии, мышечные лоскуты отворачивали в стороны (Карташев Н.Н., 1981). Портальную вену канюлировали (диаметр канюли 18G), и печень полностью извлекали из тела крысы. На первом этапе печень перфузировали 200 мл натрий-фосфатного буфера со скоростью 150 мл/ч с помощью перфузионного насоса

(B.braun, Германия), чтобы освободить орган от крови. Далее готовили три группы образцов печени, в процедуре децеллюляризации которых использовали 3 варианта лизирующих растворов для перфузии следующего состава: группа 1. 500 мл натрий-фосфатного буфера, 0,1% додецилсульфата натрия, 1% тритона X-100; группа 2. Последовательная перфузия двух растворов 0,1% додецилсульфата натрия в натрий-фосфатном буфере (500 мл) с увеличивающейся концентрацией тритона X-100: 1% и 2%; группа 3. последовательная перфузия трех растворов 0,1% додецилсульфата натрия в натрий-фосфатном буфере (500 мл) с увеличивающейся концентрацией тритона X-100: 1%, 2% и 3%. Перфузию проводили со скоростью 150 мл/ч. Содержащиеся в растворах детергенты удаляли из печени перфузией с натрий-фосфатным буфером со скоростью 150 мл/ч.

2.4.2. Анализ сосудистого русла матрикса печени крысы

Децеллюляризованную печень крысы окрашивали на выявление сосудистого русла путем перфузии 0,5% раствора голубого декстрана с молекулярной массой 2 МДа со скоростью 150 мл/ч.

2.4.3. Гистологическое исследование

Полученные образцы децеллюляризованной ткани помещали в 4% раствор формалина и инкубировали в течение 12 часов при комнатной температуре. Образцы кожи крыс фиксировали с помощью смеси формалина, этанола и уксусной кислоты в объемном соотношении 4:1:0,3 в течение 2 часов при комнатной температуре.

Образцы дегидратировали путем инкубации в растворах этанола возрастающей концентрации (50%-70%-80%-96%) в течение 1 часа в каждом из растворов. Далее проводили замещение спирта путем инкубации образцов в смеси этаноловый спирт:ксилол в течение 30 минут и двукратной инкубации в чистом ксилоле в течение 40 минут. Дегидратированные образцы инкубировали в смеси

ксилола и среде для заливки образцов Histomix® (1:1) в течение 12 часов при 37⁰С, затем двукратно в среде Histomix® по 2 часа при 60⁰С. Образцы размещали в формы для заливки и заливали расплавленным Histomix®. Срезы образцов децеллюляризованной печени толщиной 14 мкм получали на криомикротоме Leica CM 1900 UV (Leica Microsystems GmbH, Германия), срезы образцов кожи толщиной 14 мкм получали на ротационном микротоме Thermo HM 325 (Thermo Fisher Scientific, США) и переносили на предметные стекла. Депарафинизацию срезов проводили путем последовательной инкубации срезов образцов в двух порциях ксилола по 5 минут, в двух порциях 96% этанола по 3 минуты, однократно в 70% этаноле в течение 3 минут и однократно в бидистиллированной воде в течение 3 минут. Далее производили окрашивание срезов гематоксилин-эозином. На срез наносили раствор гематоксилина на 10 минут, далее смывали бидистиллированной водой и помещали в водопроводную воду на 5 минут. Затем на 1,5 минуты наносили спиртовой 1% раствор эозина, смывали двумя порциями 96% этанола. После чего инкубировали в ксилоле в течение 10 минут. Полученные окрашенные срезы заключали в канадский бальзам и исследовали, используя оптический микроскоп Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия).

2.4.4. Изучение механических свойств децеллюляризованной ткани печени крысы

Изучение механических свойств конструкций проводили в лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии Национального медицинского исследовательского центра сердечно-сосудистой Хирургии Института имени А.Н. Бакулева под руководством Новиковой С.П.

Исследование механических свойств полученных образцов проводили на разрывной машине Zwick/Roell BZ 2.5/TNIS (Zwick GmbH & Co. KG, Германия). Для работы на аппарате готовили препаратов размером 5 см в длину и 5 мм в

ширину. Было три группы образцов: группа 1- образцы печени крысы, децеллюляризованной с 1% раствором тритон X-100, группа 2- образцы печени крысы, децеллюляризованной с 1% и 2% раствором тритон X-100, группа 3- образцы печени крысы, децеллюляризованной с 1%, 2%, 3% раствором тритон X-100. В каждой группе было по 5 образцов. Толщину образцов измеряли и учитывали при расчетах. Образцы помещали в зажимы прибора. Предварительная нагрузка была равна 0,05 Н. Далее проводили испытание образцов на растяжение со скоростью 50 мм/мин. Измеряли значения двух величин: прочность на разрыв в МПа и эластичность или удлинение в процентах от первоначальной длины образца. Полученные кривые зависимости силы от удлинения обрабатывали статистически с помощью программы TestXpert (Zwick Roell, Германия).

2.4.5. Изучение механических свойств полученных скаффолдов

Исследование механических свойств полученных образцов проводили на разрывной машине Zwick/Roell BZ 2.5/TNIS (Zwick GmbH & Co. KG, Германия). Для работы на аппарате готовили препаратов размером 5 см в длину и 15 мм в ширину. Было две группы образцов: группа 1- скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка, группа 2- композитные скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка с микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. В каждой группе было по 5 образцов. Толщину образцов измеряли и учитывали при расчетах. Образцы помещали в зажимы прибора. Предварительная нагрузка была равна 0,05 Н. Далее проводили испытание образцов на растяжение со скоростью 50 мм/мин. Измеряли значения двух величин: прочность на разрыв в МПа и эластичность или удлинение в процентах от первоначальной длины образца. Полученные кривые зависимости силы от удлинения обрабатывали статистически с помощью программы TestXpert (Zwick Roell, Германия).

2.4.6. Получение макрочастиц децеллюляризованной ткани печени крысы

Для получения макрочастиц децеллюляризованную ткань печени крысы измельчали с помощью хирургических ножниц, перемещали в пробирку и доводили объем до 15 мл раствором 15% глицерина в натрий-фосфатном буфере с рН=7,4. Инкубировали 20 минут, после чего центрифугировали 10 минут при 8500 g. Осадок измельчали в жидком азоте с помощью предварительно охлажденных пестика и ступки в течение 5 минут. Полученные частицы перемещали в чистую предварительно охлажденную пробирку и доводили объем до 25 мл дистиллированной водой при перемешивании.

Полученную массу пропускали через марлю, сложенную вдвое, для избавления от крупных не размельченных частиц ткани. Оставшуюся суспензию частиц центрифугировали 3 раза по 10 минут 450 g. После каждого центрифугирования отбирали супернатант. Из полученного осадка отбирали 500 мкл и переносили в 500 мкл 70% этанола, центрифугировали 3 раза по 5 минут при 450 g. Процесс фракционирования частиц контролировали визуально на оптическом микроскопе Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия). После фракционирования 80% макрочастиц имели размер в диапазоне 207 ± 50 мкм.

2.4.7. Получение микрочастиц децеллюляризованной ткани печени крысы

Для получения микрочастиц децеллюляризованную ткань печени крысы измельчали с помощью хирургических ножниц, перемещали в пробирку и доводили объем до 15 мл раствором 15% глицерина в натрий-фосфатном буфере с рН=7,4. Инкубировали 20 минут, после чего центрифугировали 10 минут при 8500 g. Осадок измельчали в жидком азоте с помощью предварительно охлажденных пестика и ступки в течение 15 минут. Полученные частицы перемещали в чистую предварительно охлажденную пробирку и доводили объем до 35 мл дистиллированной водой при перемешивании.

После оседания полученной суспензии частиц в течение суток, отбирали верхнюю 1/3 часть суспензии осевших частиц, которые центрифугировали в течение 10 минут при 1355 g дважды. Затем супернатант центрифугировали 10 минут при 720 g. Полученный супернатант центрифугировали 10 минут при 12100 g 4 раза. После этого, отбирали супернатант полностью, полученный осадок разводили в бидистиллированной воде в объеме в 10 раз меньшем, чем объем отобранной суспензии частиц после измельчения в жидком азоте.

2.4.8. Изготовление скаффолдов в виде пленок

Скаффолды в виде пленок изготавливали на основе фиброина шелка методом полива.

Фиброин для изготовления скаффолдов выделяли из шелковых нитей тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Для этого нити шелка диаметром 4-0 (Моснитки, Россия) в количестве 1 г разрезали на фрагменты по 0,5 см. Кипятили на водяной бане в течение 40 минут в растворе с добавлением двууглекислого натрия для очистки нитей от серицина и других примесей. Затем промывали 3600 мл дистиллированной воды. Кипятили 3 раза по 30 минут в бидистиллированной воде, промывая после каждого кипячения 3600 мл дистиллированной воды. После чего высушивали в сушильном шкафу. Для получения водного раствора фиброина в 1 мл спиртового раствора хлорида кальция раствора приготовленного из расчета 389 мг хлорида кальция, 388 мкл этанола и 544 мкл бидистиллированной на 1 мл, вносили навеску фиброина до конечной концентрации 130 мг/мл. Нагревали на водяной бане при 40°C в течение 4 часов. После чего производили четырехкратный диализ раствора против бидистиллированной воды и спектрофотометрическое определение концентрации фиброина на установке Thermo Genesis 10 UV (Thermo Fisher Scientific, США) в полученном после диализа растворе при длине волны 280 нм (коэффициент молярной экстинкции фиброина 1,07). Полученный водный раствор фиброина разводили до концентрации 20 мг/мл и наносили на поверхность полированного

тефлона, высушивали в течение 48 часов при комнатной температуре. После высушивания, на полученные скаффолды в виде пленок наносили 96% этанол и инкубировали в течение 30 минут, затем скальпелем отделяли пленки от поверхности тефлона. Изолированные пленки переносили в 70% этанол.

Для изготовления композитных скаффолдов на основе фиброина шелка в виде пленок в раствор фиброина шелка вносили суспензию микрочастиц децеллюляризованной ткани печени крысы. Перед внесением суспензию тщательно диспергировали и вносили в раствор для изготовления скаффолда до конечной концентрации микрочастиц 8 мг/мл.

2.4.9. Анализ содержания ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани

Выделение тотальной ДНК исследуемых образцов производили путем солевого осаждения. В исследуемый образец ткани, предварительно взвешенный, вносили пятикратный избыток 96% этанола, центрифугировали 3 минуты при 16873 g, супернатант отбирали. Процедуру повторяли два раза. Далее к образцу ткани вносили 0,57 г хлорида натрия и трехкратный избыток 96% этанола, тщательно растирали полученную массу и инкубировали на шейкере в течение 15 минут. Затем центрифугировали 5 минут при 16873 g, супернатант отбирали. Затем добавляли 500 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия и 10мМ ЭДТА, ресуспендировали и инкубировали 10 минут при +65°C. После этого внесли 250 мкл 7,5 М ацетата аммония и 100 мкл хлороформа, тщательно ресуспендировали смесь и центрифугировали 7 минут при 16873 g. В полученный супернатант вносили 100 мкл хлороформа, ресуспендировали и центрифугировали 10 минут при 16873 g, процедуру повторяли три раза. Далее супернатант смешивали с изопропанолом (объем изопропанола должен составлять 0,6 от объема полученного супернатанта), перемешивали и центрифугировали 10 минут при 16873 g. Полученный осадок промывали в 1 мл 70% этанола, ресуспендировали и центрифугировали 10 минут при 16873 g. Осадок снова промывали в 70% этаноле

и центрифугировали 20 минут при 16873 g. Полученный осадок, в котором находилась ДНК, обезвоживали в сушильном шкафу при +37°C в течение 10 минут. Далее к осадку добавляли бидистиллированную воду в два раза меньше по объему, чем изначальный объем ткани, и инкубировали при +55°C в течение 20 минут. Измерение концентрации ДНК в полученном растворе производили спектрофотометрически на установке Thermo Genesis 10 UV (Thermo Fisher Scientific, США).

2.4.10. Анализ фракции остаточной ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани

Для определения размера фрагментов остаточной ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани печени проводили горизонтальный электрофорез в 1,5% агарозном геле.

2.4.11. Анализ структуры образцов методом сканирующей электронной микроскопии

Исследуемые образцы для сканирующей микроскопии фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере в течение 2 часов в темноте при +4°C. Далее фиксированные образцы отмывали 5 раз по 5 минут в фосфатно-солевом буфере. Затем образцы обезвоживали проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией (10%-30%-50%-70%-80%-96%), инкубируя 30 минут в каждом, и переносили в ацетон. Образцы высушивали методом перехода критической точки ($T_{кр. CO_2}=31^\circ C$, $p_{кр. CO_2}=72,8 \text{ кг/см}^2$) с помощью прибора K850 (Quorum Technologies, Великобритания). Высушенные образцы покрывали слоем золота толщиной 10 нм в атмосфере аргона при ионном токе 20 мА и давлении 1 мбар. с помощью вакуумной напылительной установки Q150R ES (Quorum Technologies, Великобритания), затем анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega 3 (Tescan, Чехия)

при рабочем напряжении 15 кВ. Изображения получали с использованием программного обеспечения Tescan VegaTC (Tescan, Чехия).

2.4.12. Анализ структуры образцов методом сканирующей зондовой нанотомографии

Анализ трехмерной структуры образцов фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы методом сканирующей зондовой нанотомографии был выполнен с использованием зондовой нанолaborатории Ntegra Tomo (NT-MDT, Москва). Данный приборный комплекс представляет собой комбинацию сканирующего зондового микроскопа и ультрамикротом (Leica EM UC6, Leica Microsystems GmbH, Австрия) и позволяет получать СЗМ-изображения поверхности образца непосредственно после выполнения сверхтонких срезов поверхности ультрамикротомом. Образцы фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере в течение 2 часов в темноте при +4°C. Далее фиксированные образцы отмывали 3 раза по 10 минут в фосфатно-солевом буфере. Затем образцы обезвоживали проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией (30%-50%-70%-80%-96%), инкубируя 10 минут в каждом, и переносили в пропиленоксид, в котором проводили инкубацию 3 раза по 10 минут. Далее образцы переносили в смесь пропиленоксид:эпоксидная смола в соотношении 1:1 и инкубировали в этой смеси в течение 30 минут комнатной температуре, затем проводили инкубацию в течение 30 минут в смеси пропиленоксид:эпоксидная смола в соотношении 1:2 комнатной температуре. Образцы переносили в эпоксидную смолу и инкубировали при температуре 45°C в течение 24 часов и при температуре 60°C в течение 72 часов до полного затвердевания. После этого выполняли серию последовательных срезов образцов. Последовательные срезы образца выполнялись с использованием ультразвукового алмазного ножа Ultra sonic 35 (Diatome AG, Швейцария) с шириной режущей кромки 3.0 мм. СЗМ-измерения проводились в полуконтактном режиме при скорости сканирования 1 Гц с использованием кремниевых зондов-кантилеверов

ETALON HA_HR (Tipsnano OÜ, Эстония) с резонансной частотой 390 кГц и радиусом кривизны острия < 10 нм. Первичная обработка СЗМ изображений проводилась в программе Nova ImageAnalysis 1.0.26.1443 (NT-MDT, Москва). По полученной серии СЗМ-изображений была реконструирована трехмерная структура образца. Для визуализации трехмерной структуры использовался программный пакет ImagePro Plus 6.0 (MediaCybernetics Inc, США).

2.4.13. Анализ цитотоксичности образцов

Оценку цитотоксичности проводили согласно ГОСТ ISO 10993-2-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*» с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида (МТТ). Анализ цитотоксичности образцов производили на примере линии клеток мышинных фибробластов 3Т3. Для этого мышинные фибробласты 3Т3 культивировали в 300 мкл культуральной среды Dulbecco's Modified Eagle's Medium- low glucose, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4мМ глутамина и 40 мкг/мл гентамицина, в 96-луночном планшете в термостате при 37°C, 5% CO₂ в течение 3 дней. Затем производили смену питательной среды и вносили образцы в лунки: на 1 лунку один фрагмент. Далее инкубировали образцы в термостате при 37°C, 5% CO₂ в течение 7 дней. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Далее в каждую лунку планшета вносили по 60 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл. Инкубировали в термостате при 37°C при содержании 5% CO₂ в течение 4 часов до выпадения темно- синих кристаллов формазана. Затем планшет центрифугировали в течение 5 минут при 885 g, предварительно удалив исследуемые образцы. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в 300 мкл диметилсульфоксида в течение 20 минут и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм на приборе Picon (Picon incorporated company, Униплан, Россия).

2.4.14. Анализ пролиферативной активности клеток на межклеточном матриксе

Эксперимент проводили в пробирках на 2 мл. Для исследования пролиферативной активности использовали 4 различных субстрата: макрочастицы печени, децеллюляризованной раствором, содержащим 1% тритона X-100, макрочастицы печени, последовательно децеллюляризованной 1% и 2% растворами тритона X-100, макрочастицы печени, последовательно децеллюляризованной 1%, 2% и 3% растворами тритона X-100, в качестве положительного контроля использовали цитодекс-3. В каждую пробирку вносили по 50 мкл носителей, 100 мкл среды инкубации с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 мкг/мл гентамицина, содержащей $5,3 \cdot 10^4$ клеток культуры гепатокарциномы человека Hep-G₂. Клетки инкубировали в термостате при 37°C, 5% CO₂ при перемешивании в течение 9 дней.

Оценку пролиферативной активности гепатокарциномы человека Hep-G₂ проводили с помощью МТТ-теста на 3-ий, 6-ой и 9-ый дни эксперимента. В каждую пробирку вносили по 50 мкл пятикратного раствора 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), который является субстратом для функционирующих в живых клетках митохондриальных дегидрогеназ, инкубировали в термостате при 37°C при содержании 5% CO₂ в течение 4 часов. При этом образовывались нерастворимые темно-синие кристаллы формазана (Mossman T.,1983). Затем пробирки центрифугировали в течение 15 минут при 885 g. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в диметилсульфоксиде. Окрашенный раствор переносили в 96-ти луночный планшет. Значение оптической плотности регистрировали при длине волны 540 нм на приборе Picon (Picon incorporated company, Униплан, Россия).

2.4.15. Анализ пролиферативной активности клеток на скаффолдах и лиофилизированных фрагментах децеллюляризованной ткани

Эксперимент проводили в 96-луночном планшете. Для проведения эксперимента скаффолды на основе фиброина шелка и лиофилизированные фрагменты децеллюляризованной ткани печени позиционировали в лунки планшета. В качестве контроля использовали культуральный пластик. Перед проведением теста образцы подвергали стерилизации: скаффолды сначала обрабатывали 70%-ным спиртом в течение 30 минут, затем облучали ультрафиолетом (Длина волны 253,7 нм, лампа Philips TUV 15W/G15; Philips Lighting B.V., Нидерланды) скаффолды и лиофилизированные фрагменты в течение 30 минут. После этого в планшет вносили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 15 минут, после чего производили смену фосфатно-солевого буфера. Данную процедуру повторяли три раза. Далее в планшет вносили по 300 мкл среды инкубации на 30 минут.

Суспензию клеток в среде инкубации переносили в 96-луночные планшеты из расчета 1000 клеток лунку. В эксперименте использовали две линии клеток – линию мышечных фибробластов 3T3 и линию клеток гепатокарциномы человека Hep-G₂. Клетки инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂ в течение 7 дней.

Оценку адгезии и пролиферативной активности клеток проводили визуально с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Германия). Для этого образцы окрашивали флуоресцентным красителем DAPI, который связывается с ДНК клеток. Перед окрашиванием производили двукратную отмывку образцов от среды инкубации и неадгезированных клеток раствором фосфатно-солевого буфера. После этого вносили водный раствор красителя с концентрацией 3 мкг/мл из расчета 300 мкл на чашку Петри и инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO₂ в течение 5 минут. Затем образцы двукратно отмывали от несвязавшегося красителя раствором фосфатно-солевого буфера. Полученные образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе с помощью фильтра с диапазоном возбуждения 360-370 нм, диапазоном эмиссии 420-470 нм.

Изображения клеток получали с помощью камеры AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия), полученные изображения обрабатывали в программе Zen 2.3 Blue Edition (Carl Zeiss, Германия). По полученным изображениям проводили подсчет клеток в поле зрения микроскопа.

2.4.16. Изготовление образцов децеллюляризованной ткани печени

Децеллюляризованную печень измельчали хирургическими ножницами, размер полученных фрагментов 8 ± 2 мм. Полученную массу перемещали в пробирку и инкубировали в бидистиллированной воде в течение 30 минут. Далее переносили децеллюляризованную ткань в чашку Петри и отбирали избытки влаги, сохраняя расстояние между частями матрикса вдвое больше их размера. В течение одного часа замораживали образцы при температуре -80°C , затем лиофильно высушивали с помощью лиофильной сушилки IShinBioBase FD8580 (IShinBioBase Co. Ltd., Южная Корея). Полученные лиофильно высушенные образцы измельчали до размера 2×2 мм и стерилизовали под ультрафиолетом (Длина волны 253,7 нм, лампа Philips TUV 15W/G15; Philips Lighting B.V., Нидерланды) в течение 30 минут.

2.4.17. Анализ биохимического состава децеллюляризованной ткани печени

Анализ биохимического состава децеллюляризованной ткани печени проводили в лаборатории протеомики Института биоорганической Химии имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова под руководством Зиганшина Р.Х.

Для исследования биохимического состава межклеточного матрикса печени полученные образцы лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени подвергали ферментативному расщеплению. Образец лиофилизированной ткани печени (500 мкг) ресуспендировали в 250 мкл буфера, содержащего: 100 мМ Трис рН 8.5, 10 мМ ТСЕР, 20 мМ 2-хлороацетамид, 1% дезоксихолат натрия. Прогревали

10 мин при +95°C, охлаждали до комнатной температуры и добавляли 250 мкл буфера (100 mM Трис pH 8.5), содержащего 5 мкг трипсина. Раствор оставляли перемешиваться при +37°C на ночь. Далее проводили обессоливание раствора пептидов на микроколонках SDB-RPS Stage-tips. Микроколонки для обессоливания пептидов изготавливали из наконечника для автоматических пипеток (200 мкл) и двух кусочков мембраны Empore SDB-RPS (3M), вырезанных иглой 14 калибра. Для обессоливания одного образца использовали 2 микроколонки. Пептиды наносили на микроколонку центрифугированием при 200 g в течение 6 мин, промывали 100 мкл 0.2% TFA и элюировали 60 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 80% ацетонитрила. Элюат высушивали на центрифужном вакуумном испарителе досуха и хранили до хромато-масс-спектрометрического анализа при -85°C. Полученные пептидные фракции растворяли в 15 мкл водного раствора, содержащего 2% ацетонитрила и 0.1%TFA, и 5 мкл наносили на колонку (диаметр 75 мкм, длина 25 см) с сорбентом Aeris Peptide XB-C18 2.6 m (Phenomenex). Разделение пептидов проводили на хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, США), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, США) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ MS/MS-данных проводили при помощи компьютерной программы PEAKS Studio 8.0 build 20160908 9 (Ma B. Et al., 2003). Первичные структуры пептидов, генерируемые программой PEAKS Studio, анализировали против базы данных белковых последовательностей UNIPROT KB (Зиганшин Р.Х. и др., 2018).

2.4.18. Биodeградация децеллюляризованной ткани печени

Лиофилизированные фрагменты децеллюляризованной ткани печени массой по 5 мг разделяли на две группы (контрольную и экспериментальную) по 3 образца на каждую временную точку. Фрагменты контрольной группы помещали в раствор фосфатно-солевого буфера, фрагменты экспериментальной

группы образцов помещали в раствор коллагеназы 2 типа с концентрацией 1 мг/мл. Образцы обеих групп инкубировали при 37 °С, фрагменты децеллюляризованной ткани печени лиофильного высушивали через 3, 6, 12, 24 и 48 часов инкубации в растворах, а затем взвешивали. По полученным данным строили кривые биодеградации конструкций.

2.4.19. Проведение эксперимента по заживлению полнослойной кожной раны крысы *in vivo*

Эксперимент *in vivo* проводили на модели заживления кожного покрова крысы породы Wistar. Эксперимент проходил на шести группах животных: группа 1- отрицательный контроль, нанесенную рану не покрывали каким-либо материалом, способствующим заживления кожи, группа 2- экспериментальная, рану покрывали фрагментами лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы, группа 3-экспериментальная, рану покрывали скаффолдами в виде пленок на основе фиброина шелка, группа 4- экспериментальная, рану покрывали скаффолдами в виде пленок на основе фиброина шелка с внесенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. В каждой группе было по 5 крыс. Все манипуляции производили под ингаляционным эфирным наркозом, обеспечиваемым с помощью эксикатора из расчета 50 мг/кг, при этом животные находились на спонтанном дыхании. Крысу фиксировали на операционном столе, на спине в области лопаток выщипывали шерсть, кожу обрабатывали 70% спиртом. Наносили хирургическими ножницами круглую рану таким образом, чтобы были затронуты все слои кожи: эпидермис, дерма и гиподерма. Рану обрабатывали 0,05% водным раствором хлоргексидин биглюконата. Далее раны крыс из контрольной группы покрывали стерильной марлевой повязкой. На раны животных экспериментальных групп размещали образцы конструкций, затем рану смачивали 0,05% водным раствором хлоргексидин биглюконата и покрывали стерильной марлевой повязкой.

Конструкции для групп 2 и 3 подготавливали следующим образом: На поверхность раны крыс распределяли частицы лиофильно высушенного матрикса печени так, чтобы рана была закрыта на 70%. Конструкции в виде пленок из групп 4,5 и 6 распределяли на слегка подсушенной ране, расправляя края пленки, до полного смачивания пленки на ране. Всех крыс помещали в одиночные клетки, с полным доступом воды и пищи. Оценку заживления кожных покровов для экспериментальных группы проводили на 3-ий, 9ый, 14-ый, 18-ый и 23-ий день эксперимента, для контрольной- на 3-ий, 9ый, 14-ый, 18-ый, 23-ий, 28-ой, 35-ый, 40-ой день. Изображения ран получали с помощью фотокамеры Nikon D5100 18-105 VR Kit с объективом Nikon AF-S DX 18-105 mm f/3,5-5,6 G ED VR (Nikon, Япония). В качестве количественной характеристики успешной терапии раны использовали коэффициент уменьшения раны, рассчитываемый по формуле 1:

$$A = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

Где A_0 - диаметр раны при ее нанесении,

A_t -диаметр раны в контрольный день.

По полученным значениям строили кривые заживления кожного покрова. По достижению визуального полного закрытия полнослойной кожной раны, производили забор образцов кожи размером 20x20 мм, фиксировали с помощью смеси формалина, этанола и уксусной кислоты в объемном соотношении 4:1:0,3 и проводили гистологический анализ ткани.

2.4.20. Статистическая обработка результатов экспериментов

Данные были обработаны методом дисперсионного анализа. Статистическая значимость различий результатов оценивалась по критерию Манна-Уитни. Уровень статистической значимости p считали равным 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Децеллюляризация печени крысы

В рамках работы были получены три группы образцов децеллюляризованной печени крысы породы Wistar путем перфузии через портальную вену растворов 0,1% додецилсульфата натрия с последовательно увеличивающейся концентрацией тритона X-100: группа 1- образцы печени, децеллюляризованной раствором, содержащим 1% тритона X-100, группа 2- образцы печени, последовательно децеллюляризованной двумя 1% и 2% растворами тритона X-100, группа 3- образцы печени, последовательно децеллюляризованной тремя 1%, 2% и 3% растворами тритона X-100. В каждой группе представлено по 5 образцов. Образцы всех групп представляют собой освобожденный от клеток полупрозрачный матрикс печени крысы (Рисунок 1).



Рисунок 1. Децеллюляризация печени крысы породы Wistar. 1- перфузия печени с раствором PBS для освобождения от крови. 2- перфузия печени с лизирующим раствором, содержащими 1% тритона X-100. 3-отмывка печени от детергентов.

3.2. Анализ сосудистой системы децеллюляризованной печени крысы

Для анализа сосудистого русла после децеллюляризации органа, децеллюляризованная ткань печени крысы была окрашена внутрисосудистым введением раствора голубого декстрана. На рисунке 2 продемонстрировано сохранение сосудистого русла, как крупных сосудов, так и мелких капилляров.

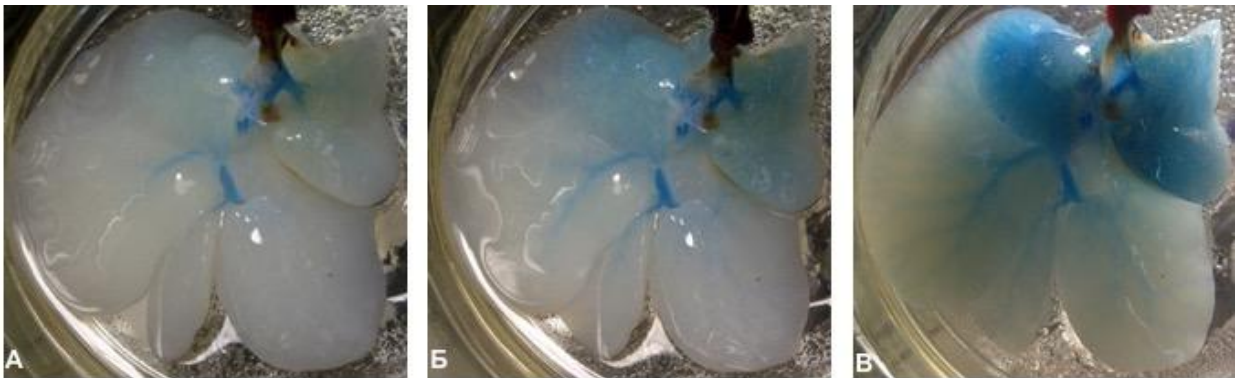


Рисунок 2. Окрашенная раствором голубого декстрана децеллюляризованная печень крысы. А- децеллюляризованный орган через 6 минут после начала окрашивания. Б- децеллюляризованный орган через 7 минут после начала окрашивания. В- децеллюляризованный орган через 9 минут после начала окрашивания.

3.3. Гистологический анализ структуры полученной децеллюляризованной печени крысы

Гистологический анализ полученной децеллюляризованной ткани печени крысы был проведен после окрашивания срезов гематоксилин-эозином. При анализе препаратов было показано, что после перфузии органа сохранена архитектура и естественный структурный мембранный матрикс. Гистологическая оценка не показала ядерного или цитоплазматического окрашивания в децеллюляризованной ткани (Рисунок 3). Различий в структуре матриксов ткани,

децеллюляризованной с помощью растворов с различными концентрациями тритона X-100 не было выявлено.

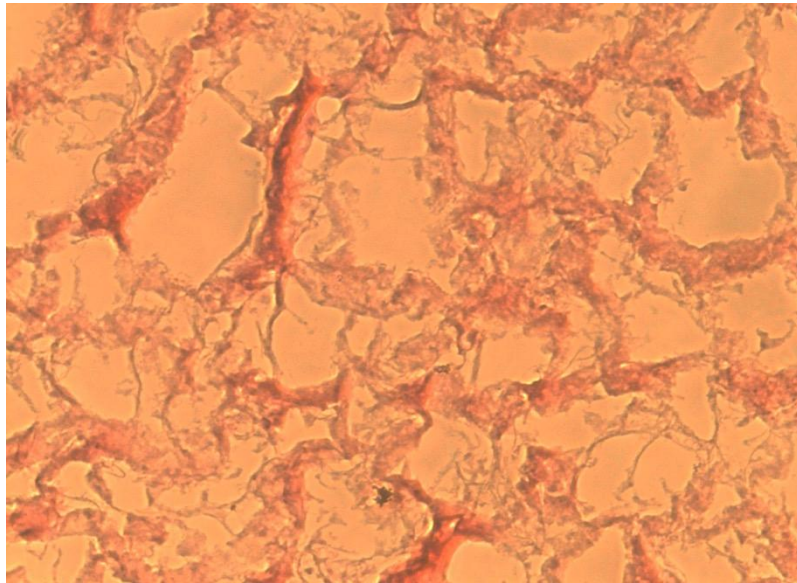


Рисунок 3. Печень крысы, последовательно децеллюляризованная тремя 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100. Окраска гематоксилин-эозин. Сохранена специфическая структура печеночного матрикса. Гистология не выявила ядер (увеличение x200).

3.4. Исследование механических свойств децеллюляризованной печени крысы

Исследовано изменение механических свойств матрикса печени в зависимости от концентрации детергентов, используемых для децеллюляризации. Для регистрации значения прочности материала на разрыв (МПа) и эластичности (% удлинения), образцы подвергали деформации на разрывной машине Zwick/Roell BZ 2.5/TNIS. Значения показателей, измеренных в ходе эксперимента, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Данные измерения прочности на разрыв и эластичности различных образцов децеллюляризованной ткани печени крысы. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений.

Образец	Прочность, МПа	Эластичность, %
Печень крысы, децеллюляризованная 0,1% раствором додецилсульфат натрия, содержащим 1% тритона X-100	0,16±0,03	64,25±4,65
Печень крысы, последовательно децеллюляризованная 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1% и 2% тритона X-100	0,18±0,06	55,33±10,00
Печень крысы, последовательно децеллюляризованная 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100	1,11±0,04	77,50±5,79
Нативная печень крысы	0,27 (Moffitt T.P. et.al., 2002)	

По полученным данным, представленным в таблице 1, построили гистограммы изменения показателей прочности и эластичности в зависимости от матрикса (рисунки 4,5).

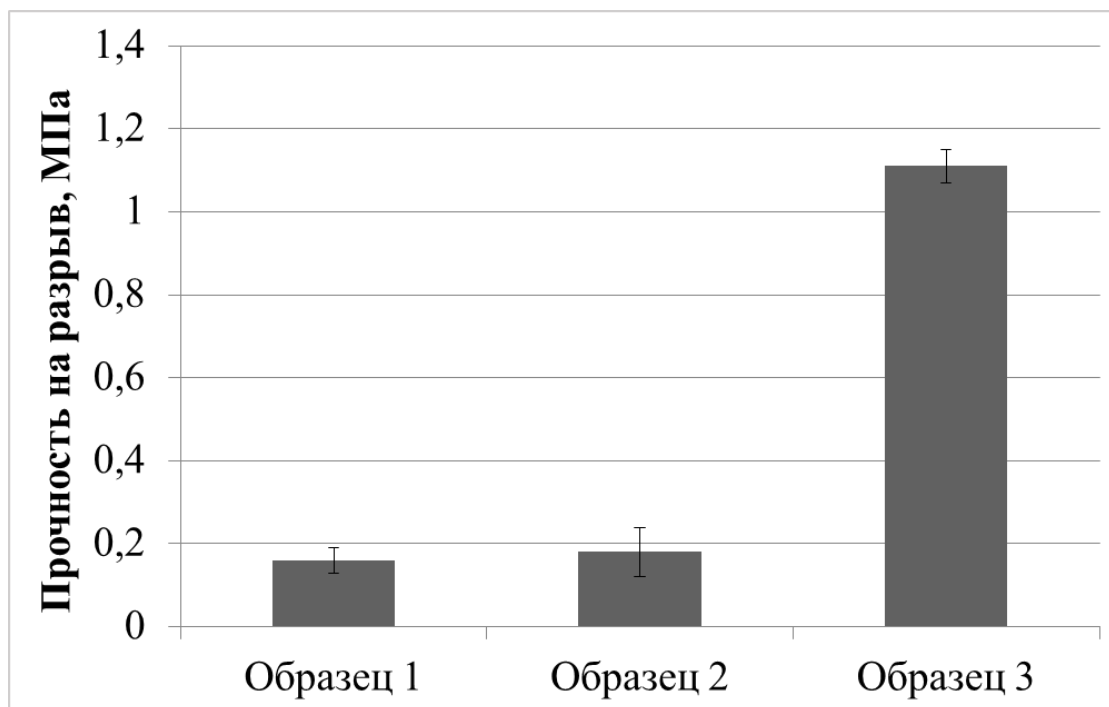


Рисунок 4. Гистограмма сравнения прочности на разрыв децеллюляризованной печени крысы, полученной при разных условиях. Образец 1- Печень крысы, децеллюляризованная 0,1% раствором додецилсульфат натрия, содержащим 1% тритона X-100, Образец 2- Печень крысы, последовательно децеллюляризованная 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1% и 2% тритона X-100, Образец 3- Печень крысы, последовательно децеллюляризованная 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений.

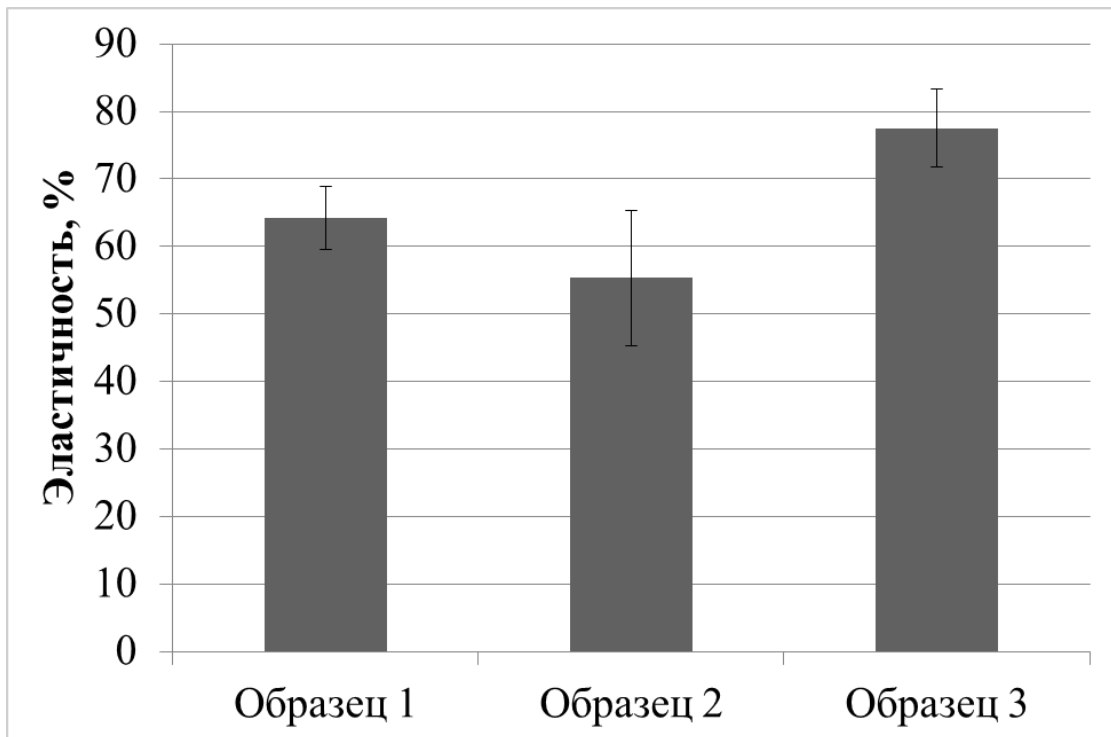


Рисунок 5. Гистограмма сравнения эластичности децеллюляризованной печени крысы, полученной при разных условиях. Образец 1- Печень крысы, децеллюляризованная 0,1% раствором додецилсульфат натрия, содержащим 1% тритона X-100, образец 2- Печень крысы, последовательно децеллюляризованная 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1% и 2% тритона X-100, образец 3- Печень крысы, последовательно децеллюляризованная 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений.

Таким образом, наиболее прочными и эластичными являются образцы печени крысы, последовательно децеллюляризованной 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащим 1%, 2% и 3% тритона X-100.

3.5. Получение макрочастиц межклеточного матрикса печени крысы

Из полученной децеллюляризованной ткани печени крысы изготовили макрочастицы путем измельчения полученного матрикса печени крысы в жидком азоте. Фракция макрочастиц со средним размером 207 ± 50 мкм составила 80% по массе от общего количества ткани (Рисунок 6).

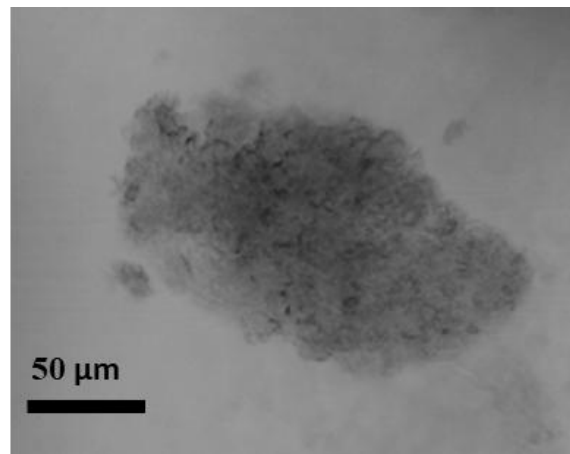


Рисунок 6. Изображение макрочастицы межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы.

3.6. Оценка пролиферативной активности клеток Hep-G₂ на макрочастицах межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы

Оценка пролиферативной активности клеток проводилась на примере культуры гепатокарциномы человека Hep-G₂. В качестве положительного контроля был использован коммерческий микроноситель цитодекс 3, который представляет собой микросферы со средним диаметром 175 мкм, покрытые денатурированным коллагеном. Оценка пролиферативной активности проводилась с помощью МТТ-теста. Эксперимент проводили в течение 9 дней, было 3 контрольных точки измерения. По полученным данным построили гистограмму (Рисунок 7). Наибольшая пролиферативная активность клеток была

зарегистрирована на макрочастицах межклеточного матрикса печени, последовательно децеллюляризованной 0,1% растворами додецилсульфата натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100.

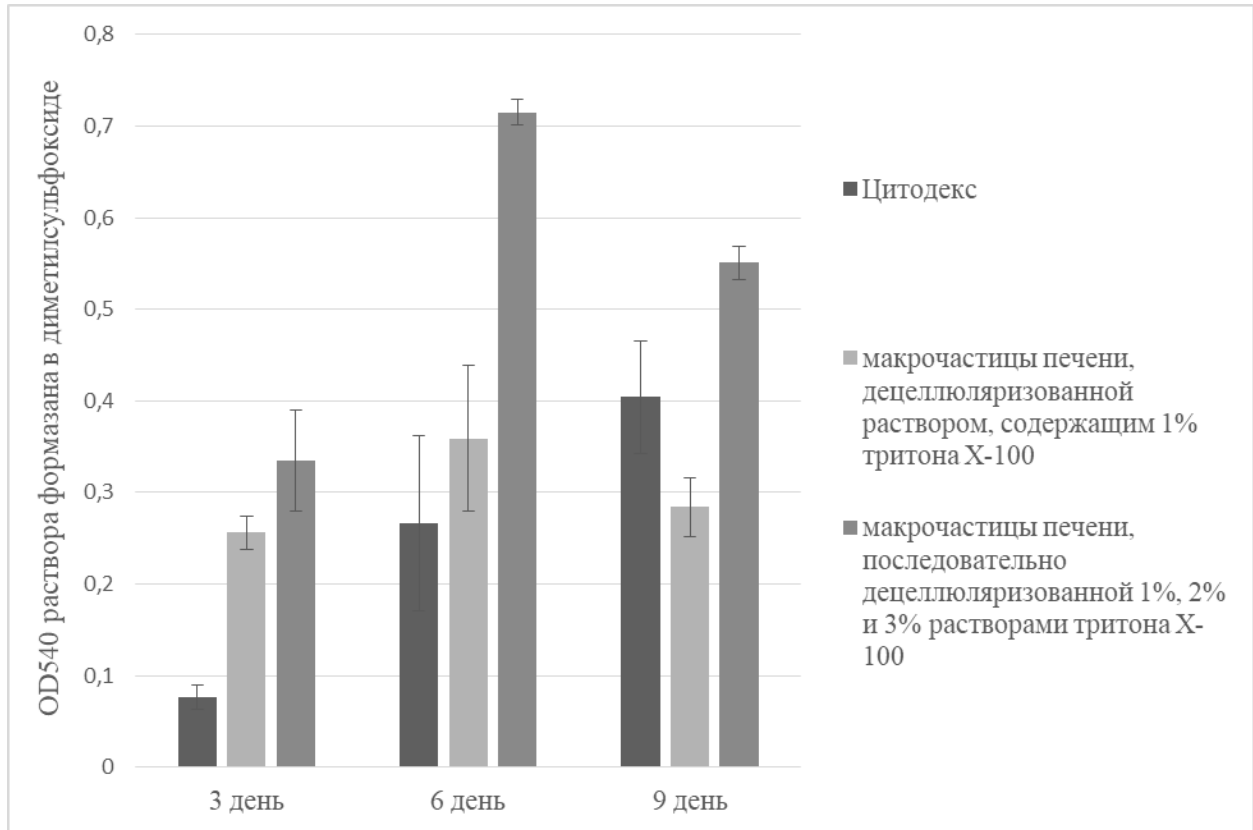


Рисунок 7. Данные о пролиферативной активности клеток культуры *Hep-G₂* на различных носителях на 3-ий, 6-ой и 9-ый дни эксперимента. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых экспериментов.

Учитывая представленные выше результаты, для дальнейших экспериментов был выбран протокол децеллюляризации ткани печени крысы, в котором была использована последовательная перфузия 0,1% растворами додецилсульфата натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100.

3.7. Анализ содержания ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани печени крысы.

ДНК децеллюляризованной и нативной ткани печени крысы была выделена методом солевого осаждения. Анализ концентрации остаточной ДНК децеллюляризованной ткани печени в сравнении с ДНК нативной ткани был произведен спектрофотометрически, также был проанализирован размер фрагментов остаточной ДНК в образцах электрофотометрически, полученные данные представлены на рисунке 8. Содержание ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани печени крысы составляет менее 1% от количества ДНК в нативной ткани. В образцах децеллюляризованной ткани печени крысы не было обнаружено фрагментов ДНК длиной более 200 пар нуклеотидов.

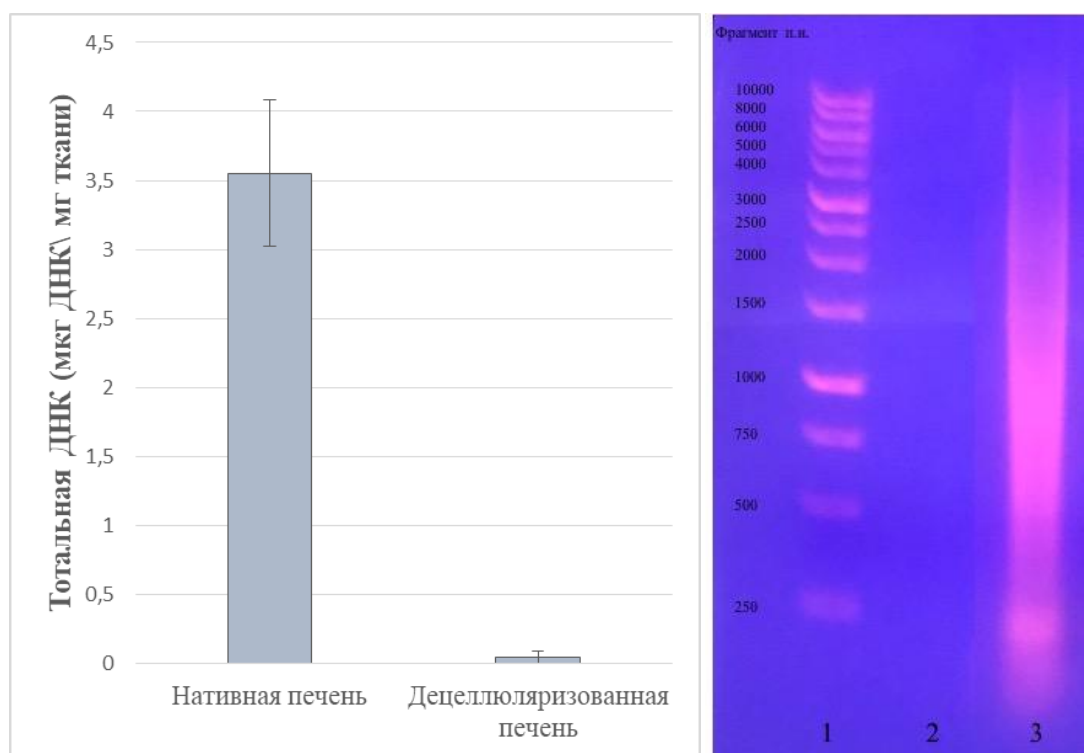


Рисунок 8. Сравнение количества остаточной ДНК в образцах нативной и децеллюляризованной ткани печени крысы. Электрофорез: 1- полоса маркера, 2- полоса образца децеллюляризованной ткани печени, 3- полоса нативной ткани печени крысы. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых экспериментов.

3.8. Получение лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы

Были получены фрагменты лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы, которые используются в данной работе в качестве одной из форм конструкций на основе межклеточного матрикса ткани для регенерации тканей. Для этого измельченную децеллюляризованную ткань печени, у которой предварительно отбирали избыток воды, в течение одного часа замораживали при температуре -80°C , затем лиофильно высушивали с помощью лиофильной сушки. Полученные лиофильно высушенные образцы измельчали до размера 2x2 мм и стерилизовали под ультрафиолетом в течение 30 минут.

3.9. Анализ биохимического состава децеллюляризованной ткани печени.

Анализ биохимического состава децеллюляризованной ткани печени проводили с помощью масс-спектрометрии, для которой фрагменты лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы предварительно подвергали ферментативному расщеплению. В состав полученного межклеточного матрикса входят: коллаген I, III, IV и VI типов, бигликан, фибриллин. Полный перечень белков выявленных в ходе анализа представлен в таблице 2.

Таблица 2. Результаты масс-спектрометрического анализа децеллюляризованной ткани печени крысы.

Protein ID	Accession	Area Rat	#Peptides	#Unique	#Spec Rat	Avg. Mass	Description
2128	sp P63259 ACTG_RAT	1.18E8	22	22	45	41793	Actin, cytoplasmic 2
2129	sp P60711 ACTB_RAT	1.18E8	22	22	45	41737	Actin, cytoplasmic 1
2131	sp P09118 URIC_RAT	1.1E8	23	23	35	34934	Uricase
2154	D4ACV3 D4ACV3_RAT	4.09E7	10	4	20	13645	Histone H2A
2155	sp P0CC09 H2A2A_RAT	4.09E7	10	4	20	14095	Histone H2A type 2-A
2156	sp P02262 H2A1_RAT	4.09E7	10	4	20	14077	Histone H2A type 1
2157	K7S2S2 K7S2S2_RAT	4.09E7	10	4	20	14095	Histone H2A
2133	G3V6P7 G3V6P7_RAT	1.46E7	16	16	20	226411	Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle
2134	sp Q62812 MYH9_RAT	1.46E7	16	16	20	226336	Myosin-9
2151	D3ZXP3 D3ZXP3_RAT	4.99E6	8	2	18	15115	Histone H2A
2135	G3V8B3 G3V8B3_RAT	1.39E8	9	9	50	13906	Histone H2B
2136	A0A0G2JXI9 A0A0G2JXI9_RAT	1.39E8	9	9	50	15479	Histone H2B
2139	D3ZWM5 D3ZWM5_RAT	1.39E8	9	9	50	13964	Histone H2B
2140	A0A0G2JXE0 A0A0G2JXE0_RAT	1.39E8	9	9	50	13922	Histone H2B
2144	D3ZNH4 D3ZNH4_RAT	1.39E8	9	9	50	15493	Histone H2B
2148	sp Q10758 K2C8_RAT	4.54E6	8	8	10	54019	Keratin, type II cytoskeletal 8
2149	Q80WH8 Q80WH8_9MURI	4.54E6	8	8	10	54035	Cytokeratin-8
2152	sp P62804 H4_RAT	2.34E7	9	9	15	11367	Histone H4
2196	sp P84245 H33_RAT	1.36E6	5	2	9	15328	Histone H3.3
2197	D3ZK97 D3ZK97_RAT	1.36E6	5	2	9	15358	Histone H3
2183	D3ZJ08 D3ZJ08_RAT	3.98E5	4	1	7	15388	Histone H3
2179	sp P02454 CO1A1_RAT	7.35E6	5	5	8	137954	Collagen alpha-1(I) chain
2184	A0A0G2K5E8 A0A0G2K5E8_RAT	1.36E7	4	4	5	120044	Collagen, type I, alpha 2
2185	F1LS40 F1LS40_RAT	1.36E7	4	4	5	129630	Collagen type I alpha 2 chain
2186	sp P02466 CO1A2_RAT	1.36E7	4	4	5	129564	Collagen alpha-2(I) chain
2187	A0A0G2KAN1 A0A0G2KAN1_RAT	1.36E7	4	4	5	129595	Collagen, type I, alpha 2
2182	D3ZUL3 D3ZUL3_RAT	6.83E5	2	2	2	108806	Collagen type VI alpha 1 chain
2211	sp Q5BJY9 K1C18_RAT	1.1E6	4	4	6	47761	Keratin, type I cytoskeletal 18
2181	sp P47853 PGS1_RAT	6.57E5	2	2	3	41706	Biglycan
2201	Q6P6R6 Q6P6R6_RAT	1.2E6	3	3	3	76936	Transglutaminase 2, C polypeptide

Protein ID	Accession	Area Rat	#Peptides	#Unique	#Spec Rat	Avg. Mass	Description
2202	<u>Q9WVJ6 Q9WVJ6_RAT</u>	1.2E6	3	3	3	76935	Tissue-type transglutaminase
2210	<u>sp Q02874 H2AY_RAT</u>	1.36E6	3	2	3	39504	Core histone macro-H2A.1
2212	<u>sp Q02874-2 H2AY_RAT</u>	1.36E6	3	2	3	39040	Isoform 1 of Core histone macro-H2A.1
2214	<u>A0A140TAB4 A0A140TAB4_RAT</u>	1.36E6	3	2	3	39070	Core histone macro-H2A
2204	<u>sp Q64119 MYL6_RAT</u>	4.31E5	2	2	2	16975	Myosin light polypeptide 6
2205	<u>A0A0G2K6J5 A0A0G2K6J5_RAT</u>	4.31E5	2	2	2	16961	Myosin light polypeptide 6
2206	<u>B2GV99 B2GV99_RAT</u>	4.31E5	2	2	2	17013	Myl6 protein
2208	<u>A0A0G2JWE1 A0A0G2JWE1_RAT</u>	4.31E5	2	2	2	12528	Myosin light polypeptide 6
2213	<u>D4A8G5 D4A8G5_RAT</u>	3.21E6	2	2	3	74753	Transforming growth factor, beta-induced
2190	<u>D3ZL10 D3ZL10_RAT</u>	8.65E4	1	1	1	246793	Collagen type VI alpha 6 chain
2220	<u>Q9WUH8 Q9WUH8_RAT</u>	2.27E5	2	2	2	312072	Fibrillin-1
2221	<u>G3V9M6 G3V9M6_RAT</u>	2.27E5	2	2	2	311953	Fibrillin 1, isoform CRA_a
2242	<u>Q4V8N0 Q4V8N0_RAT</u>	1.1E6	2	2	3	52765	Lipocalin 7, isoform CRA_a
2215	<u>sp P13941 CO3A1_RAT</u>	7.75E4	1	1	1	138937	Collagen alpha-1(III) chain
2222	<u>sp P85834 EFTU_RAT</u>	1.69E4	1	1	1	49522	Elongation factor Tu, mitochondrial
2749	<u>Q0QEP3 Q0QEP3_RAT</u>	4.82E4	1	1	1	37252	ATP synthase subunit beta (Fragment)
2750	<u>G3V6D3 G3V6D3_RAT</u>	4.82E4	1	1	1	56345	ATP synthase subunit beta
2751	<u>sp P10719 ATPB_RAT</u>	4.82E4	1	1	1	56354	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
2752	<u>P97726 P97726_9MURI</u>	2.32E4	1	1	1	28947	Tropomyosin 5
2230	<u>F1M6Q3 F1M6Q3_RAT</u>	2.84E5	1	1	1	160757	Collagen type IV alpha 2 chain
2754	<u>sp Q63429 UBC_RAT</u>	1.11E6	1	1	1	91087	Polyubiquitin-C
2755	<u>F1LML2 F1LML2_RAT</u>	1.11E6	1	1	1	91073	Polyubiquitin-C
2756	<u>F1LNW3 F1LNW3_RAT</u>	3.11E5	1	1	1	76747	Acyl-coenzyme A oxidase
2757	<u>sp P97562 ACOX2_RAT</u>	3.11E5	1	1	1	76799	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2
2464	<u>sp P09650 MCPT1_RAT</u>	4.06E4	1	1	1	28617	Mast cell protease 1

3.10. Биодegradация децеллюляризованной ткани печени

Дегradация межклеточного матрикса печени крысы была изучена в условиях ферментативной (раствор коллагеназы 2 типа) и нейтральной сред в течение 48 часов. В нейтральной среде уменьшение массы образцов составляет не более 7%, фрагментации образцов не наблюдалось, как и морфологических изменений. В ферментативной среде уже через 3 часа образцы теряли по массе более 60%, через 6 часов происходит фрагментация образцов, а через 24 часа образцы полностью деградировали (Рисунок 9).

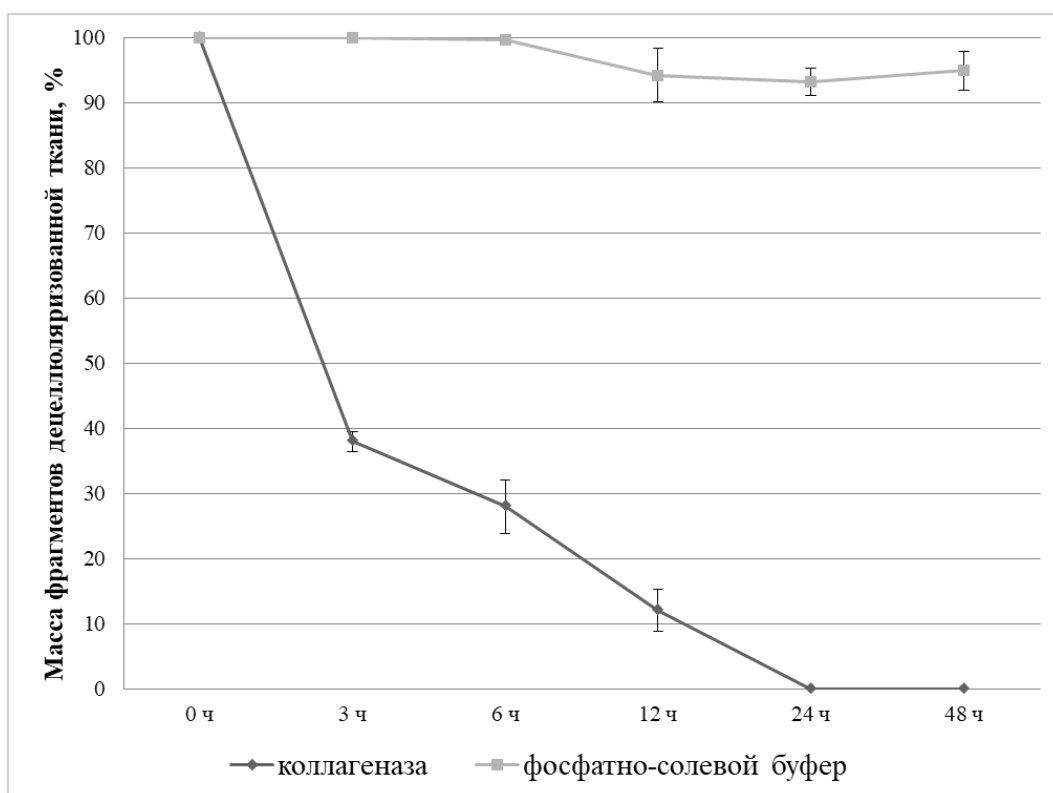


Рисунок 9. Кривые деградации печени крысы, последовательно децеллюляризованной 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых экспериментов.

3.11. Структура конструкций на основе децеллюляризованной ткани печени крысы

Структура полученных макрочастиц и лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы была изучена методом сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 10). По данным СЭМ структура макрочастиц межклеточного матрикса печени крысы характеризуется разветвленной системой пор, размером в среднем 20мкм (Рисунок 10А).

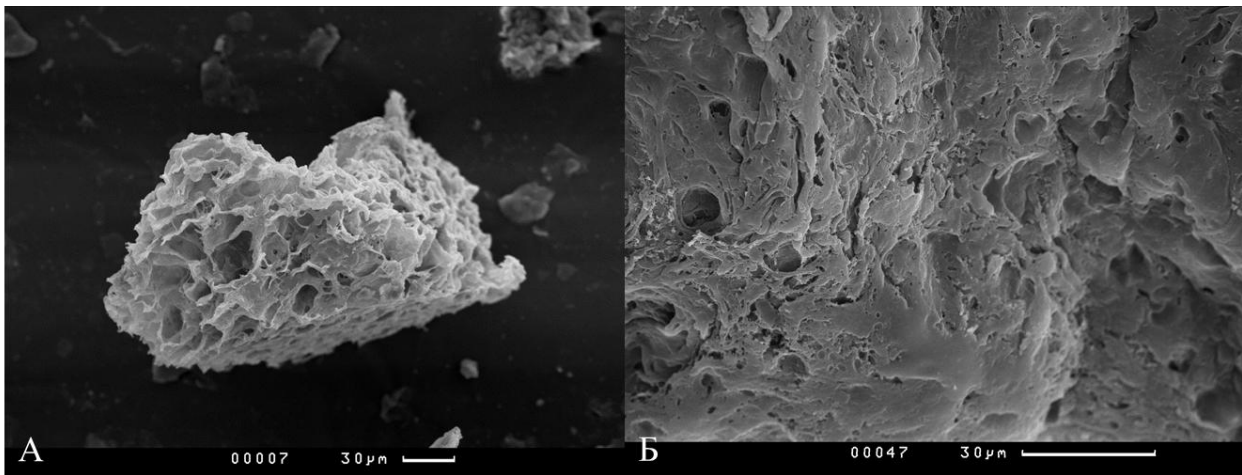


Рисунок 10. Изображение поверхности образцов, полученных методом сканирующей электронной микроскопии. А - Изображение макрочастицы межклеточного матрикса ткани печени крысы последовательно децеллюляризованной 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100. Б - изображение поверхности лиофилизированного фрагмента децеллюляризованной ткани печени крысы.

Была выявлена шероховатая поверхность лиофилизированного фрагмента децеллюляризованной ткани печени крысы, трехмерная структура которого является менее пористой при меньшем размере пор по сравнению с макрочастицей децеллюляризованной ткани печени крысы, что обуславливается обезвоживанием матрикса в процессе его лиофилизации (Рисунок 10Б).

Наноструктуру межклеточного матрикса исследовали методами сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) и сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ). СЗМ анализ межклеточного матрикса макрочастицы децеллюляризованной ткани печени подтвердил данные СЭМ и гистологического исследования об отсутствии клеток в матриксе после децеллюляризации ткани печени (рисунок 11). Была показана шероховатая и извилистая топография полученного матрикса (рисунок 11Б).

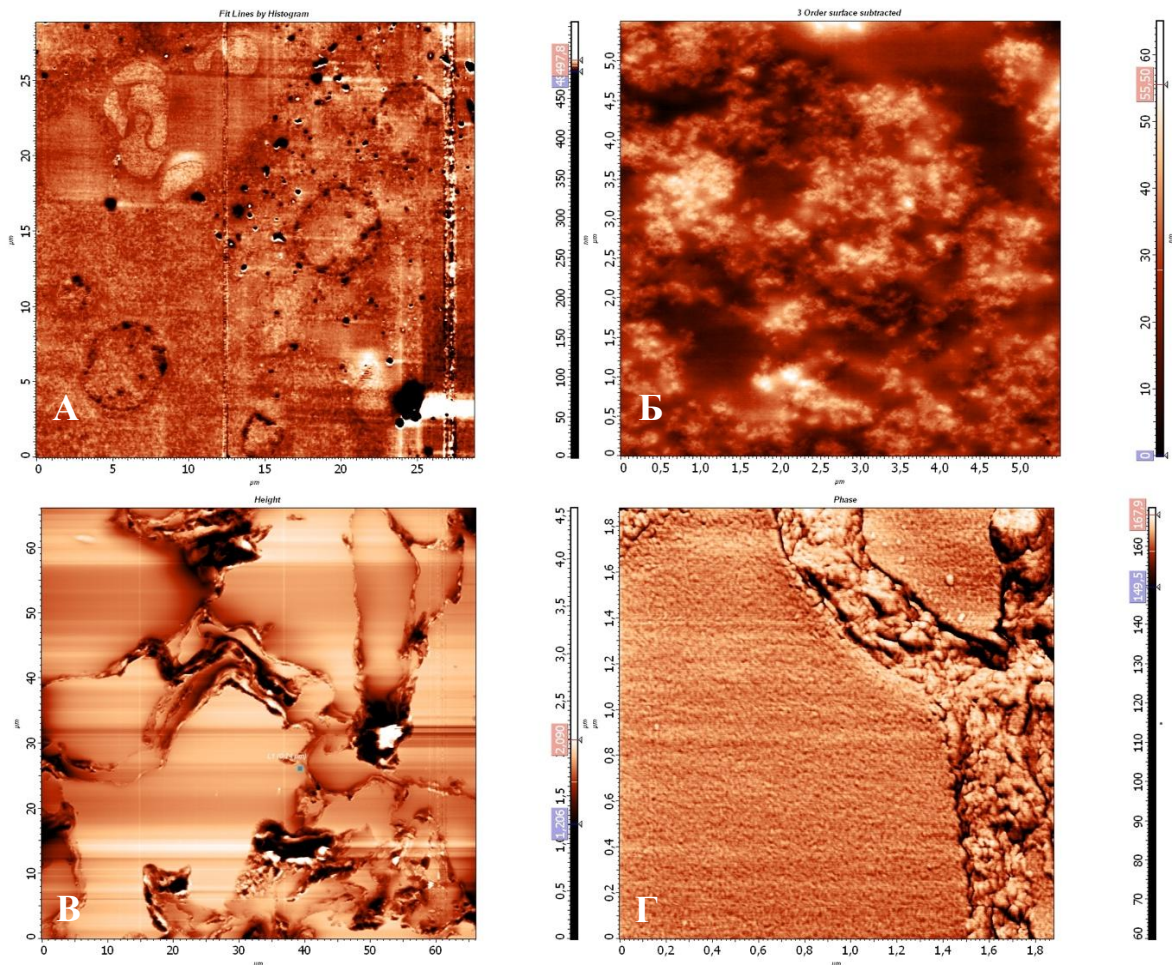


Рисунок 11. СЗМ изображения поверхности ультратонкого среза: А- участок поверхности нативной ткани печени крысы (28x28 мкм, диапазон вариации высоты 15 нм), Б- участок поверхности макрочастицы децеллюляризованной ткани печени крысы (5.0x5.0 мкм, диапазон вариации высоты 50 нм), В- участок поверхности лиофилизированного фрагмента децеллюляризованной ткани печени крысы (режим топографии, 65.0×65.0 мкм), Г- участок поверхности лиофилизированного фрагмента децеллюляризованной ткани печени крысы (режим отображения фазы, 1.8×1.8 мкм).

На рисунке 11 В, Г приведены СЗМ-изображения (области сканирования 65.0×65.0 и 1.8×1.8 мкм соответственно) поверхности исследуемого образца лиофилизированного фрагмента децеллюляризованного межклеточного матрикса после среза. На обзорном СЗМ-изображении (рисунок 11В) видна пористая структура матрикса, микропоры с характерным размером от 5 до 30 мкм разделены между собой стенками межклеточного матрикса толщиной от 150 нм до нескольких микрон. СЗМ-изображение высокого разрешения позволяет выделить глобулярные структуры размерами от 20 до 50 нм в стенках межклеточного матрикса.

На рисунке 12 показана трехмерная реконструкция межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани печени крысы в объеме $40 \times 30 \times 6.4$ мкм. В ходе анализа полученной трехмерной реконструкции была выявлена высокопористая структура матрикса с большим количеством нанопор, степень объемной пористости составила $78.4 \pm 4.7\%$, отношение площади поверхности к объему составило $5.81 \pm 0.10 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$. Также были обнаружены микропоры со средним размером от 2,5 до 20 мкм, образованных после вымывания клеток, и систему связанных нанопор в децеллюляризованной ткани со средним размером от 50 до 400 нм.

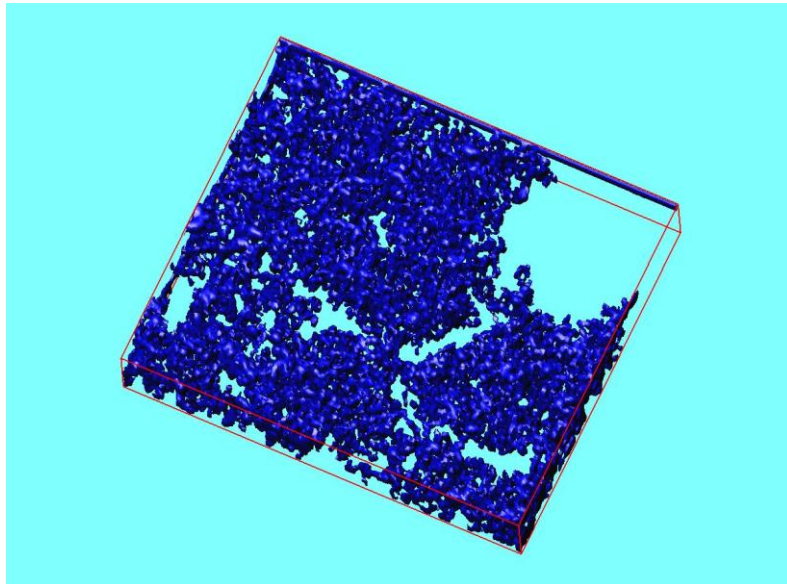


Рисунок 12. Трехмерная реконструкция структуры децеллюляризованной ткани печени, область сканирования - 40x30x6.4 мкм, количество срезов-16, толщина срезов – 400 нм.

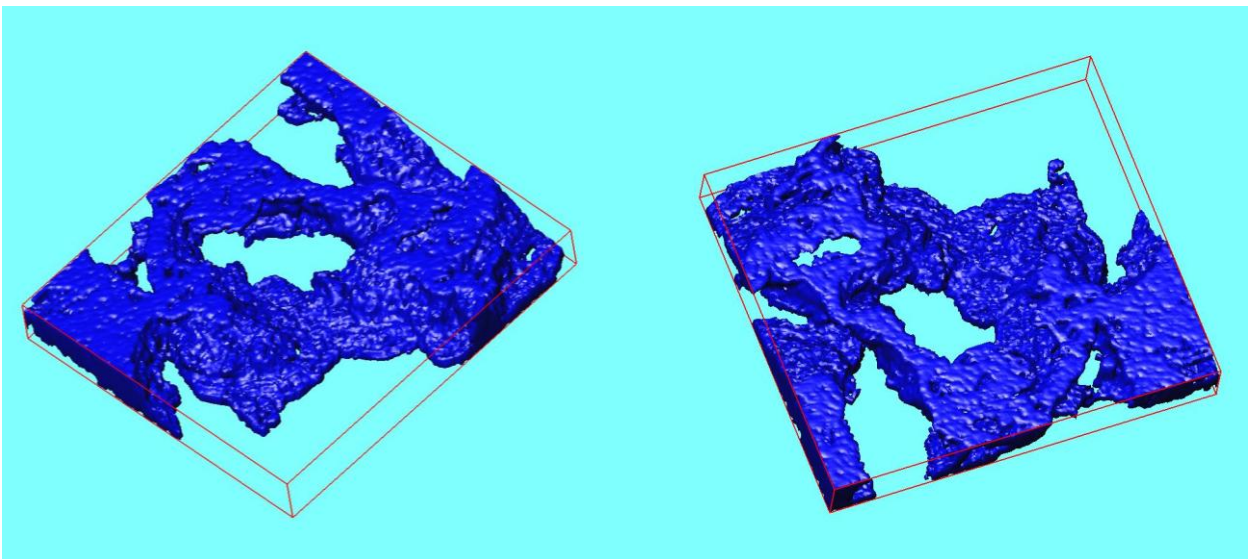


Рисунок 13. Виды трехмерной реконструкции структуры лиофилизованного фрагмента межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани печени крысы, полученные с помощью сканирующей зондовой нанотомографии, область сканирования- 60.0×50.0×6.0 мкм, количество срезов- 24, толщина срезов- 250 нм.

На рисунке 13 показаны две трехмерные реконструкции лиофилизированного фрагмента межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани печени крысы в объеме $60.0 \times 50.0 \times 6.0$ мкм. Анализ полученной трехмерной реконструкции показал, что участки межклеточного матрикса занимают 38.2% общего реконструированного объема. Таким образом, степень объемной пористости матрикса составляет $61.8 \pm 5.4\%$. Также, полученные трехмерные данные позволяют определить отношение площади поверхности к объему в образце межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы. В данном случае величина этого параметра составляет $0.83 \pm 0.04 \text{ м}^{-1}$. Наношероховатость поверхности стенок лиофилизированного фрагмента межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани составляет 49.2 ± 3.8 нм.

3.12. Анализ цитотоксичности, адгезии и пролиферации клеток на лиофилизированных фрагментах децеллюляризованной ткани печени крысы

Анализ цитотоксичности полученных образцов проводили на примере линии клеток мышинных фибробластов 3Т3. В ходе эксперимента лиофилизированные фрагменты децеллюляризованной ткани перемещали к монослою мышинных фибробластов и инкубировали в культуральной среде в течение 7 суток. Было показано, что полученные фрагменты межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar не токсичны для мышинных фибробластов линии 3Т3 (Рисунок 14).

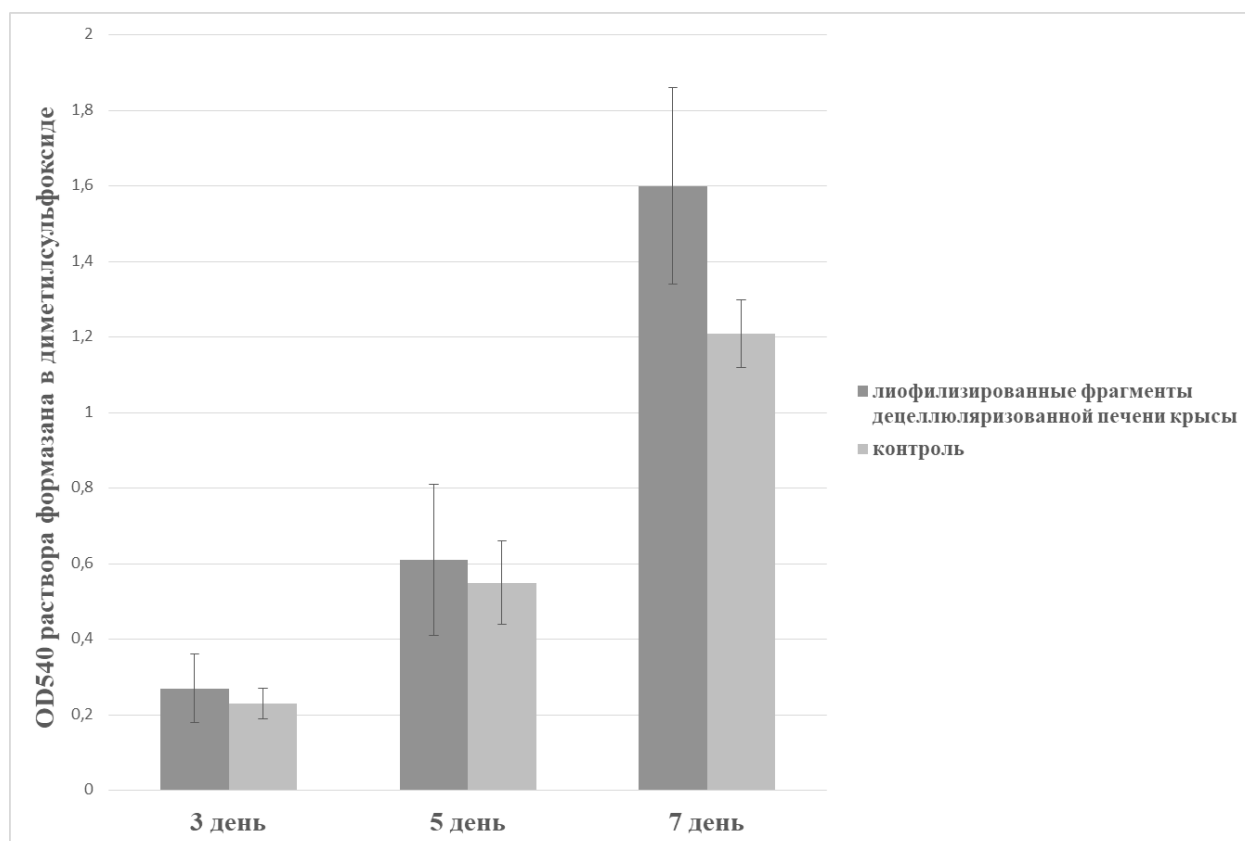


Рисунок 14. Данные о цитотоксичности фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых экспериментов.

Адгезия и пролиферация мышинных фибробластов 3Т3 и клеток культуры гепатокарциномы человека Hep-G₂ были изучены на образцах лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы. В качестве контроля был использован культуральный пластик (рисунки 15, 16).

На лиофилизированных фрагментах децеллюляризованной ткани печени крысы был зарегистрирован более высокий уровень адгезии обеих клеточных культур по сравнению с контролем. В эксперименте с клетками мышинных фибробластов было выявлено равномерное увеличение количества клеток с течением времени, тогда как в эксперименте с клетками гепатокарциномы количество клеток на 3 и 7 день существенно не отличались.

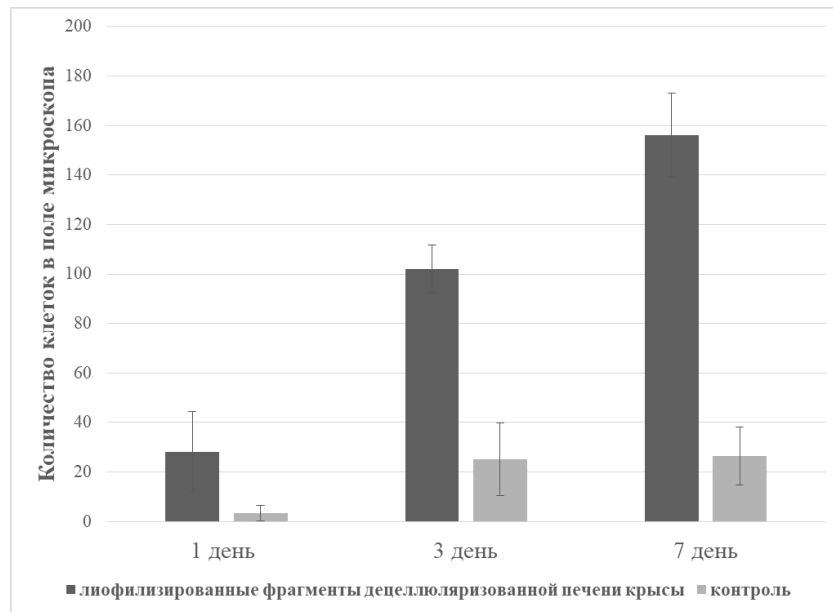


Рисунок 15. Данные о пролиферативной активности клеток культуры ЗТЗ на 1, 3 и 7 дни эксперимента на лиофилизированных фрагментах децеллюляризованной ткани печени крысы. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых экспериментов.

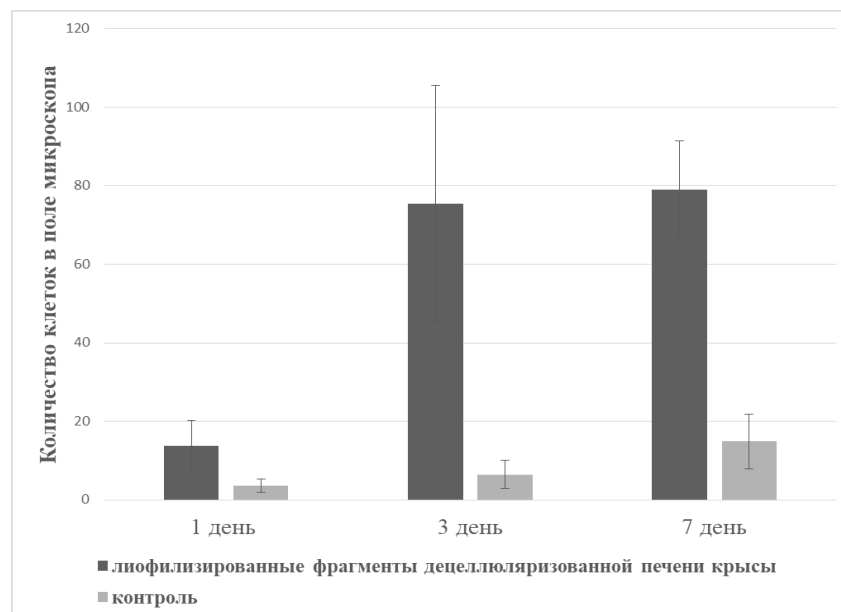


Рисунок 16. Данные о пролиферативной активности клеток культуры Her-G₂ на 1, 3 и 7 дни эксперимента на лиофилизированных фрагментах децеллюляризованной ткани печени крысы. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых экспериментов.

3.13. Проведение эксперимента по заживлению кожного покрова крысы *in vivo*

В рамках данной работы был проведен эксперимент по заживлению кожного покрова крысы *in vivo*, используя в качестве раневого покрытия лиофильно высушенные фрагменты децеллюляризованной ткани печени крысы.

В эксперименте крысам на спине наносили рану средним диаметром 14 мм. Животным в контрольной группе рану закрывали стерильной марлевой повязкой. Экспериментальным животным на ране распределяли фрагменты лиофильно высушенного матрикса печени размером 2-3 мм так, чтобы рана была закрыта на 70%, а затем рану закрывали стерильной марлевой повязкой. Оценку заживления кожных покровов для экспериментальной группы проводили на 3-ий, 9-ый, 14-ый, 18-ый и 23-ий день эксперимента, для контрольной- на 3-ий, 9-ый, 14-ый, 18-ый, 23-ий, 28-ой, 35-ый, 40-ой день. Изображения ран в ходе эксперимента представлены на рисунке 17.



Рисунок 17. Проведение эксперимента по заживлению кожи крысы. Приведены фото оценки заживления кожных покровов на 3-ий, 9-ый, 14-ый, 18-ый и 23-ий день эксперимента. Группа 1- нанесенную рану покрывали стерильной повязкой, Группа 2- в качестве раневого покрытия использовали фрагменты лиофильно высушенной децеллюляризованной ткани печени крысы. Рану покрывали стерильной повязкой.

Фрагменты лиофильно высушенной децеллюляризованной ткани печени при наложении на рану набухают и легко фиксируются на ней, что облегчает хирургические манипуляции с конструкцией.

В качестве количественной характеристики успешной терапии раны измеряли диаметры ран в контрольные дни, представленные в таблице 3. Полученные данные обрабатывали и рассчитывали коэффициент уменьшения раны по формуле 1.

Таблица 3. Количественный анализ динамики заживления полнослойной кожной раны крысы. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

Образец	Коэффициент уменьшения раны, %								
	0 день	3 день	9 день	14 день	18 день	23 день	28 день	35 день	40 день
Группа 1	0	0	12,5±4,0	50,0±5,1	68,8±4,0	75,0±2,7	87,5±3,1	92,9±3,5	100
Группа 2	0	7,1±2,3	50,0±5,1	72,9±1,0	100	100	100	100	100

По полученным значениям коэффициентов уменьшения ран строили кривые заживления кожного покрова (рисунок 18). На рисунке 17 на 3 день эксперимента видно, что на ране экспериментальной группы образовались сгустки крови и по краям рана начала затягиваться.

Резкий скачок в ускорении уменьшения раны в экспериментальной группе крыс после 3 дня эксперимента совпадает с началом пролиферативной фазы заживления раны.

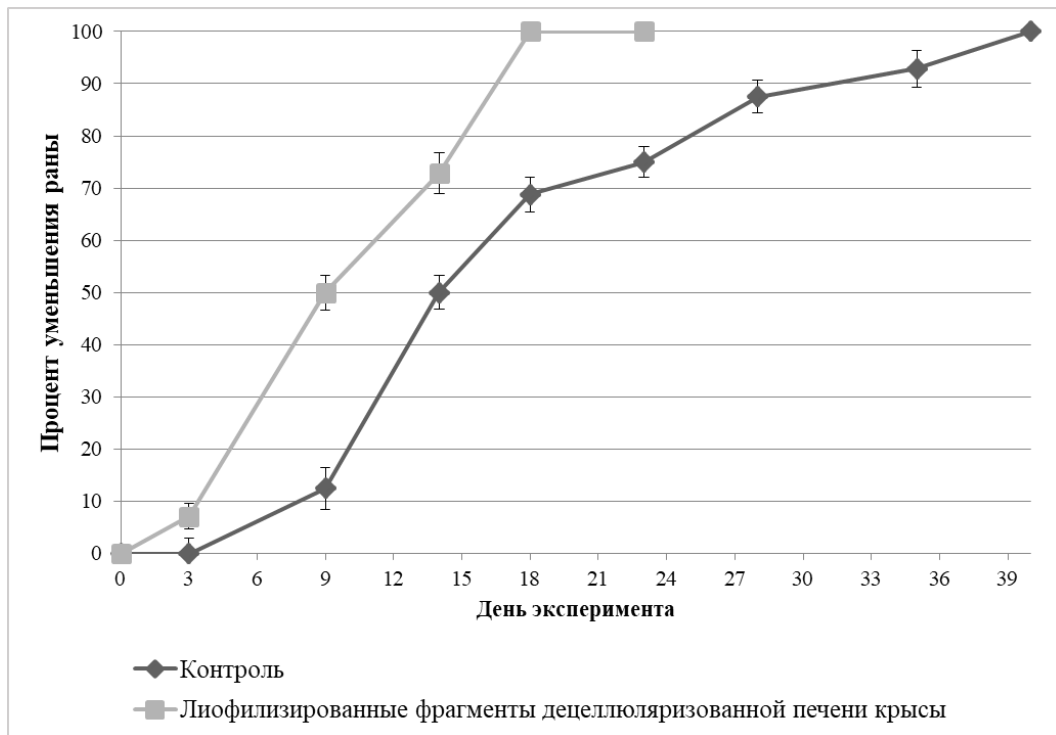


Рисунок 18. Динамика заживления полнослойной кожной раны крысы породы Wistar. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых экспериментов.

В экспериментальной группе на 18 день уже наблюдалось полное заживление раны, но при этом характеризовалась покраснением размером порядка 5 мм. На 23 день покраснение заметно уменьшилось, на месте раны образовался волосяной покров, что является показателем восстановления функции кожного покрова. В контрольной группе полное заживление раны было достигнуто на 40-ой день.

Качественный анализ регенерации полнослойной раны кожи проводили при помощи гистологической оценки. Забор образца кожи производили в день полного застания раны: в контрольной группе забор производили на 40 день, в группе с покрытием в виде фрагментов лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы-на 18 день. Окрашенные гематоксилин-эозином срезы анализировали с помощью светового микроскопа.

При анализе образцов было выявлено, что в обеих группах присутствуют три слоя кожного покрова (эпидермис, дерма, гиподерма), что свидетельствует о восстановлении и полном заживлении кожной раны (рисунок 19).

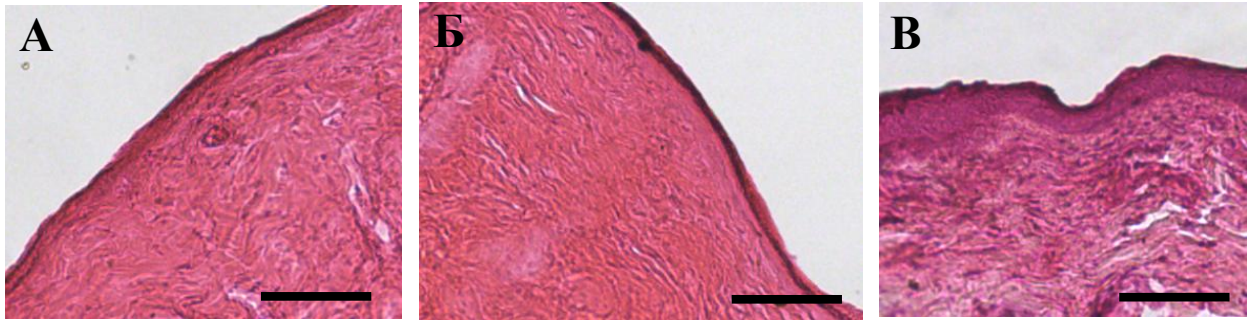


Рисунок 19. Изображение гистологических срезов кожи после заживления полнослойной раны, окрашенные гематоксилин-эозином. Масштабный отрезок- 100 мкм. А-нанесенную рану покрывали стерильной повязкой (40 день), Б- рану покрывали фрагментами лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы (18 день), В-нативная кожа крысы (норма).

3.14. Получение микрочастиц межклеточного матрикса печени крысы.

Микрочастицы ткани печени были получены путем измельчения полученного матрикса в жидком азоте. Фракция микрочастиц межклеточного матрикса печени крысы со средним размером 1-5 мкм составила 20% по массе от общего количества ткани (Рисунок 20).

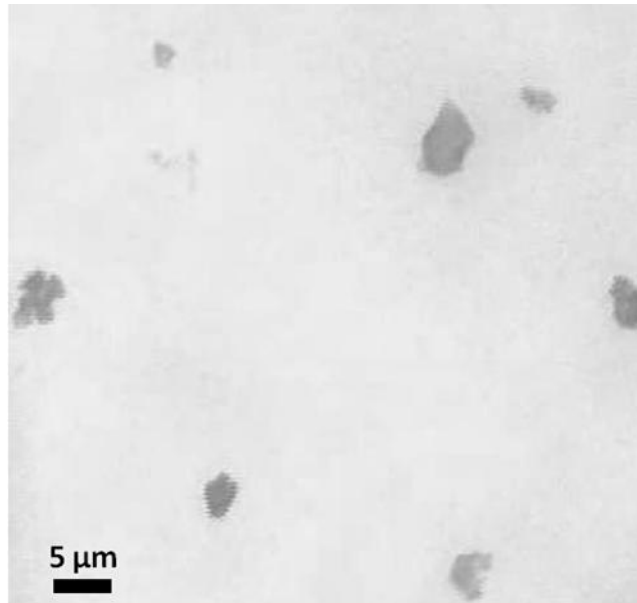


Рисунок 20. Изображение микрочастиц межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы ($\times 100$, фазовый контраст).

3.15. Изготовление скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени.

Методом полива были изготовлены скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы (Рисунок 21). Все полученные скаффолды являются бесцветными, включение в состав микрочастиц не повлияло на внешний вид конструкций. Композитные скаффолды были получены путем смешивания раствора фиброина шелка с суспензией микрочастиц до конечной концентрации частиц 8 мг/мл, полученную смесь наносили на поверхность полированного тефлона и высушивали при комнатной температуре.

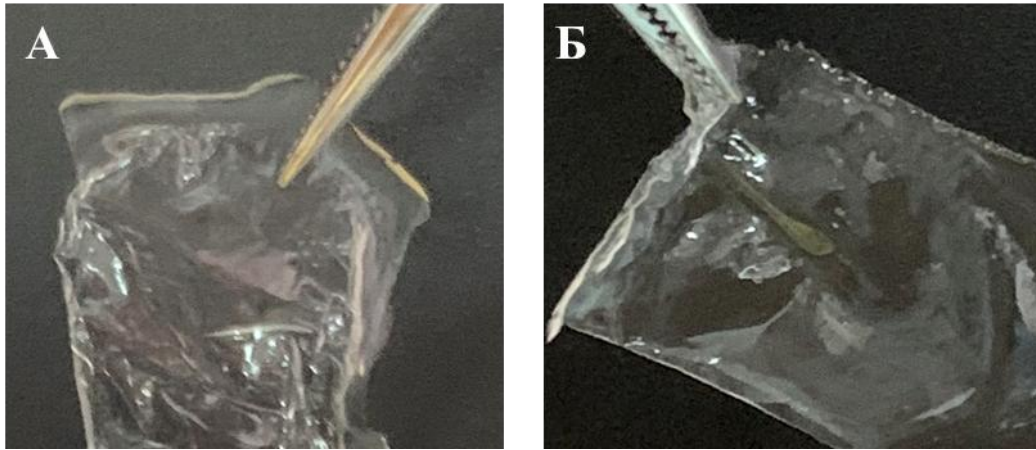


Рисунок 21. Внешний вид скаффолдов. А- скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, Б- скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы.

3.16. Структура скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени.

Структуру поверхности полученных композитных скаффолдов анализировали методом сканирующей электронной микроскопии. Рельеф поверхности скаффолда, с включенными в состав микрочастицами, является шероховатым и неоднородным, по сравнению с рельефом поверхности некомпозитного скаффолда (Рисунок 22).

Микро- и наноструктуру поверхности полученных скаффолдов, а также структуру микрочастиц в составе скаффолдов исследовали методом сканирующей зондовой микроскопии. На рисунке 23 представлены СЗМ-изображения поверхности среза скаффолдов.

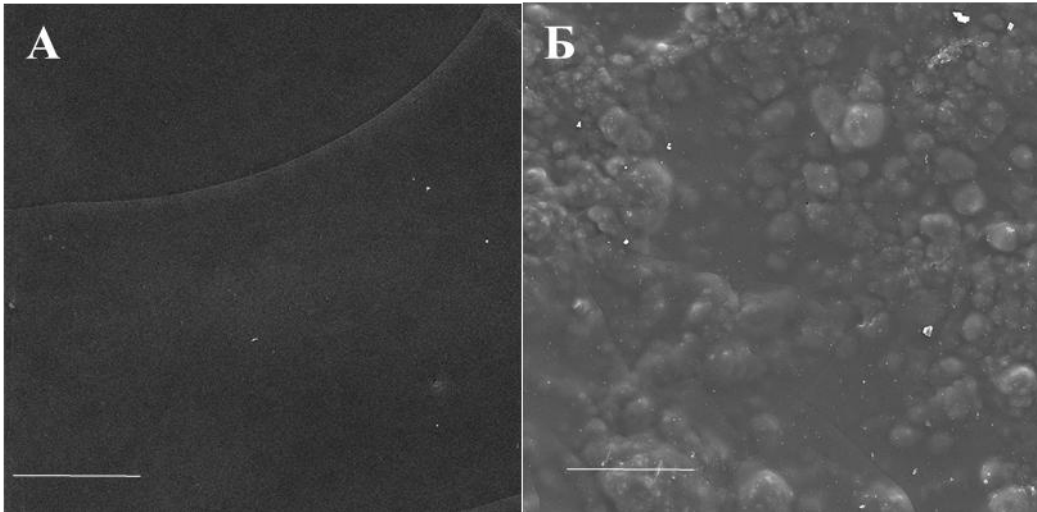


Рисунок 22. Изображение поверхности образцов скаффолдов, полученных методом сканирующей электронной микроскопией. А- скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, Б- скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. Масштабный отрезок 10 мкм.

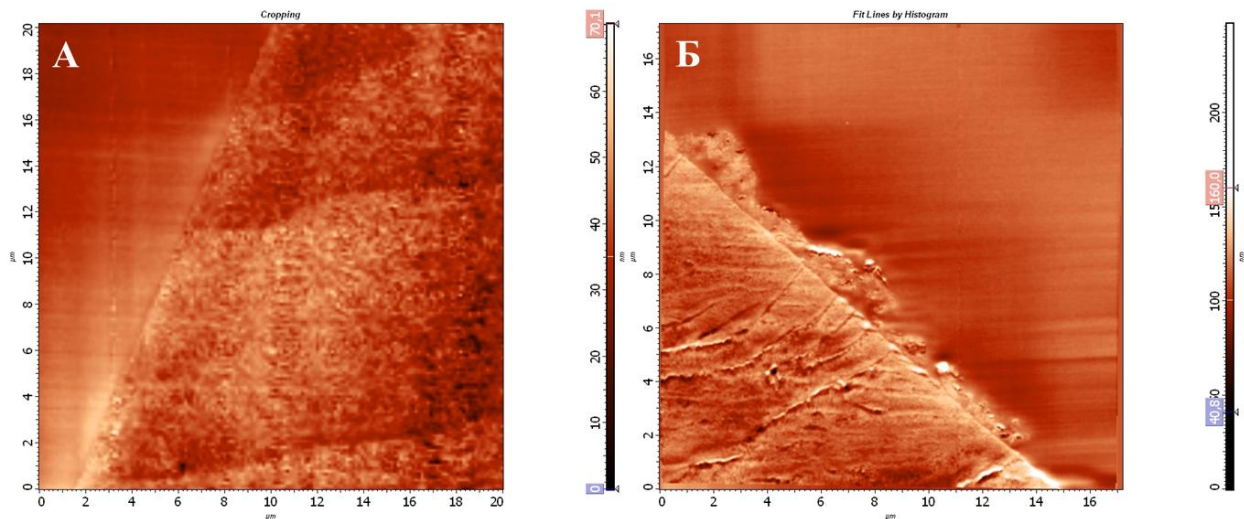


Рисунок 23. СЗМ изображения поверхности поперечного среза скаффолда в виде пленки. А- скаффолд на основе фиброина шелка (область сканирования 20x20 мкм), Б- скаффолд на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы (область сканирования 17x17 мкм).

На поверхности композитных скаффолдов были обнаружены микрочастицы децеллюляризованной ткани, помимо микрочастиц, располагающихся в толще пленки. При этом микрочастицы децеллюляризованной ткани печени крысы распластаны по поверхности скаффолда и создают шероховатый рельеф поверхности пленки.

По полученным СЗМ-изображениям был произведен количественный анализ шероховатости исследуемых скаффолдов. Данные о шероховатости поверхностей скаффолдов представлены в таблице 4.

Таблица 4. Данные о средней шероховатости поверхности полученных скаффолдов. Указаны значения стандартного отклонения для 6 независимых измерений.

Состав скаффолда	Средняя шероховатость скаффолда, нм
Скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка	36,5±10,6
Скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы	195,0±40,0

Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что включение в состав микрочастиц межклеточного матрикса ткани печени увеличило шероховатость поверхности конструкций в 5 раз.

Исследование микро- и наноструктуры полученных композитных скаффолдов проводили методом СЗНТ. Для количественного анализа конструкций были построены трехмерные реконструкции, посредством совмещения серии СЗМ-срезов скаффолдов (рисунок 24).

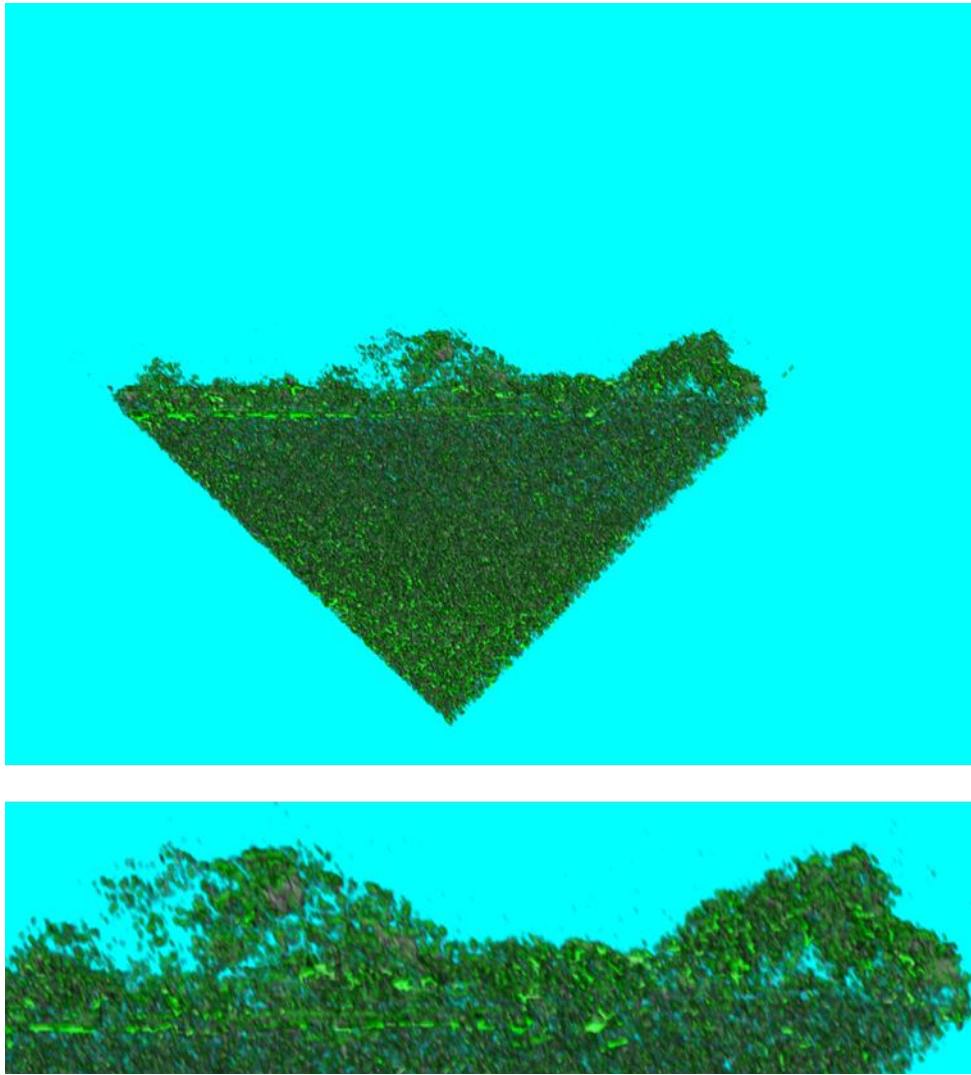


Рисунок 24. Трехмерная реконструкция структуры композитного скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы (область сканирования 15,20x13,70x2,25 мкм, количество срезов 15, толщина срезов-150 нм).

Полученные трехмерные реконструкции были получены для расчета отношения объема микрочастиц к объему скаффолда. Для скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы это отношение составило $1,4\% \pm 0,4$.

3.17. Исследование механических свойств скаффолдов.

Было проведено исследование влияния включения в состав скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка микрочастиц децеллюляризованной ткани на механические свойства конструкции. Для регистрации значений прочности материала на разрыв (МПа) и эластичности (% удлинения), образцы подвергали деформации на разрывной машине Zwick/Roell BZ 2.5/TNIS. Значения показателей, измеренных в ходе эксперимента, представлены в таблице 5. По полученным данным были построены диаграммы прочности на разрыв (рисунок 25) и эластичности (рисунок 26) для двух видов скаффолдов.

Таблица 5. Данные измерения прочности на разрыв и эластичности различных образцов скаффолдов на основе фиброина шелка. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений.

Образец	Прочность на разрыв, МПа	Эластичность, %
Скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка	2,96 ±0,53	48,00 ±5,66
Скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы	2,97 ±0,39	54,00 ±10,55

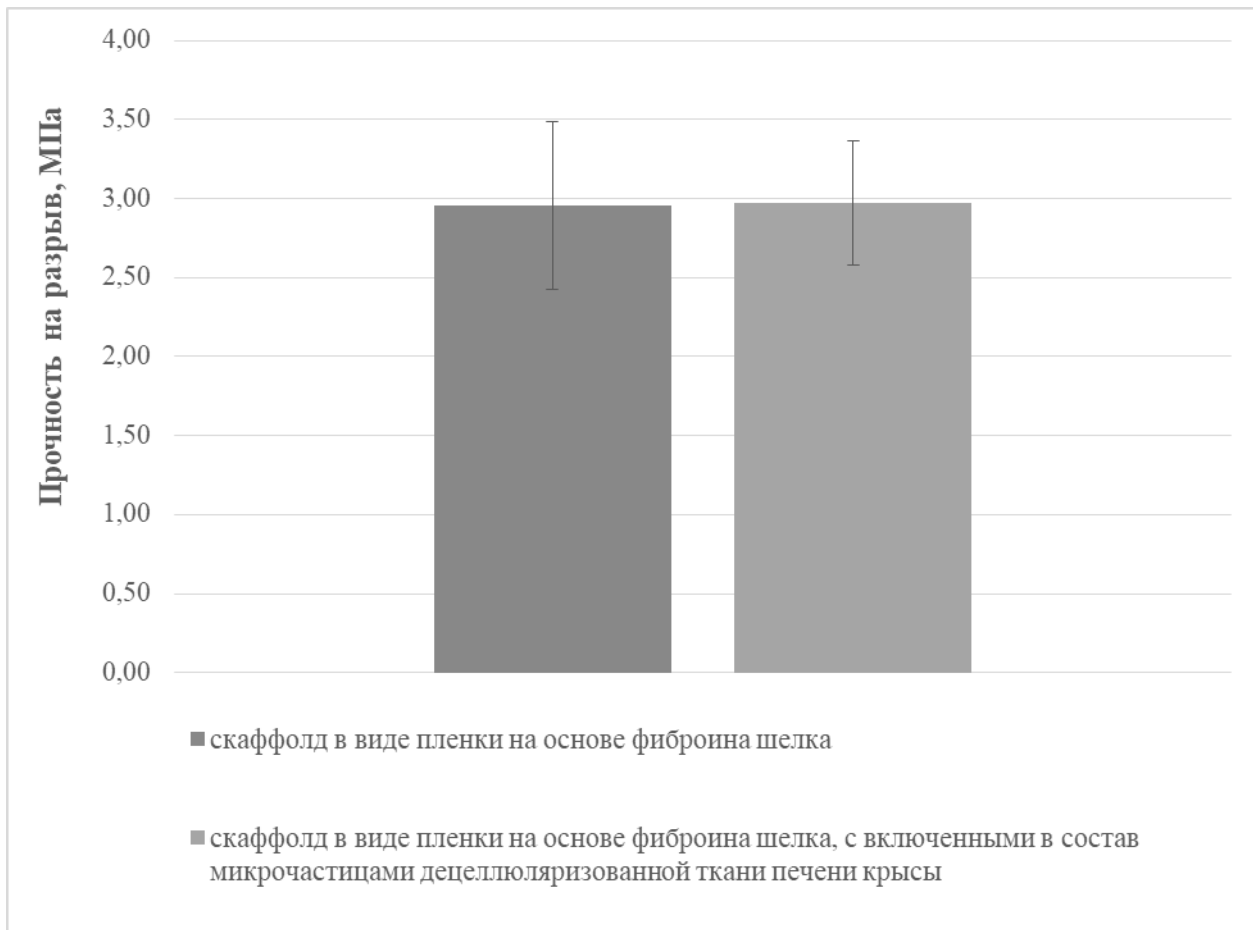


Рисунок 25. Данные прочности на разрыв при растяжении различных образцов скаффолдов на основе фиброина шелка. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

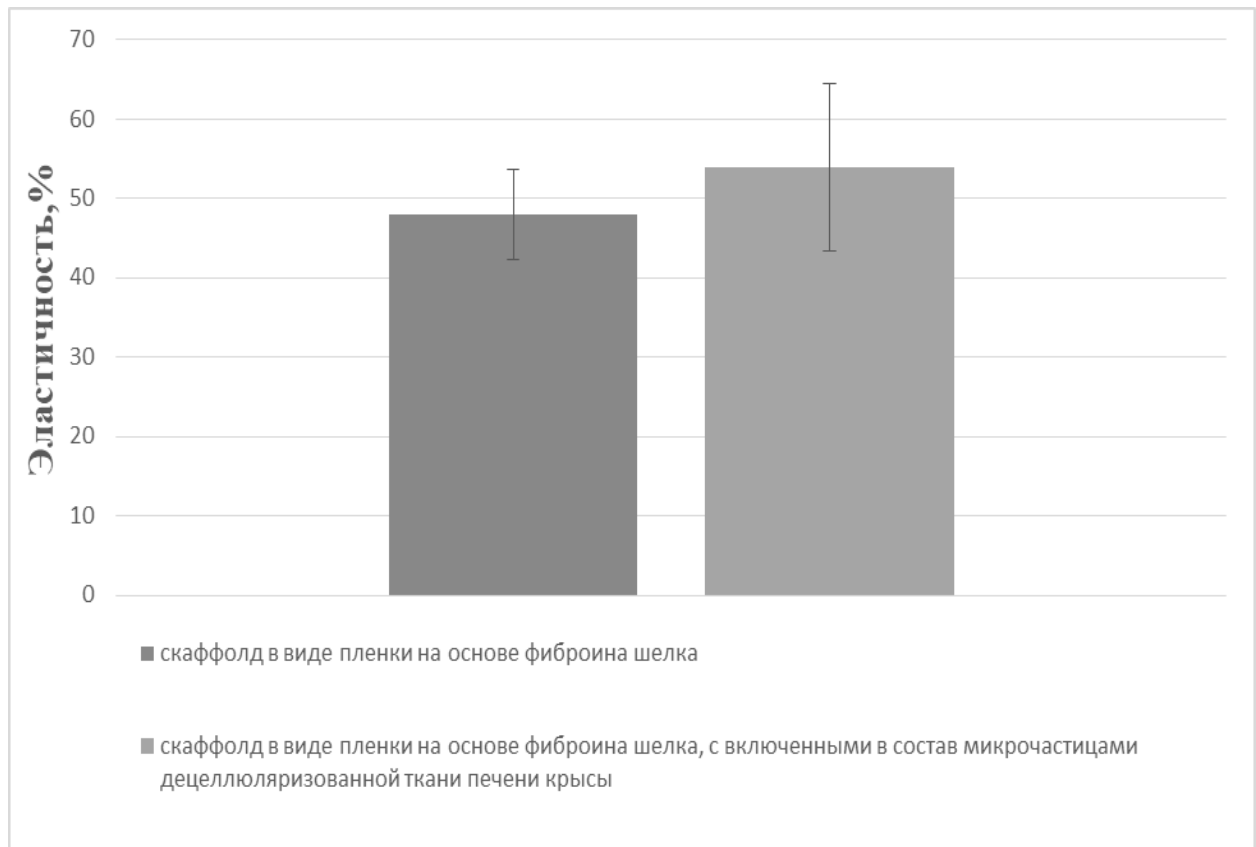


Рисунок 26. Данные эластичности при растяжении различных образцов скаффолдов на основе фиброина шелка. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

По данным эксперимента по анализу механических свойств, включение в состав микрочастиц децеллюляризованной ткани печени как крысы, не повлияло на показатель эластичности и прочности конструкций.

3.18. Анализ цитотоксичности, адгезии и пролиферации скаффолдов на основе фиброина шелка.

Анализ цитотоксичности полученных образцов проводили на примере линии клеток мышинных фибробластов 3Т3. В ходе эксперимента образцы двух видов скаффолдов помещали к монослою мышинных фибробластов и инкубировали в культуральной среде в течение 7 суток. Было показано, что полученные скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка не токсичны для клеток мышинных фибробластов 3Т3 (рисунок 27).

Адгезия и пролиферация мышинных фибробластов 3Т3 и клеток культуры гепатокарциномы человека Нер-G₂ были изучены на образцах полученных скаффолдов в виде пленок на основе фиброина шелка. В качестве контроля был использован культуральный пластик (рисунки 28, 29).

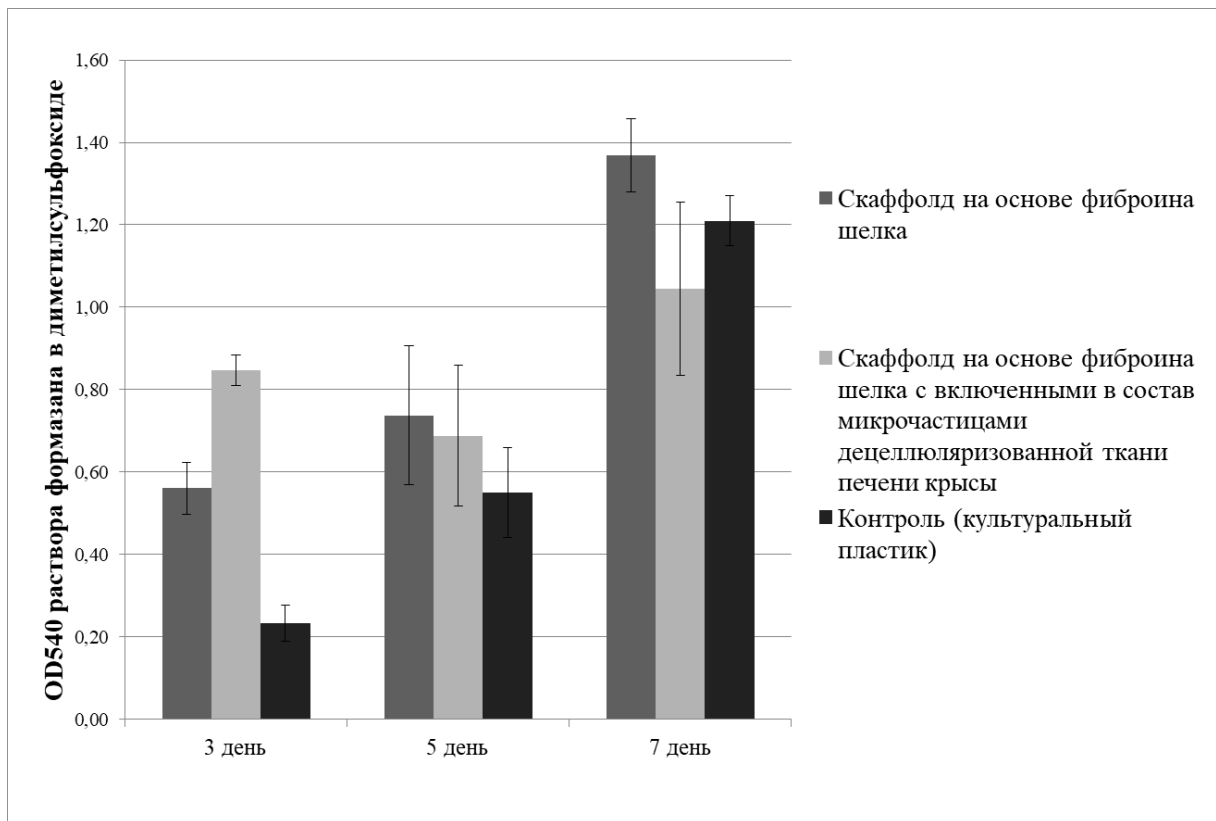


Рисунок 27. Данные о цитотоксичности скаффолдов на основе фиброина шелка. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

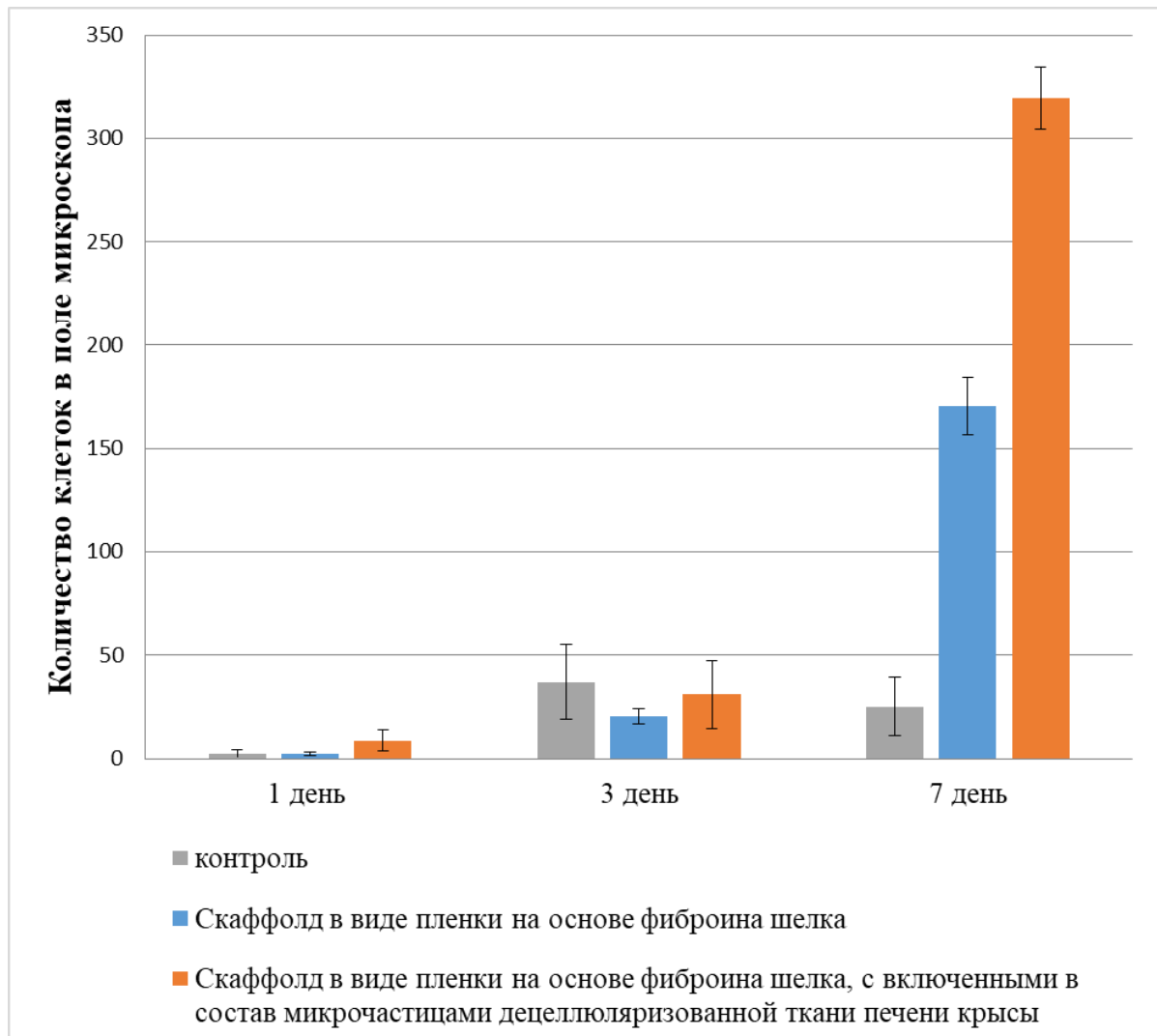


Рисунок 28. Данные о пролиферативной активности клеток культуры 3T3 на 1, 3 и 7 дни эксперимента на полученных скаффолдах на основе фиброина шелка. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

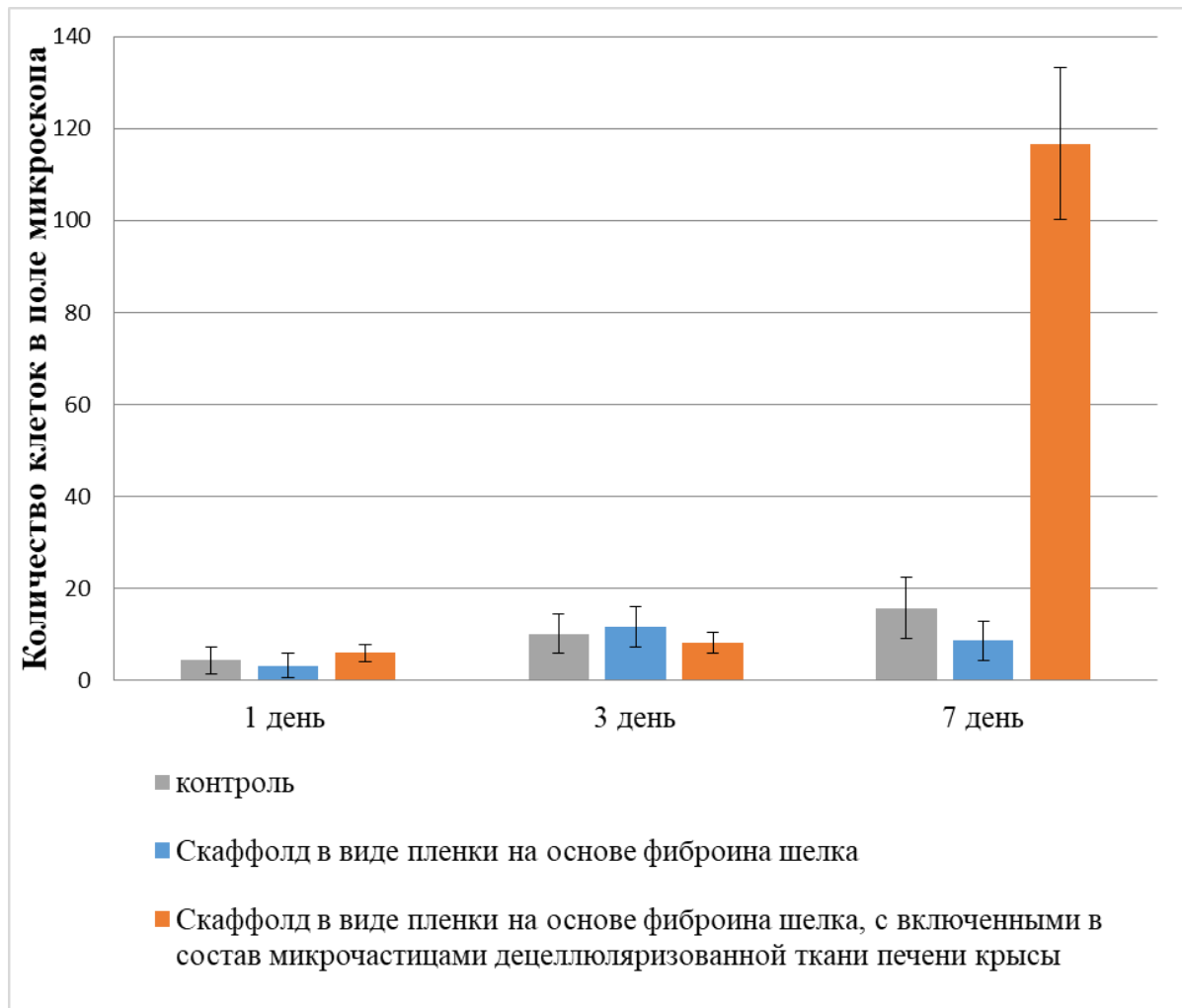


Рисунок 29. Данные о пролиферативной активности клеток культуры Нер-G₂ на 1, 3 и 7 дни эксперимента на полученных скаффолдах на основе фиброина шелка. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

В ходе эксперимента было показано, что все скаффолды на основе фиброина шелка поддерживают адгезию клеток, достоверных различий между различными группами образцов и контролем не было выявлено.

Далее в ходе эксперимента по оценки пролиферации наибольшее количество клеток на 7 день эксперимента обеих культур было зарегистрировано на скаффолдах в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. На композитных скаффолдах пролиферативная активность клеток на 7 день наблюдения была

выше, чем на немодифицированных скаффолдах. Изображения, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, демонстрирующие количество клеток и их распределение на скаффолдах в ходе эксперимента, представлены на рисунках 30 и 31.

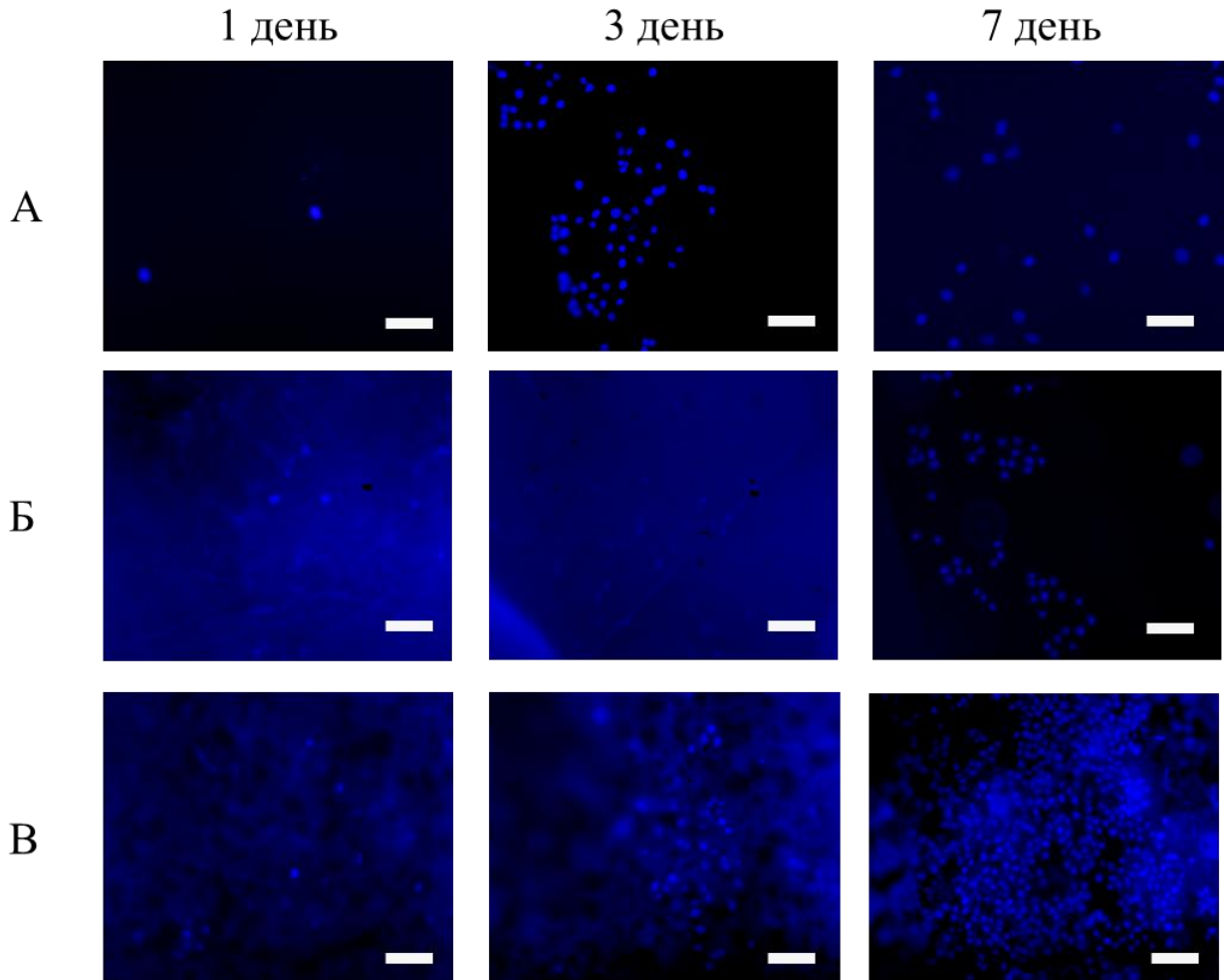


Рисунок 30. Изображения клеток мышинных фибробластов 3Т3 в ходе анализа их пролиферативной активности на исследуемых образцах. Масштабный отрезок- 100 мкм. Ядра клеток окрашены DAPI. А- контроль (культуральный пластик), Б- скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, В- скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы.

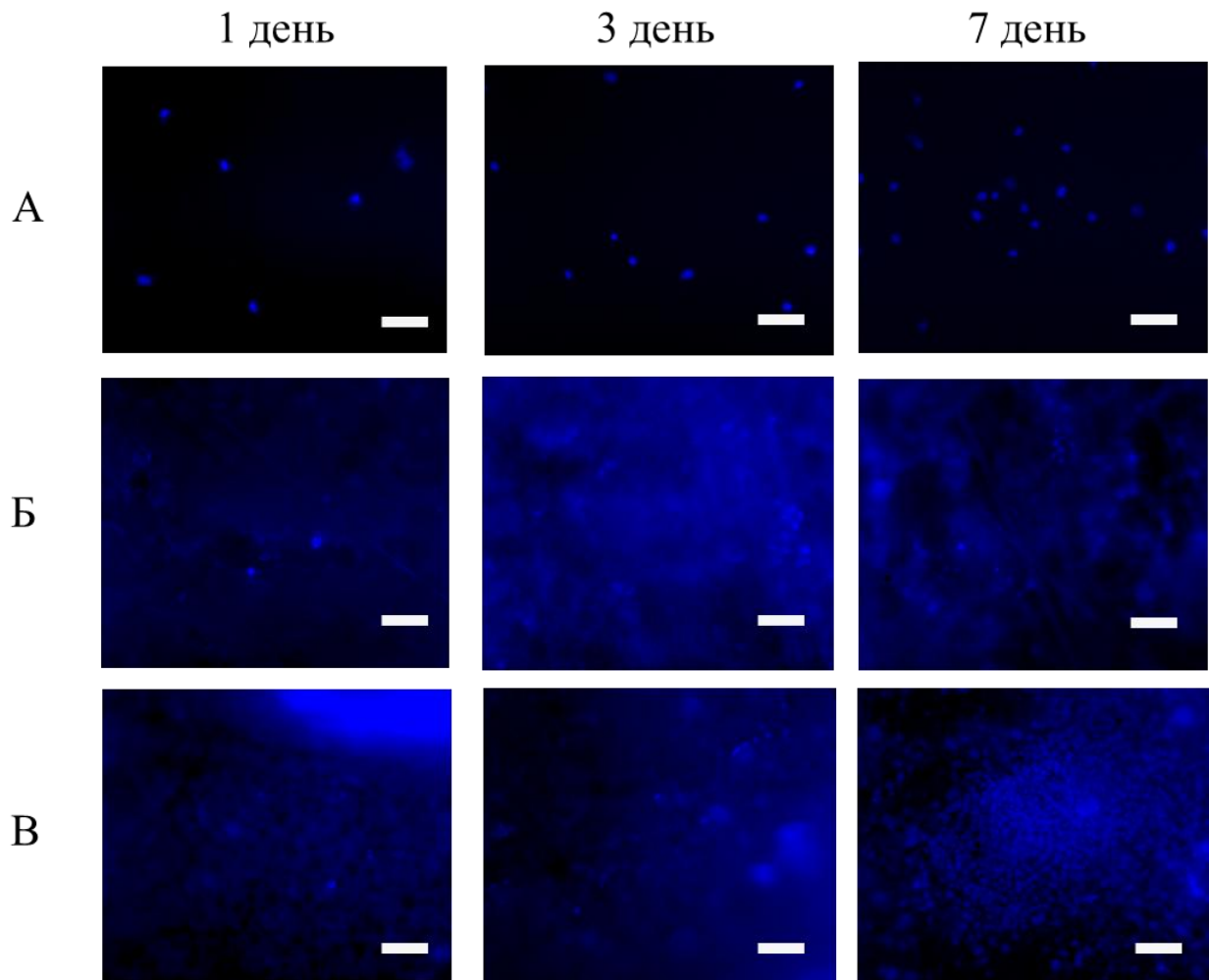


Рисунок 31. Изображения клеток гепатокарциномы человека *Hep-G₂* в ходе анализа их пролиферативной активности на исследуемых образцах. Масштабный отрезок-100 мкм. Ядра клеток окрашены DAPI. А- контроль (культуральный пластик), Б- скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, В- скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы.

3.19. Проведение эксперимента по заживлению кожного покрова крысы in vivo

Был проведен эксперимент по заживлению кожного покрова крысы *in vivo*, используя в качестве раневого покрытия скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка с внесенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы.

В эксперименте крысам на спине наносили полнослойную рану ножницами. Животным в контрольной группе рану закрывали стерильной марлевой повязкой. Экспериментальным животным на все раневое ложе помещали пленку, а затем рану закрывали стерильной марлевой повязкой. Оценку заживления кожных покровов для экспериментальной группы проводили на 3-ий, 9-ый, 14-ый, 18-ый и 23-ий день эксперимента, для контрольной- на 3-ий, 9-ый, 14-ый, 18-ый, 23-ий, 28-ой, 35-ый, 40-ой день. Изображения ран в ходе эксперимента представлены на рисунке 32.

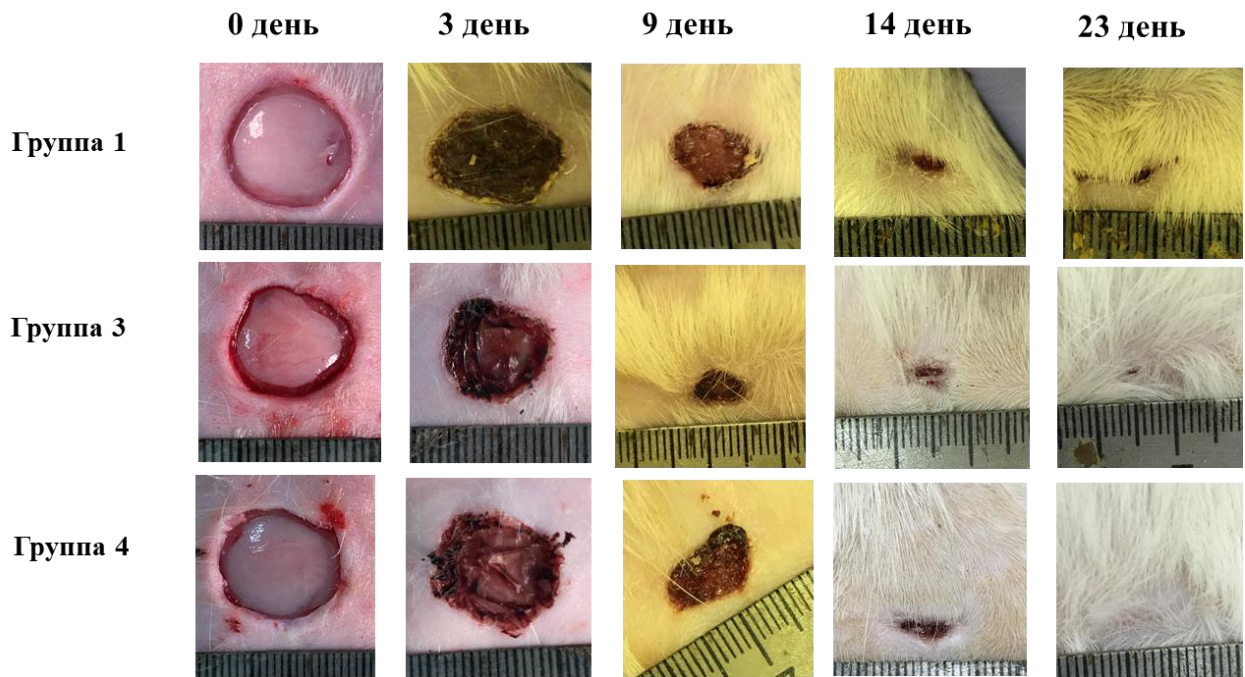


Рисунок 32. Проведение эксперимента по заживлению кожи крысы. Приведены фото оценки заживления кожных покровов на 3-ий, 9-ый, 14-ый, 18-ый и 23-ий день эксперимента. Группа 1: Контроль- нанесенную рану покрывали стерильной повязкой, группа 3: в качестве раневого покрытия использовали скаффолды на основе фиброина шелка, группа 4: в качестве раневого покрытия использовали скаффолды на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы.

Таблица 6. Количественный анализ динамики заживления полнослойной кожной раны крысы. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

Образец	Коэффициент уменьшения раны, %								
	0 день	3 день	9 день	14 день	18 день	23 день	28 день	35 день	40 день
Группа 1	0	0	12,5±4,0	50,0±5,1	68,8±4,0	75,0±2,7	87,5±3,1	92,9±3,5	100
Группа 3	0	6,9±0,5	50,6±0,3	69,0±1,0	71,7±0,1	80±0,1	100	100	100
Группа 4	0	4,5±1,2	22,0±1,8	55,4±0,1	86,9±0,2	100	100	100	100

Кривые заживления кожной раны, построенные на основе рассчитанных коэффициентов уменьшения раны (таблица 6) в каждый из контрольных дней, представлены на рисунке 33.

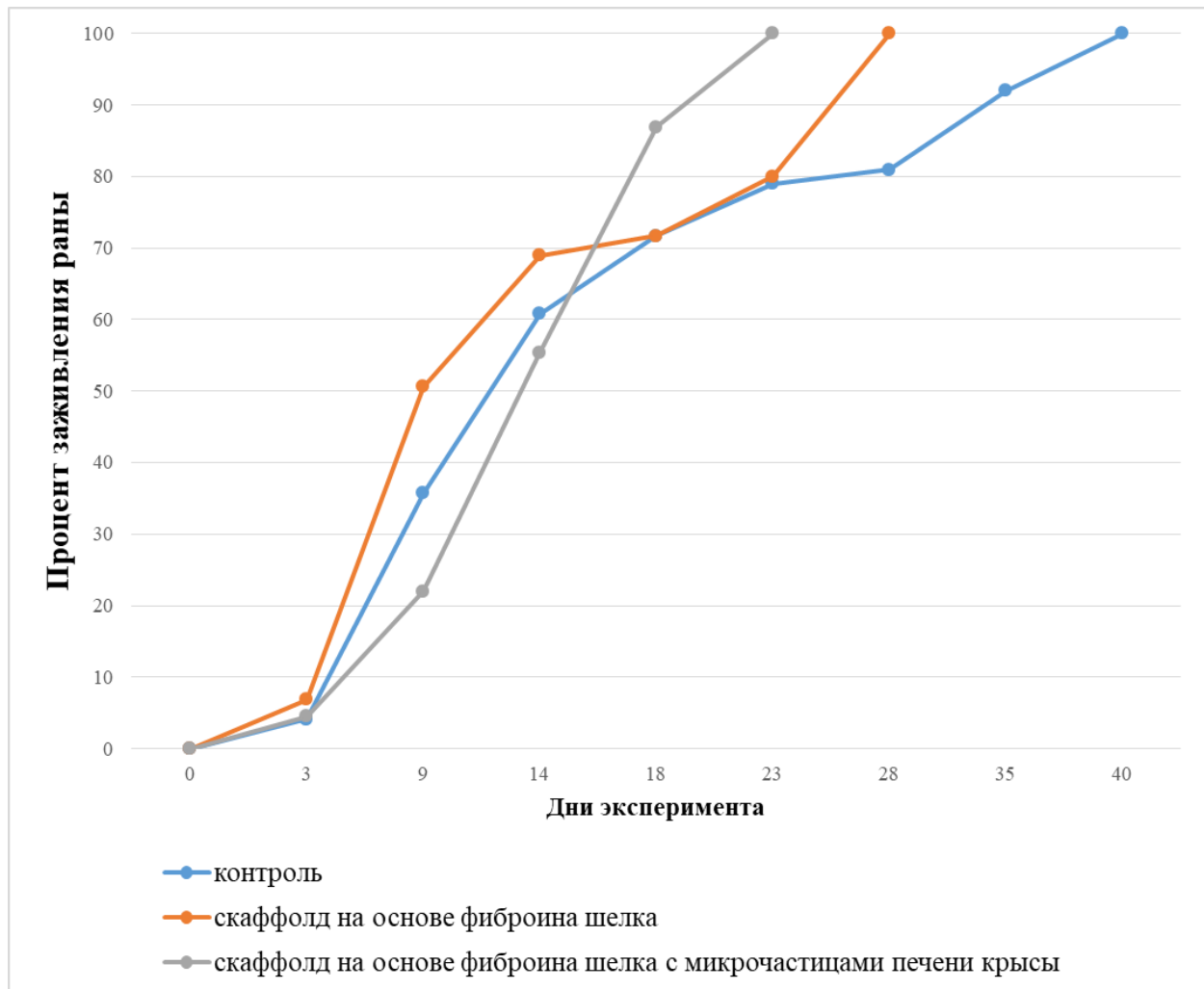


Рисунок 33. Динамика заживления полнослойной кожной раны крысы породы *Wistar*. Указаны значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

Все скаффолды гидрофильные, они легко позиционируются на рану и не требуют дополнительной фиксации шовным материалом. По данным кривых заживления динамика регенерации ран для всех групп с 0 по 9 день значительно не различаются, по сравнению с остальными участками графика. Резкий скачок в скорости заживления ран наблюдается после 9 суток эксперимента, при этом полное заживление раны при использовании скаффолдов с включенными состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени происходило на 23 сутки, на скаффолды из чистого фиброина

шелка на 28 сутки, тогда как в контроле заживление раны было зарегистрировано на 40 сутки.

Качественный анализ регенерации полнослойной раны кожи проводили при помощи гистологической оценки. Забор образца кожи производили в день полного застания раны: в контрольной группе забор производили на 40 день, в группе с покрытием в виде композитных скаффолдов на основе фиброина шелка - на 23 день, в группе с покрытием в виде скаффолда на основе фиброина шелка - на 28 день. Окрашенные гематоксилин-эозином срезы анализировали с помощью светового микроскопа. При анализе образцов было выявлено, что во всех группах присутствуют три слоя кожного покрова (эпидермис, дерма, гиподерма), что показывает о восстановлении и полном заживлении кожной раны (рисунок 34). Более того, на рисунке 34В виден волосяной фолликул, что свидетельствует и о полном функциональном восстановлении кожи. На рисунке 34Б выявлен более толстый роговой слой эпидермиса и рыхлую структуру дермы. Более рыхлая структура дермы относительно контроля наблюдалась и на гистологических срезах образцов группы 5.

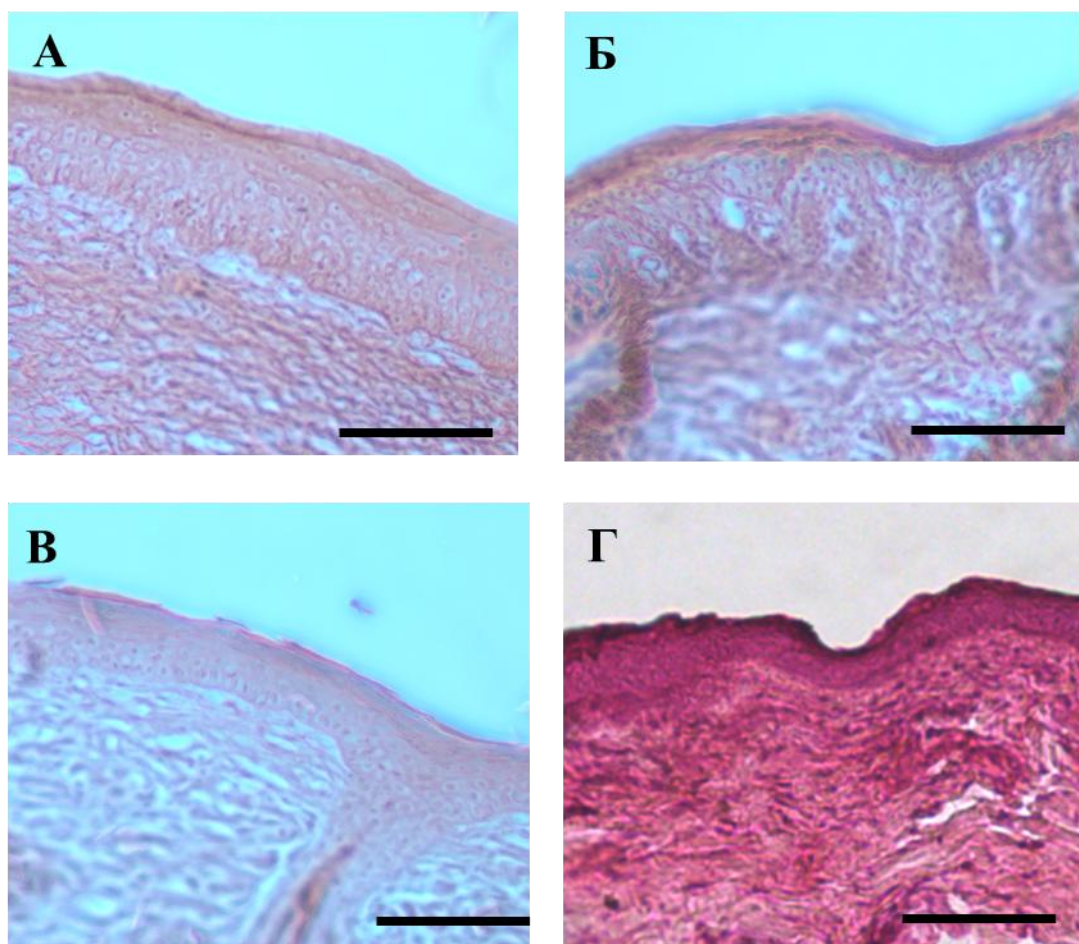


Рисунок 34. Изображение гистологических срезов кожи после заживления полнослойной раны, окрашенные гематоксилин-эозином. Масштабный отрезок- 100 мкм. А- нанесенную рану покрывали стерильной повязкой (40 день), Б- рану покрывали скаффолдами в виде пленок на основе фиброина шелка (28 день), В- рану покрывали скаффолдами в виде пленок на основе фиброина шелка с внесенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы (23 день), Г- нативная кожа крысы (норма).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Децеллюляризация печени крысы

Децеллюляризация - это метод, идеей которого является удаление из ткани или целого органа клеток и большей части компонентов главного комплекса гистосовместимости за счет перфузии с растворами детергентов (Macchiarini, P. et al., 2008). Перфузию осуществляли через портальную вену, так как такой метод наиболее эффективен для доставки детергента к клеткам и для удаления дебриса из ткани. Перфузия через сосудистую сеть позволяет получить межклеточный матрикс с интактной трехмерной архитектурой и функциональным сосудистым руслом (Wang Y. et al., 2015), а так же сохраняется глиссонова капсула (Shupe T. et al., 2010). В результате работы было получено три группы образцов децеллюляризованной печени путем перфузии портальной вены с увеличивающимися концентрациями детергентов: группа 1- образцы печени, децеллюляризованной с 1% раствором тритон X-100, группа 2- образцы печени, децеллюляризованной с 1% и 2% раствором тритон X-100, группа 3- образцы печени, децеллюляризованной с 1%, 2%, 3% раствором тритон X-100. В каждой группе было по 5 образцов. Образцы всех групп представляли собой освобожденный от клеток полупрозрачный матрикс печени крысы.

Растворы додецилсульфат натрия и тритона X-100 наиболее широко используемые вещества для децеллюляризации. Додецилсульфат натрия является сильным ионным детергентом, который разрушает клеточные мембраны. Напротив, тритон X-100 является неионным детергентом, который разрушает липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, но оставляет нетронутыми белок-белковые взаимодействия (Gilbert T.W. et al., 2006). Тритон X-100 описывается в литературе как детергент способный вымывать клеточный материал при минимальном изменении биохимического состава матрикса, его структур и лигандов, а также биологической активности компонентов межклеточного матрикса. Концентрации тритона X-100 для децеллюляризации

печени были взяты из ранее опубликованных источников (Shupe T. et.al., 2010, Pan M.X. et.al., 2014, Mirmalek-Sani S.H. et al., 2013), но в нашей работе в рамках одного исследования впервые проведено сравнение трех разных концентраций тритона X-100 в отмывочном буфере для получения децеллюляризованных образцов. Постепенное увеличение процента тритона X-100 в перфузируемом растворе используется для более мягкого вымывания клеточного материала.

Чтобы продемонстрировать сохранение функционального сосудистого русла, матрикс децеллюляризованной ткани печени крысы окрашивали внутрисосудистым введением раствора голубого декстрана. Сохранность архитектуры сосудистого дерева органа - одно из главных преимуществ данной технологии, поскольку основной проблемой всех искусственных трансплантатов является его адекватная васкуляризация. Именно поэтому децеллюляризацию можно считать перспективной методикой для преодоления проблемы обеспечения васкуляризации трансплантата. Еще одним преимуществом этого метода является то, что после децеллюляризации с сохраненными структурными и функциональными особенностями нативной капиллярной сети есть возможность перезаселения печеночного матрикса взрослыми гепатоцитами и прогенеторными клетками перфузией культуры *in vitro* (Barnes C.A. et.al., 2011).

Механические свойства межклеточного матрикса, такие как прочность на разрыв и эластичность, являются важными биофизическими параметрами, так как способны повлиять на морфологию клеток, их пролиферацию и дифференцировку (Mattei G. et all, 2013). Помимо этого механические свойства образцов являются важным показателем пригодности конструкции в хирургии. Поэтому было проанализировано изменение механических свойств матрикса печени в зависимости от концентрации детергентов. Для регистрации значения прочности материала на разрыв (МПа) и эластичности (% удлинения), образцы подвергались деформации на разрывной машине Zwick/Roell BZ 2.5/TNIS.

Наиболее прочными и эластичными являются образцы печени крысы, последовательно децеллюляризованной 0,1% растворами додецилсульфат натрия, содержащим 1%, 2% и 3% тритона X-100. По данным литературы в состав

межклеточного матрикса печени входят следующие компоненты: структурные белки (коллаген, эластин), адгезивных белков (фибронектин, ламинин, тенасцин), гликозаминогликаны, протеогликианы, гликопротеины (Caralt M., et.al., 2014). В связи с различной растворимостью компонентов межклеточного матрикса в отмывочном буфере, его качественный и количественный состав может меняться после децеллюляризации органа, что может обуславливать изменение физических свойств матрикса.

Многие технологии регенеративной медицины нуждаются в биологических материалах с определенными свойствами, но медицинские имплантаты из синтетических материалов хотя и имеют некоторые преимущества (в том числе и механические), но не в состоянии повторить пространственную структуру и физиологическую активность биологических материалов. Одним из важных свойств материала для реконструктивной медицины являются его физико-механические характеристики, обуславливающие удобство использования при имплантации.

Сравнивая полученные результаты по механическим свойствам печени и данные о прочности на разрыв и эластичности других тканей и материалов для имплантатов, можно сделать вывод, что печень, децеллюляризованная раствором тритона X-100, подходит в качестве имплантата в реконструктивной медицине (таблица 7). Помимо этого необходимо учитывать возможность хирургических манипуляций с полученным децеллюляризованной тканью печени, что обеспечивает широкое применение в тканевой инженерии. Это было основополагающим критерием для выбора протокола децеллюляризации ткани печени для проведения дальнейших экспериментов.

Таблица 7. Данные сравнения прочности на разрыв и эластичности разных тканей и материалов регенеративной медицины. 1- Moffitt T. et all, 2002; 2- Данные НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН лаборатория химии и технологии материалов; 3- Хлусов И.А. и др. 2011.

Образец	Прочность на разрыв, МПа	Эластичность, %
печень 1% Triton	0,2	64,3
печень 2% Triton	0,2	55,3
печень 3% Triton	1,1	77,5
нативная печень(1)	0,3	
ксеноперикард	4,9	32,5
матрикс из фиброина	0,6	74
желатин (2)	2	77
артерия (3)	1,3	0,9
эластичный хрящ (3)	3	30
кожа (3)	10	125

Метод децеллюляризации органов и тканей был разработан как многообещающая технология создания функциональных матриксов для культур клеток и органной трансплантации. Большинство современных исследований направлено на создание тканеинженерных конструкций целого органа, в том числе и печени, но также все чаще предлагается использовать децеллюляризованную ткань как материал для изготовления различных изделий, таких как гидрогель из межклеточного матрикса печени или поджелудочной железы (Sackett S.D. et al., 2018).

Одной из конструкций, предлагаемых в рамках диссертационного исследования, являются макрочастицы межклеточного матрикса печени. Макрочастицы получали путем измельчения полученного межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы в жидком азоте. Фракция макрочастиц со средним размером 207 ± 50 мкм составила 80% по массе от общего количества ткани. Суспензия таких частиц может быть использована в качестве носителей гепатоцитов для восстановления печени путем инъекций (Онищенко Н.А. и др., 2016).

Далее был проведен анализ биологических свойств полученных микрочастиц в зависимости от концентрации детергентов при децеллюляризации печени. Оценка пролиферативной активности клеток проводилась на примере культуры гепатокарциномы человека Hep-G₂. Наибольшая пролиферативная активность клеток была зарегистрирована на макрочастицах межклеточного матрикса печени, последовательно децеллюляризованной 0,1% растворами додецилсульфата натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100 (Боброва М.М. и др., 2015).

По данным диаграммы, на третий контрольный день количество жизнеспособных клеток на образцах 2 и 3 уменьшается. Это может быть связано с накоплением продуктов метаболизма клеток, поскольку в ходе эксперимента не производили смену культуральной среды. Наибольшая пролиферативная активность клеток была зарегистрирована на макрочастицах межклеточного матрикса печени, последовательно децеллюляризованной 0,1% растворами додецилсульфата натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100 (образец 2). Более высокая пролиферативная активность может быть обусловлена качественным и количественным изменением состава матрикса, поскольку компоненты межклеточного матрикса имеют разную растворимость в растворе детергента. При такой концентрации тритона X-100 при перфузии могут стать доступными для клеток экранированные ранее сайты для связывания с рецепторами, способствующие адгезии гепатоцитов, RGD-последовательности на фибронектине и коллагене (Canning P. et.al., 2014). Кроме того, путем перфузии

3% раствором тритона X-100 могут высвобождаться специфические для гепатоцитов факторы роста, связанные с компонентами межклеточного матрикса, например фактор роста гепатоцитов в нативных условиях связанный с перликаном (Londoro R. et.al., 2015).

Такого рода макроматрикссы могут быть использованы как носители клеток для гепатоцитарной трансплантации или как материал для терапии при помощи инъекций, так как сохраняется архитектура межклеточного матрикса и состав белков межклеточного матрикса, что позволяет создать нативное микроокружение для гепатоцитов.

Децеллюляризация органа является перспективным методом регенеративной медицины не только в области создания полномасштабных биоинженерных конструкций, таких как трансплантат органа, но и в ряде других областей: 1) создание специфических микроносителей для клеток, 2) получение гидрогелей из лиофилизированной децеллюляризованной ткани путем ее обработки пепсином с последующим растворением в натрий-фосфатном буфере, 3) изготовление покрытий из раствора компонентов межклеточного матрикса ферментативно расщепленной лиофилизированной децеллюляризованной ткани (Badylak S.F. et.al., 2009).

Микроносители могут быть использованы как вспомогательный материал при трансплантации, в сухом виде или в виде суспензий для инъекций как минимально инвазивный метод лечения. Например, микрочастицы из децеллюляризованной ткани кожи используются для регенерации кожных покровов (Zuo H. et.al., 2012).

Традиционно применяемая трансплантация гепатоцитов имеет практические ограничения в основном за счет трудностей, связанных с получением достаточного количества функционирующих гепатоцитов, необходимых для терапевтической эффективности (Strom S. C. et.al., 1997). Кроме того, первичные гепатоциты легко утрачивают жизнеспособность и свои функции в культуре как *in vitro*, так и после трансплантации (Zhang, W. et.al., 2010). Одним из способов решения данных проблем может стать культивирование гепатоцитов

на гидрогеле из межклеточного матрикса печени или покрытие поверхностей искусственных носителей компонентами матрикса печени для последующего культивирования и трансплантации гепатоцитов. (Hou Y.-T. et.al., 2010, Wang, T. et.al., 2013). Компоненты межклеточного матрикса в составе конструкций создают естественное микроокружение, благоприятное для гепатоцитов, аналогичное микроокружению гепатоцитов в нативной ткани. Такие функциональные носители разрабатываются для тканевой инженерии печени, клеточной терапии и трансплантации. Более того, показано, что покрытия из децеллюляризованной ткани печени и гидрогель на его основе обеспечивают более эффективную адгезию и пролиферацию гепатоцитов, в сравнении с классическими матрицами, такими как коммерческий коллаген и Matrigel (Lee J.S. et.al., 2014).

Учитывая представленные выше результаты, для дальнейших экспериментов был выбран протокол децеллюляризации ткани печени крысы, в котором была использована последовательная перфузия 0,1% растворами додецилсульфата натрия, содержащими 1%, 2% и 3% тритона X-100. Это обусловлено результатами по пролиферативной активности клеток и значениям механических свойств, наиболее подходящими для дальнейшей работы.

В настоящее время существует множество авторских протоколов децеллюляризации различных органов, которые в общем можно разделить на физические и химические методы, различающиеся составом растворов детергентов и временем инкубации в них. При этом все еще остается актуальным выбор критериев для оценки успешности децеллюляризации органа и качества полученного матрикса. Принимая во внимание литературные данные, были предложены следующие минимальные критерии оценки успешности децеллюляризации (Crapo P.M. et al., 2011): 1) отсутствие ядерного материала на срезах децеллюляризованной ткани; 2) менее 50 нг двухцепочечной ДНК на 1 мг сухого веса нативной ткани; 3) отсутствие фрагментов двухцепочечной ДНК длиной более 200 пар нуклеотидов.

Для выявления структуры межклеточного матрикса печени, были сделаны криосрезы, полученные препараты окрашивали гематоксилин-эозином. При

анализе препаратов было показано, что после перфузии сохранена трехмерная архитектура и нативный структурный матрикс. Гистологическая оценка не показала ядерного или цитоплазматического окрашивания в децеллюляризованной ткани. Межклеточный матрикс децеллюляризованной ткани создает необходимое микроокружение для клеток, которое влияет на их морфологию, дифференцировку и пролиферацию (Pei M. et.al., 2011). Далее в работе будет показано, что матрикс, полученный с помощью децеллюляризации, при заселении клетками обеспечивает необходимое окружение для восстановления функциональной активности органа, так как его нативная структура полностью сохранилась.

Далее был проведен анализ содержания остаточной ДНК после выделения тотальной ДНК из образцов нативной и децеллюляризованной ткани печени. Концентрация остаточной ДНК в исследуемых образцах децеллюляризованной ткани печени крысы составила 38 ± 8 нг на 1 мг сухого веса нативной ткани, что составляет менее 1% от количества ДНК в нативной ткани. А также не было обнаружено фрагментов остаточной ДНК длиной более 200 пар нуклеотидов. Таким образом, полученная децеллюляризованная ткань печени крысы отвечает минимальным критериям успешного удаления клеточного материала из межклеточного матрикса и может быть использована для дальнейших экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

После этого были получены фрагменты лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы, которые в данной работе используются в качестве одной из форм конструкций на основе межклеточного матрикса для регенерации тканей. Лиофильно высушенные образцы измельчали до размера 2x2 мм и стерилизовали под ультрафиолетом в течение 30 минут и далее использовали.

Биохимический состав фрагментов лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени крысы проводили на MS/MS-спектрометре. Было показано, что в состав полученного межклеточного матрикса входят: коллаген I, III, IV и VI типов, бигликан, фибриллин. Коллагены играют как

структурную роль, обеспечивая прочность межклеточного матрикса, а также играют основополагающую роль в адгезии и пролиферации клеток за счет RGD-последовательностей в структуре белка. Стоит отметить, что в структуре децеллюляризованной ткани сохранились как основные фибриллярные коллагены (I, III, IV типов), так и коллаген VI типа, который формирует фибриллы-бусины. Коллаген VI типа при взаимодействии с другими коллагенами добавляет прочности межклеточного матрикса, а также он может быть ассоциирован с гликопротеинами и протеогликанами матрикса (Lamande S.R., Bateman J.F., 2018). Поскольку фибриллин ассоциирован с эластином, можно предположить, что его наличие в составе полученного межклеточного матрикса обуславливает высокие показатели эластичности.

Одним из важных параметров конструкции для регенеративной медицины является скорость его биодegradации. Degradация децеллюляризованной ткани печени крысы была изучена в течение 48 часов в условиях ферментативной и нейтральной сред. За 24 часа образцы полностью деградировали в растворе коллагеназы, что согласуется с биохимическим составом полученного межклеточного матрикса, основным компонентом которого является коллаген.

Структура полученных макрочастиц и лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы была изучена методом сканирующей электронной микроскопии. По данным сканирующей электронной микроскопии матрикс характеризуется разветвленной системой пор, размером в среднем 20мкм. Подобная пористая структура оптимальна для адгезии гепатоцитов (Uygun B.E. et al., 2010). Таким образом, в результате децеллюляризации печени сохраняется пористая структура внеклеточного матрикса, что согласуется с данными литературы (Uygun B.E. et al., 2010; Nari G.A. et al., 2013; Shirakigawa N. et al., 2012) и подтверждает возможность проникновения гепатоцитов внутрь матрикса. Структура поверхности лиофилизированного фрагмента децеллюляризованной ткани печени крысы является шероховатой, что является важным параметром для адгезии клеток; трехмерная структура является пористой, но наблюдается уменьшение размера пор по сравнению с

макрочастицей, что обуславливается обезвоживанием матрикса в процессе его лиофилизации.

Как отмечалось ранее, изучение количества остаточной ДНК и наличия клеточного материала в полученном межклеточном матриксе печени это лишь минимальные критерии для подтверждения успешности протокола децеллюляризации органа. Необходимо учитывать микро- и наноструктурные изменения межклеточного матрикса ткани не только в качестве критерия успеха удаления клеток, но и как важную характеристику биологических свойств и регенеративного потенциала конструкции (Ahmed E. et al., 2019).

Наноструктуру межклеточного матрикса исследовали методом сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ). Анализ межклеточного матрикса макрочастицы децеллюляризованной ткани печени с помощью СЗНТ подтвердил данные СЭМ и гистологического исследования об отсутствии клеток в матриксе после децеллюляризации ткани печени. Была показана шероховатая и извилистая топография полученного межклеточного матрикса печени крысы. Фрагмент лиофилизированного межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани характеризуется пористой структурой, микропоры с характерным размером от 5 до 30 мкм разделены между собой стенками межклеточного матрикса толщиной от 150 нм до нескольких микрон, что является оптимальным для адгезии и пролиферации клеток, что подтверждается в дальнейших экспериментах. Степень объемной пористости макрочастицы децеллюляризованной ткани печени выше такового показателя фрагмента лиофилизированного межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани на 16,6%, что обусловлено высушиванием образца и уплотнением его структуры.

Перед изучением регенеративного потенциала лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы, был проведен эксперимент по изучению их цитотоксичности и адгезии и пролиферации клеток на конструкциях. В ходе эксперимента было выявлено, что полученные фрагменты межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани печени крысы породы Wistar не токсичны для мышинных фибробластов линии 3Т3, а также что

конструкции поддерживают высокий уровень адгезии и пролиферации как мышинных фибробластов 3Т3, так и клеток гепатокарциномы человека. Пористый матрикс печени с сохраненными элементами сосудистой сети позволяет клеткам более эффективно мигрировать, дифференцироваться и пролиферировать. (Faulk D.M. et al., 2015).

Возможность применения лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени крысы и их регенеративный потенциал был изучен в модели полнослойной кожной раны крысы. Метод децеллюляризации позволяет получить васкуляризированный межклеточный матрикс печени с разветвленной системой пор, в котором содержание ДНК по сравнению с нативной печенью составляет менее 1 %, и который не является иммуногенным (Hussein K.H. et al., 2013), что позволяет его использовать в качестве различных конструкций для регенерации органов и тканей и обуславливает возможность его универсального применения в тканевой инженерии. В модели полнослойной раны кожи лиофилизированные фрагменты децеллюляризованной ткани печени крысы были использованы в качестве раневого покрытия для заживления кожного покрова. Эта модель была выбрана, поскольку межклеточный матрикс печени имеет в своем составе коллагены, наиболее распространенные в организме (коллагены I, II, IV типов), которые являются основными компонентами и в межклеточном матриксе кожи, что позволяет судить о регенеративном потенциале конструкции при заживлении кожи. В литературе есть примеры использования метода децеллюляризации для получения межклеточного матрикса кожи (Zuo H. et al., 2012). Такая технология вследствие плотности кожного покрова сопряжена с рядом трудностей : ферментативной обработкой ткани, длительной инкубации с растворами детергентов, воздействие низких температур, что может привести к нарушению в структуре межклеточного матрикса.

В рамках диссертационного исследования крысам на спине наносили рану, животным в контрольной группе рану закрывали стерильной марлевой повязкой, экспериментальным животным на ране распределяли частицы лиофильно высушенного матрикса печени размером 2-3 мм так, чтобы рана была закрыта на

70%. Далее производили оценку заживления кожных покровов: производили измерение диаметра ран в ходе эксперимента и проводили качественную и количественную оценки заживления кожи.

Одной из важных характеристик раневого покрытия является его набухаемость. Гигроскопичность материала позволяет равномерно распределяться жидкости, а соответственно и необходимым для заживления раны факторам роста, цитокинам, ферментам и другим веществам (Wang H.M. et al., 2013). Частицы лиофильно высушенного межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани печени являются гидрофильными, при наложении на рану набухают и легко фиксируются на ней. Пористая структура обеспечивает высокий уровень газообмена, циркуляции жидкости, а так же создает барьер для бактерий (Shan Y.H. et al., 2015). Вследствие пористости межклеточного матрикса такие частицы способны удерживать влагу и не требуют дополнительного увлажнения в ходе операции. Эти свойства облегчают процесс наложения раневого покрытия, а отсутствие хирургических манипуляций при фиксации конструкции позволяет сделать процедуру безболезненной и менее инвазивной.

Заживление раны - комплексный процесс, включающий в себя взаимодействия между различными иммунными и биологическими системами. Оно включает в себя целый набор четко регулируемых биохимических каскадов, которые коррелируют с появлением различных типов клеток в раневое ложе в течение различных фаз процесса заживления (Attinger C.E. et al., 2006). Динамика заживления ран для обеих групп с 0 по 3 день отличаются, хотя и не значительно по сравнению с остальными участками графика. В этот период, сразу после нанесения раны, активируется система гемостаза (Broughton G. et al., 2006), направленная на остановку кровотечения. Тем не менее, эти различия могут быть объяснены взаимодействием компонентов крови и тромбоцитов с коллагеном и другими компонентами межклеточного матрикса. Такой контакт вызывает высвобождение факторов свертывания крови из тромбоцитов и формирование сгустка крови (Robson M.C., et al., 2001; Skover G.R., et al., 1991). В составе частиц лиофильно высушенного межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани

печени присутствует коллаген, который может увеличивать площадь поверхности такого взаимодействия и усиливать эффект гемостаза. На 3 день эксперимента видно, что на ране экспериментальной группы образовались сгустки крови и по краям рана начала затягиваться.

Резкий скачок в ускорении уменьшения раны в экспериментальной группе крыс после 3 дня эксперимента совпадает с началом пролиферативной фазы заживления раны. Эта фаза характеризуется миграцией фибробластов и накоплением вновь синтезированного межклеточного матрикса (Hunt Т.К., 1998). Также начало пролиферативной фазы коррелирует с ранее проанализированным профилем биodeградации конструкций. Таким образом, компоненты межклеточного матрикса в конструкции после расщепления местными металлопротеиназами, играют важную роль в ремоделировании межклеточного матрикса кожи, тем самым ускоряя процесс заживления раны.

В экспериментальной группе на 18 день уже наблюдалось полное заживление раны, но при этом было выявлено покраснение раневого ложа размером порядка 5 мм. На 23 день покраснение заметно уменьшилось, на месте раны образовался волосяной покров, что является показателем восстановления функции кожного покрова. В контрольной группе полное заживление раны было достигнуто на 40-ой день.

Качественный анализ заживления полнослойной раны кожи проводили путем гистологического анализа срезов кожи в раневом ложе. Было выявлено наличие трех слоев кожи, наличие всех слоев кожи свидетельствует об успешном заживлении. Морфология срезов двух экспериментальных групп не отличается. Очагов воспаления или наличие макрофагов не было выявлено, что является важным показателем заживления кожи.

Все вышеперечисленные причины обуславливают ускорение заживления раны при использовании в качестве раневого покрытия лиофильно высушенных частиц межклеточного матрикса децеллюляризованной ткани печени по сравнению с контролем на 22 дня, то есть в 2,2 раза.

4.2. Композитные скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка

Один из основных подходов тканевой инженерии и регенеративной медицины при восстановлении поврежденных или утраченных органов и фрагментов тканей – создание конструкций, имитирующих структуру тканей и органов. При создании таких конструкций ключевое значение имеет правильный подбор используемых материалов. При получении конструкций очень важно использовать материалы, сочетание свойств которых может обеспечить как высокую эффективность регенерации, так и возможность имплантации конструкции в организм.

Конструкции из синтетических материалов, таких как поликапролактон, полигликолид, полиамид, как правило, обладают хорошими механическими свойствами и дают возможность регулировки их формы, структуры и физических показателей, но обладают токсичными для клеток продуктами деградации.

Использование конструкций природного происхождения, способных максимально близко имитировать микроокружение нативной ткани, сопряжено с рядом трудностей. Такие конструкции получают из живых тканей, что подразумевает большие затраты, встает этический вопрос использования таких материалов, полученные конструкции имеют низкие механические показатели. Это создает предпосылки для разработки новых конструкций для регенеративной медицины.

Одним из перспективных материалов для создания биосовместимых конструкций для тканевой инженерии и регенеративной медицины является фиброин шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* (Агапов И.И. и др., 2010). Структура фиброина шелка обеспечивает уникальные свойства, позволяющие использовать его в качестве материала для биоискусственных конструкций. Главное преимущество шелка по сравнению с другими биосовместимыми материалами заключается в его механических свойствах. Помимо этого, фиброин шелка является неиммуногенным материалом: отсутствие иммунного ответа на изделия из фиброина шелка было показано на

различных моделях *in vivo* и *in vitro* (Bhattacharjee M. et al., 2013). Также было показано наличие у фиброина шелка антибактериальных свойств: адгезия бактериальных клеток к изделиям из фиброина шелка значительно снижена по сравнению с другими материалами, что обусловлено физико-химическими свойствами фиброина шелка. К преимуществам фиброина как материала, применяемого в регенеративной медицине, относится и то, что конструкции из него могут быть получены в мягких условиях и их изготовление не требует особой химической обработки. Таким образом, фиброин обладает уникальными свойствами, которые позволяют формировать из него двумерные и трехмерные конструкции и широко использовать его в качестве биосовместимого материала в различных направлениях тканевой инженерии. Повысить биосовместимость конструкций из фиброина шелка можно путем введения в его состав микрочастиц межклеточного матрикса нативной ткани. Такая модификация позволит воссоздать в биоискусственном матриксе нативное микроокружение для клеток, при этом сохранив механические свойства конструкций из чистого фиброина. Использование композитных конструкций облегчит манипуляции по сравнению с децеллюляризованной тканью и облегчит позиционирование фрагментов межклеточного матрикса при имплантации.

В рамках диссертационной работы методом полива были изготовлены скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. Микрочастицы были получены путем измельчения децеллюляризованной ткани печени в жидком азоте. Все скаффолды были бесцветными, прозрачными и имели толщину от 20 до 60 мкм.

Структура поверхности полученных скаффолдов была изучена методом СЭМ. Поверхность композитных скаффолдов отличалась шероховатой структурой по сравнению с немодифицированным скаффолдом. Причем рельеф скаффолда с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы был неравномерным по всей площади поверхности с выраженными локальными кластерами микрочастиц.

Микро- и наноструктура поверхности полученных скаффолдов, а также структуру микрочастиц в составе скаффолдов исследовали методом сканирующей зондовой микроскопии. Было показано, что микрочастицы децеллюляризованной ткани присутствуют как в толще композитных скаффолдов, так и на их поверхности. Таким образом, можно сделать вывод об эффективности выбранного метода изготовления композитных скаффолдов, поскольку часть микрочастиц не экранированы фиброином шелка, что может оказывать влияние на взаимодействие клеток с конструкцией до начала деструкции скаффолда. При количественном анализе СЗМ-изображений было выявлено, что включение в состав микрочастиц межклеточного матрикса ткани печени увеличило шероховатость поверхности конструкций в 5 раз по сравнению с некомпозитными скаффолдами. Известно, что шероховатость субстрата является важным параметром, определяющим уровень адгезии клеток, их пролиферации и дифференцировки (Ribeiro V.P. et al., 2017; Nikkhah M. et al., 2012, Сургученко В.А. и др., 2012).

Исследование микро- и наноструктуры полученных композитных скаффолдов было произведено методом СЗНТ. С помощью этого метода было показано, что микрочастицы печени крысы на поверхности скаффолда распластаны и имеют большую площадь соприкосновения с ней. Только уникальные возможности метода СЗНТ позволили идентифицировать морфологию контакта микрочастицы и остова скаффолда, что было невозможно, используя другие методы микроскопии, в том числе СЭМ (Ефимов А.Е. и др., 2016).

Одними из важнейших свойств материала и конструкции для регенеративной медицины являются его механические характеристики, которые обуславливают возможность проведения хирургических манипуляций при имплантации полученной конструкции. Конструкция из водного раствора фиброина шелка *Bombyx mori* обладают показателями прочности на разрыв и эластичности сравнимыми с изделиями, активно используемыми в регенеративной медицине (Сафонова Л.А. и др., 2015, Севастьянов В.И., 2011).

При этом, включение в состав микрочастиц децеллюляризованной ткани не влияет на показатели эластичности и прочности на разрыв скаффолда в виде пленки.

Далее проводили исследование биосовместимости и оценку регенеративного потенциала *in vivo* полученных скаффолдов в виде пленок. Перед проведением этих экспериментов, был проведен анализ цитотоксичности скаффолдов, который не выявил цитотоксического эффекта полученных скаффолдов на основе фиброина шелка на клетки.

Оценку биосовместимости конструкций производили на примере клеток двух культур- мышинных фибробластов 3T3 и клеток гепатокарциномы человека Нер-G₂. В ходе эксперимента было показано, что все скаффолды на основе фиброина шелка поддерживают адгезию клеток, достоверных различий между различными группами образцов и контролем не было выявлено. На композитных скаффолдах пролиферативная активность клеток на 7 день наблюдения была выше, чем на немодифицированных скаффолдах, что может быть обусловлено оптимальными показателями шероховатости композитных конструкций. Но наибольшее количество клеток обеих культур на 7 день эксперимента было зарегистрировано на скаффолдах в виде пленки на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы. Это может зависеть от формы и положения микрочастиц децеллюляризованной ткани на поверхности скаффолда, они распластаны по поверхности конструкции, что создает оптимальный рельеф для адгезии и пролиферации клеток. Так же это может быть связано с тканеспецифичными свойствами микрочастиц децеллюляризованной ткани (Ефимов А.Е. и др., 2017), обусловленными биохимическим составом микрочастиц.

Регенеративный потенциал и возможность применения композитных скаффолдов на основе фиброина шелка были изучены в модели полнослойной кожной раны крысы.

Всем крысам были успешно имплантированы исследуемые скаффолды. Скаффолды на основе фиброина шелка являются гигроскопичными, фиксируются

на ране без наложения шовного материала, удерживают влагу на протяжении всей процедуры (Сафонова Л.А. и др.,2016). Скаффолды легко позиционируются на ране, возможность отказа от пришивания конструкции делает процедуру менее инвазивной и травмоопасной. При манипуляциях во время процедуры различий в работе с исследуемыми скаффолдами не было выявлено.

Количественную оценку заживления кожных покровов производили путем измерения диаметра ран в ходе эксперимента. Все исследуемые конструкции ускоряли заживление раны по сравнению с контролем.

Форма графика динамики заживления раны при использовании композитных скаффолдов не отличается от формы графика заживления раны контроля. Применение в качестве раневого покрытия скаффолдов на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани ускоряет заживление раны на 17 дней (в 1,74 раза) по сравнению с контролем, и на 5 дней (в 1,22 раза) по сравнению с немодифицированным скаффолдом.

Качественный анализ заживления полнослойной раны кожи проводили путем гистологического анализа срезов кожи в раневом ложе. Было выявлено наличие трех слоев кожи как в нативной коже, наличие всех слоев кожи свидетельствует об успешном заживлении. Морфология среза экспериментальной группы с использованием скаффолда на основе фиброина шелка отличается более выраженным роговым слоем эпидермиса и рыхлой структурой дермы. Очагов воспаления или наличие макрофагов не было выявлено, что является важным показателем заживления кожи. Было показано наличие волосяных фолликулов в группах с использованием композитных скаффолдов, что свидетельствует и о полном функциональном восстановлении кожи.

Таким образом, можно утверждать о высоком регенеративном потенциале полученных скаффолдов на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени крысы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка конструкций для регенеративной медицины является междисциплинарной задачей, направленной на воссоздание в процессе восстановления поврежденного органа необходимых физических параметров, микро- и наноструктуры, а также биологических свойств нативной ткани. Использование биополимеров, нативного межклеточного матрикса, а также их композитов позволит расширить возможности создания высокоэффективных конструкций для различных направлений тканевой инженерии. Разработанные методы в рамках диссертационной работы позволят создать перспективные биомедицинские конструкции для регенеративной медицины, которые будут являться универсальными бесклеточными платформами для создания персонализированных биомедицинских клеточных продуктов.

В настоящей работе разработан метод децеллюляризации печени крысы породы Wistar. Полученный межклеточный матрикс печени удовлетворял минимальным критериям успешности процедуры децеллюляризации (не было выявлено ядерного материала, не были обнаружены фрагменты ДНК размером более 200 пар нуклеотидов, общее содержание ДНК в 1 мг сухого веса матрикса составило менее 50 нг), характеризовался высокопористой структурой и шероховатой поверхностью, не являлся цитотоксичным и поддерживал высокие уровни пролиферации клеток, в ходе процедуры децеллюляризации были сохранены основные компоненты межклеточного матрикса ткани печени, остаточное содержание ДНК было меньше допустимого. На основе децеллюляризованной ткани печени были изготовлены конструкции в виде фрагментов лиофилизированной децеллюляризованной ткани печени, а также композитные скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка, с включенными в состав микрочастицами межклеточного матрикса ткани печени. Все конструкции не являются токсичными для клеток, поддерживают высокий уровень адгезии и пролиферации клеток мышинных фибробластов 3T3 и гепатокарциномы человека Hep-G₂. Была изучена микро- и

наноструктура конструкций методом СЗНТ. Было выявлено увеличение шероховатости при внесении в состав микрочастиц децеллюляризованной ткани, пористость и шероховатость лиофилизированных фрагментов были ниже, чем у децеллюляризованной ткани, что обуславливается высушиванием и уплощением межклеточного матрикса при лиофилизации. Были изучены механические свойства композитных скаффолдов, причем включение в состав микрочастиц межклеточного матрикса ткани печени существенно не изменял прочность на разрыв и эластичность конструкций. В ходе работы была освоена и отработана модель заживления полнослойной кожной раны крысы для исследования регенеративного потенциала конструкций. Все конструкции легко позиционировались на ране, без нанесения швов. Полученные конструкции имеют высокий регенеративный потенциал, поскольку ускоряют заживление кожной раны, по сравнению с контролем. Гистологический анализ раневого ложа после полного закрытия раны подтвердил восстановление трех слоев кожи, без видимых очагов воспаления, что свидетельствует о полном заживлении раны.

Таким образом, полученные конструкции на основе децеллюляризованной ткани печени обладают высоким регенеративным потенциалом, способны воссоздавать нативную архитектуру и окружение для клеток, и могут быть рассмотрены как перспективные конструкции для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики получения биodeградируемых скаффолдов на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и 2D композитных скаффолдов из фиброина шелка, позволяющие воссоздать нативное микроокружение для клеток.
2. Используемый для создания скаффолдов межклеточный матрикс отвечает критериям децеллюляризованной ткани: не было выявлено фрагментов клеточных ядер, не были обнаружены фрагменты ДНК размером более 200 пар нуклеотидов, общее содержание ДНК в 1 мг сухого веса матрикса составило менее 50 нг.
3. Разработанные скаффолды характеризуются высокой пористостью: степень объемной пористости макрочастиц и фрагментов межклеточного матрикса составила $78.4 \pm 4.7\%$ и $61.8 \pm 5.4\%$ соответственно. Оригинальная методика получения 2D композитных скаффолдов позволила увеличить шероховатость поверхности в 5 раз по сравнению с немодифицированным скаффолдом, что способствовало улучшению функциональных свойств образцов.
4. Межклеточный матрикс децеллюляризованной ткани биodeградирует в ферментативной среде и стабилен в нейтральной. Механические свойства полученных скаффолдов совместимы с хирургическими манипуляциями при их имплантации.
5. Разработанные биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в виде макрочастиц, фрагментов межклеточного матрикса и композитных скаффолдов из фиброина шелка не токсичны, поддерживают высокий уровень адгезии и пролиферации клеток культур мышинных фибробластов 3T3 и гепатокарциномы человека Hep-G₂.

6. Разработанные биodeградируемые скаффолды на основе децеллюляризованной ткани печени в виде фрагментов межклеточного матрикса и композитных скаффолдов из фиброина шелка в экспериментальной модельной системе *in vivo* ускоряют заживление полнослойной кожной раны в среднем в 2 раза, обладают высоким регенеративным потенциалом, и являются перспективными для использования в регенеративной медицине.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МТТ- бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия

СЭМ- сканирующая электронная микроскопия

СЗНТ- сканирующая зондовая нанотомография

СЗМ- сканирующая зондовая микроскопия

ДАРИ- 4', 6-диамидино-2-фенилиндол

DMEM- среда Игла , модифицированная по методу Дульбекко

ТСЕР- трис(2-карбоксиэтил)фосфин

TFA- трифторуксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биосовместимые материалы. Учебное пособие. / Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. - М. : ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011.
2. Биосовместимость. / под ред. В.И. Севастьянова. - М. : ИЦ ВНИИ геосистем, 1999. – 47-87 с.
3. Биохимия: учебник для вузов. / Ред. Северин Е.С. - М. : ГЭОТАР-МЕД, 2003.
4. Биология В 3 томах. Т.3. Пер. с англ. / Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. – М. : Мир, 2008.
5. Иммунология. Пер. с англ. / Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. – М. : Мир, 2000.
6. Основы взаимодействия биологических тканей с искусственными материалами. Учебное пособие. / Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Пустовалова А.А., Дзюман А.Н. – Т. : ТПУ, 2011.
7. Практикум по зоологии позвоночных. / Карташев Н.Н., Соколов В.Е., Шилов И.А. - М.: Высшая школа, 1981.
8. Цитология и общая гистология. Учебное пособие. / Быков В.Л. - Спб.: Сотис, 2012.
9. Агапов И.И. Биодegradируемые матрицы из регенерированного шелка *Vombis mori*. / И.И. Агапов, М.М. Мойсенович, Т.В. Васильева, О.Л. Пустовалова, А.С. Коньков, А.Ю. Архипова, О.С. Соколова, В.Г. Богущ, В.И. Севастьянов, В.Г. Дебабов, М.П. Кирпичников. // Доклады Академии Наук. - 2010. - Том 433. - №5. - С.699-702.
10. Боброва М.М. Децеллюляризация ткани печени как перспективная технология получения пористого матрикса для тканевой инженерии и регенеративной медицины / М.М. Боброва, Л.А. Сафонова, О.И. Агапова, М.Е. Крашенинников, М.Ю. Шагидулин, И.И. Агапов. // Современные технологии в медицине. – 2015. - Том 7. - №4. - С.6-13.

11. Боброва М.М. Анализ пролиферативной активности клеток в микрочастицах, полученных из децеллюляризованной ткани печени и почки / М.М. Боброва, Л.А. Сафонова, О.И. Агапова, А.Е. Ефимов, И.И. Агапов. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2018. - Том 20. - №4. - С.69-75.
12. Готье С.В. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2017 году / С.В. Готье, С.М. Хомяков. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2018. – Т. 20. - №2. - С. 6-28.
13. Ефимов А.Е. Наноструктурные особенности контактов фибробластов и двухмасштабного биосовместимого полиуретанового матрикса / А.Е. Ефимов, О.И. Агапова, Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, В.А. Парфенов, Е.В. Кудан, Ф.Д.А.С. Перейра, Е.А. Буланова, В.А. Миронов, И.И. Агапов. // Российские нанотехнологии. - 2016. - Том 11. - №11-12. - С. 116-119.
14. Ефимов А.Е. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов и клеток методом сканирующей зондовой крионанотомографии / А.Е. Ефимов, О.И. Агапова, Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, И.И. Агапов. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2017. - Том 19. - №4. - С.78-87.
15. Зиганшин Р. Х. Оптимизация условий пептидомного анализа плазмы крови / Р.Х. Зиганшин, В. В. Рябинин, И. В. Азаркин, В. Т. Иванов. // Биоорг. Химия. - 2018. - Т.44. - №3. - С. 278-286.
16. Онищенко Н.А. Гепатоспецифический мелкодисперсный матрикс как важный компонент имплантируемых клеточно-инженерных конструкций вспомогательной печени / Н.А. Онищенко, М.Е. Крашенинников, М.Ю. Шагидулин, М.М. Боброва, В.И. Севастьянов, С.В. Готье. // Гены и Клетки. - 2016. - Том 11. - №1. - С.54-60.
17. Сафонова Л.А. Пленки на основе фиброина шелка для заживления полнослойной раны кожи у крыс / Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, О.И. Агапова, А.Ю. Архипова, А.В. Гончаренко, И.И. Агапов. // Вестник

- трансплантологии и искусственных органов. - 2016. - Том 18. - №3. - С.80-83.
18. Сургученко В.А. Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мышцы линии NIH/3T3 на пленках из бактериального сополимера поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата) с различной шероховатостью поверхности / В.А. Сургученко, А.С. Пономарева, А.Е. Ефимов, Е.А. Немец, И.И. Агапов, В.И. Севастьянов. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2012. - Т.14. - №1. - с.72-77.
 19. Ahmed E. Micro and ultrastructural changes monitoring during decellularization for the generation of a biocompatible liver / E. Ahmed, T. Saleh, L. Yu , H.H. Kwak, B.M. Kim, K.M. Park, Y.S. Lee, B.J. Kang, K.Y. Choi, K.S. Kang, H.M. Woo. // J Biosci Bioeng. - 2019. - P: S1389-1723(18)30939-3.
 20. Atala A. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty / A. Atala; S.B. Bauer; S. Soker; J.J. Yoo; A.B. Retik. // Lancet. - 2006. - V. 367. - P. 1241–1246.
 21. Attinger C.E. Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants / C.E. Attinger, J.E. Janis, J. Steinberg, J. Schwartz, A. Al-Attar, K. Couch. // Plastic and reconstructive surgery. - 2006. - V.117. - P.72S-109S.
 22. Badylak S.F. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and functional / S.F. Badylak, D.O. Freytes, T.W. Gilbert. // Acta Biomaterials. - 2009. - V.5(1). - P.1-13.
 23. Baiguera S. Development of bioengineered human larynx / S. Baiguera; A. Gonfiotti; M. Jaus; C.E. Comin; M. Paglierani; C. Del Gaudio; A. Bianco; D. Ribatti; P. Macchiarini. // Biomaterials. - 2011. - V. 32. - P. 4433–4442.
 24. Baiguera S. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation / S. Baiguera; P. Jungebluth; A. Burns; C. Mavilia; J. Haag; D.E. Coppi; P. Macchiarini. // Biomaterials. - 2010. - V. 31. - P. 8931–8938.
 25. Bao J. Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and heparocytes in rats / J. Bao, Y. Shi, H.

- Sun, X. Yin, R. Yang, L. Li, X. Chen, H. Bu. // *Cell Transplantation*. - 2011. - V.20(5). - P.753-766.
26. Baptista P.M. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid / P.M. Baptista, M.M. Siddiqui, G. Lozier, S.R. Rodriguez, A. Atala, S. Soker. // *Hepatology*. - 2011. - V.53(2). - P.604-617.
27. Baker N.A. Diabetes-Specific Regulation of Adipocyte Metabolism by the Adipose Tissue Extracellular Matrix / N.A. Baker; L.A. Muir; A.R. Washabaugh; C.K. Neeley; S.Y. Chen; C.G. Flesher; J. Vorwald; J.F. Finks; A.A. Ghaferi ; M.W. Mulholland; O.A. Varban, C.N. Lueng, R.W. O'Rourke. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2017. - V. 102. - P. 1032–1043.
28. Barnes C.A. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices / C.A. Barnes, J. Brison, R. Michel, B.N. Brown, D.G. Castner, S.F. Badylak, B.D. Ratner // *Biomaterials*. - 2011. - V.32(1). - P.137–143.
29. Batioglu-Karaaltin A. In vivo tissue-engineered allogenic trachea transplantation in rabbits: A preliminary report / A. Batioglu-Karaaltin; M.V. Karaaltin; E. Ovali; O. Yigit; M. Kongur; O. Inan; E. Bozkurt; H. Cansiz // *Stem Cell Rev.* - 2015. - V.11. - P. 347–356.
30. Becker M. Processing of human cardiac tissue toward extracellular matrix self-assembling hydrogel for in vitro and in vivo applications / M. Becker; J.A. Maring; B. Oberwallner; B. Kappler; O. Klein; V. Falk; C. Stamm // *J. Vis. Exp.* - 2017. - V.130. - P. e56419.
31. Bhattacharjee M. The role of 3D structure and protein conformation on the innate and adaptive immune responses to silk-based biomaterials / M. Bhattacharjee, E. Schultz-Thater, E. Trella, S. Miot, S. Das, M. Loparic, A.R. Ray, I. Martin, G.C. Spagnoli, S. Ghosh // *Biomaterials*. - 2013. - V.34(33). - P. 8161-8171.
32. Braun B.N. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds / B.N. Braun, C.A. Barnes, R.T. Kasick, R. Michel, T.W. Gilbert, D. Beer-Stolz, D.G. Castner, B.D. Ratner, S.F. Badylak // *Biomaterials*. - 2010. - V.31(3). - P.428-437.

33. Bronstein J.A. Physicochemical decellularization of composite flexor tendon-bone interface grafts / J.A. Bronstein; C.Y.L. Woon; S. Farnebo; A.W. Behn; T. Schmitt; H. Pham; A.B. Castillo; J. Chang // *Plast. Reconstr. Surg.* - 2013. - V. 132. - P. 94–102.
34. Broughton G. The basic science of wound healing / G. Broughton, J.E. Janis, C.E. Attinger // *Plastic and reconstructive surgery.* - 2006. - V.117. - P.12S – 34S.
35. Brown C.F. Effect of decellularized adipose tissue particle size and cell density on adipose-derived stem cell proliferation and adipogenic differentiation in composite methacrylated chondroitin sulphate hydrogels / C.F. Brown; J. Yan; T.T. Han; D.M. Marecak; B.G. Amsden; L.E. Flynn// *Biomed. Mater.* - 2015. - V. 10. - P. 045010.
36. Burg K.J. Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds / K.J. Burg, W.D. Jr Holder, C.R. Culberson, R.J. Beiler, K.G. Greene, A.B. Loeb sack, W.D. Roland, P. Eiselt, D.J. Mooney, C.R. Halberstadt // *J Biomed Mater Res.* – 2000. - V.51. - P.642-649.
37. Butler C.R. Vacuum-assisted decellularization: An accelerated protocol to generate tissue-engineered human tracheal scaffolds / C.R. Butler; R.E. Hynds; C. Crowley; K.H. Gowers; L. Partington; N.J. Hamilton; C. Carvalho; M. Platé; E.R. Samuel; A.J. Burns; L. Urbani, M.A. Birchall, M.W. Lowdell, P. De Coppi, S.M. Janes // *Biomaterials.* – 2017. - V. 124. - P. 95–105.
38. Canning P. Structural mechanisms determining inhibition of the collagen receptor DDR1 by selective and multi-targeted type II kinase inhibitors / P. Canning, Tan Li, Chu Kiki, Sam W.Lee, S. Gray Nathanael, N. Alex, M. Bullock // *J Mol Biol.* - 2014. - V.426(13). - P.2457-2470.
39. Caralt M. Liver bioengineering: from the stage of liver decellularized matrix to the multiple cellular actors and bioreactor special effects / M. Caralt, E. Velasco, A. Lanas, P.M. Baptista // *Organogenesis.* - 2014. - V.10(2). - P.250-259.
40. Chiou G.J. Optimization of an injectable tendon hydrogel: The effects of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells on tendon healing in vivo / G.J.

- Chiou; C. Crowe; R. McGoldrick; K. Hui; H. Pham; J. Chang, // *Tissue Eng. Part A*. - 2015. - V. 21. - P. 1579–1586.
41. Chen Y. Current advances in the development of natural meniscus scaffolds: Innovative approaches to decellularization and recellularization / Y. Chen; J. Chen; Z. Zhang; K. Lou; Q. Zhang; S. Wang; J. Ni; W. Liu; S. Fan; X. Lin // *Cell Tissue Res.* - 2017. - V. 370. - P. 41–52.
42. Cheng C.W. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering / C.W. Cheng; L.D. Solorio; E. Alsberg // *Biotechnol. Adv.* - 2014. - V. 32. - P. 462–484.
43. Cheung H.K. Composite hydrogel scaffolds incorporating decellularized adipose tissue for soft tissue engineering with adipose-derived stem cells / H.K. Cheung; T.T. Han; D.M. Marecak; J.F. Watkins; B.G. Amsden; L.E. Flynn // *Biomaterials.* - 2014. - V. 35. - P. 1914–1923.
44. Chistiakov D.A. Endogenous and exogenous stem cells: A role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation / D.A. Chistiakov // *J. Biomed. Sci.* - 2010. - V. 17. - P. 92.
45. Choi J.S. Decellularized extracellular matrix derived from human adipose tissue as a potential scaffold for allograft tissue engineering / J.S. Choi; B.S. Kim; J.Y. Kim; J.D. Kim; Y.C. Choi; H.J. Yang; K. Park; H.Y. Lee; Y.W. Cho // *J. Biomed. Mater. Res. A.* - 2011. - V. 97. - P. 292–299.
46. Choi J.S. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules / J.S. Choi; J.D. Kim; H.S. Yoon; Y.W. Cho. // *Tissue Eng. Part A.* - 2013. - V. 19. - P. 329–339.
47. Crapo P.M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak // *Biomaterials.* - 2011. - V.32(12). - P.3233–3243.
48. Dahms S.E. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: Comparative analysis in rat, pig and human / S.E. Dahms; H.J. Piechota; R. Dahiya; T.F. Lue; E.A. Tanagho // *Br. J. Urol.* - 1998. - V. 82. - P. 411–419.

49. Duisit J. Perfusion-decellularization of human ear grafts enables ECM-based scaffolds for auricular vascularized composite tissue engineering / J. Duisit; H. Amiel; T. Wuthrich; A. Taddeo; A. Dedriche; V. Destoop, T. Pardoën; C. Bouzin; V. Joris; D. Mage; E. Vögelin, D. Harriman, C. Dessy, G. Orlando, C. Behets, R. Rieben, P. Gianello, B. Lengelé // *Acta biomater.* - 2018. - V. 73. - P. 339–354.
50. Ebraheim N.A. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: Techniques and complications / N.A. Ebraheim; H. Elgafy; R. Xu. // *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* – 2001. - V. 9. - P. 210–218.
51. El-Kassaby A. Randomized comparative study between buccal mucosal and acellular bladder matrix grafts in complex anterior urethral strictures / A. El-Kassaby, T. Aboushwareb, A. Atala // *J Urol.* - 2008. - V.179. - P.1432-1436.
52. Elliott M.J. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: A 2-year follow-up study / M.J. Elliott; P. De Coppi; S. Spegginorin; D. Roebuck; C.R. Butler; E. Samuel; C. Crowley; C. McLaren; A. Fierens; D. Vondryns, L. Cochrane, C. Jephson, S. Janes, N.J. Beaumont, T. Cogan, A. Bader, A.M. Seifalian, J.J. Hsuan, M.W. Lowdell, M.A. Birchall // *Lancet.* - 2012. - V. 380. - P. 994–1000.
53. Evans D.W. Scale-dependent mechanical properties of native and decellularized liver tissue / D.W. Evans, E.C. Moran, P.M. Baptista, S. Soker, J.L. Sparks // *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology.* 2013. - V.12. - P.569–580.
54. Faulk D.M. Decellularization and cell seeding of whole liver biologic scaffolds composed of extracellular matrix / D.M. Faulk J.D., Wildemann, S.F. Badylak // *Journal of clinical and experimental hepatology.* - 2015. - V.5(1). - P.69-80.
55. Flynn L.E. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells / L.E. Flynn // *Biomaterials.* – 2010. - V. 31. - P. 4715–4724.
56. Fox I.J. Hepatocyte transplantation / I.J. Fox, J. Roy-Chowdhury // *J Hepatol.* - 2004. - V.40. - P.878-886.

57. Fox P.M. Decellularized human tendon-bone grafts for composite flexor tendon reconstruction: A cadaveric model of initial mechanical properties / P.M. Fox; S. Farnebo; D. Lindsey; J. Chang; T. Schmitt; J. Chang // *J. Hand Surg. Am.* - 2013. - V. 38. - P. 2323–2328.
58. Giatsidis G. Preclinical Optimization of a Shelf-Ready, Injectable, Human-Derived, Decellularized Allograft Adipose Matrix / G. Giatsidis; J. Succar; A. Haddad; G. Lago; C. Schaffer; X. Wang; B. Schilling; E. Chnari; H. Matsumine; D.P. Orgill // *Tissue Eng. Part A.* - 2018. - V.3-4. - P. 271-287.
59. Gilbert T.W. Decellularization of tissues and organs / T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak // *Biomaterials.* - 2006. - V.27. - P.3675-3683.
60. Gilpin S.E. Acellular human lung scaffolds to model lung disease and tissue regeneration / S.E. Gilpin; D.E. Wagner // *Eur. Respir. Rev.* – 2018. - V. 27. - P. 180021.
61. Go T. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs / T. Go, P. Jungebluth, S. Baiguero; A. Asnaghi; J. Martorelli; H. Ostertag; S. Mantero; M. Birchall; A. Bader; P. Macchiarini // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* - 2010. - V. 139. - P. 437–443.
62. Gonfiotti A. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results / A. Gonfiotti, M.O. Jaus; D. Barale; S. Baiguera; C. Comin; F. Lavorini; G. Fontana; O. Sibila; G. Rombolà; P. Jungebluth, P. Macchiarini // *Lancet.* - 2014. - V. 383. - P. 238–244.
63. Graham M.E. Development and characterization of decellularized human nasoseptal cartilage matrix for use in tissue engineering / M.E. Graham; P.F. Gratzner; M. Bezuhly; P. Hong // *Laryngoscope.* - 2016. - V. 126. - P. 2226–2231.
64. Grandi F. Composite Scaffolds Based on Intestinal Extracellular Matrices and Oxidized Polyvinyl Alcohol: A Preliminary Study for a New Regenerative Approach in Short Bowel Syndrome / F. Grandi; E. Stocco; S. Barbon; A.

- Rambaldo; M. Contran; Leon F. Fascetti; P. Gamba; P.P. Parnigotto; V. Macchi; R. De Caro; A. Porzionato // *Biomed. Res. Int.* - 2018. - V. 2018. - P. 7824757.
- 65.Griffith L.G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities / L.G. Griffith, G. Naughton // *Science.* - 2002. - V.295. - P.1009-1014.
- 66.Groen W.M. From intricate to integrated: Biofabrication of articulating joints / W.M. Groen; P. Diloksumpan; P.R. van Weeren; R. Levato; J. Malda // *J. Orthop. Res.* - 2017. - V. 35. - P. 2089–2097.
- 67.Hamilton N.J. Tissue-Engineered Tracheal Replacement in a Child: A 4-Year Follow-Up Study / N.J. Hamilton; M. Kanani; D.J. Roebuck; R.J. Hewitt; R. Cetto; E.J. Culme-Seymour; E. Toll; A.J. Bates; A.P. Comerford; C.A. McLaren; C.R. Butler, C. Crowley, D. McIntyre, N.J. Sebire, S.M. Janes, C. O'Callaghan, C. Mason, P. De Coppi, M.W. Lowdell, M.J. Elliott, M.A. Birchall // *Am. J. Transplant.* - 2015. - V. 15. - P. 2750–2777.
- 68.Han T.T. Adipose-derived stromal cells mediate in vivo adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds / T.T. Han; S. Toutounji; B.G. Amsden; L.E. Flynn // *Biomaterials.* - 2015. - V.72. - P. 125–137.
- 69.Haykal S. Advances in tracheal reconstruction / S. Haykal; M. Salna; T.K. Waddell; S.O. Hofer // *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* - 2014. - V. 2. - P. e178.
- 70.He Y. Optimized adipose tissue engineering strategy based on a neo-mechanical processing method / Y. He; M. Lin; X. Wang; J. Guan; Z. Dong; F. Lu; M. Xing; C. Feng; X. Li // *Wound Repair Regen.* - 2018. - V. 26. - P. 163–171.
- 71.Hou Y.-T. Effect of a hepatocyte growth factor / heparinimmobilized collagen system on albumin synthesis and spheroid formation by hepatocytes / Y.-T. Hou, H. Ijima, S. Matsumoto, T. Kubo, T. Takei, S. Sakai, K. Kawakami // *Journal of Bioscience and Bioengineering.* - 2010. - V.110(2). - P.208–216.

72. Huang Z. The Challenge in Using Mesenchymal Stromal Cells for Recellularization of Decellularized Cartilage / Z. Huang; O. Godkin; G. Schulze-Tanzil // *Stem Cell Rev.* - 2017. - V. 13. - P. 50–67.
73. Hung S.H. Preliminary experiences in trachea scaffold tissue engineering with segmental organ decellularization / S.H. Hung; C.H. Su; S.E. Lin; H. Tseng // *Laryngoscope.* - 2016. - V.126. - P. 2520–2527.
74. Hunt T.K. The physiology of wound healing / T.K. Hunt // *Annals of Emergency Medicine.* - 1998. - V.17. - P.1265 – 1273.
75. Hussein K.H. Fabrication of a biodegradable xenoantigen-free rat liver scaffold for potential drug screening applications / K.H. Hussein, K.M. Park, P.K. Teotia, J.W. Yang, H.M. Kim, S.H. Honq, S.R. Yang, I.C. Park, S.M. Park, H.M. Woo // *Transplantation Proceeding.* - 2013. - V.45(8). - P.3092-3096.
76. Kakabadze A. Prospect of using decellularized human placenta and cow placentome for creation of new organs: Targeting the liver (part I: Anatomic study) / A. Kakabadze, Z. Kakabadze // *Transplant. Proc.* - 2015. - V. 47. - P. 1222–1227.
77. Kakabadze Z. Clinical application of decellularized and lyophilized human amnion/chorion membrane grafts for closing post-laryngectomy pharyngocutaneous fistulas / Z. Kakabadze; K. Mardaleishvili; G. Loladze; I. Javakhishvili; K. Chakhunasvili; L. Karalashvili; N. Sukhitashvili; G. Chutkerashvili; A. Kakabadze; D. Chakhunasvili // *J. Surg. Oncol.* - 2016. - V. 113. - P. 538–543.
78. Kang D.W. Decellularization of Human Nasal Septal Cartilage for the Novel Filler Material of Vocal Fold Augmentation / D.W. Kang; S.C. Shin; J.Y. Jang, H.Y. Park; J.C. Lee; S.G. Wang; B.J. Lee // *J. Voice.* - 2017. - V. 31. - P. 127.e1–127.e6.
79. Kappler B. The cytoprotective capacity of processed human cardiac extracellular matrix / B. Kappler; P. Anic; M. Becker; A. Bader; K. Klose; O. Klein; B. Oberwallner; Y.H. Choi; V. Falk; C. Stamm // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2016. - V. 27. - P. 120.

80. Kayabolen A. Native extracellular matrix/fibroin hydrogels for adipose tissue engineering with enhanced vascularization / A. Kayabolen; D. Keskin; A. Aykan; Y. Karslioglu ; F. Zor; A. Tezcaner // *Biomed. Mater.* - 2017. - V. 12. - P. 035007.
81. Kiyotake E.A. Cartilage extracellular matrix as a biomaterial for cartilage regeneration / E.A. Kiyotake; E.C. Beck; M.S. Detamore // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2016. - V. 1383. - P. 139–159.
82. Kobayashi N. Hepatocyte transplantation improves liver function and prolongs survival in rats with decompensated liver cirrhosis / N. Kobayashi, M. Ito, J. Nakamura, J. Cai, J.M. Hammel., I.J. Fox // *Transplantation Proceeding.* – 1999. - V.31. - P.428-429.
83. Korpershoek J.V. Cell-Based Meniscus Repair and Regeneration: At the Brink of Clinical Translation?: A Systematic Review of Preclinical Studies / J.V. Korpershoek; T.S. de Windt; M.H. Hagmeijer; L.A. Vonk; D.B. Saris // *Orthop. J. Sports. Med.* - 2017. - V. 5. - P. 2325967117690131.
84. Kulig K.M. Hepatic tissue engineering / K.M. Kulig, J.P. Vacanti // *Transpl Immunol.* - 2004. - V.12. - P.303–310.
85. Kundu B. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations / B. Kundu, R. Rajkhowa, C.S. Kundu, X. Wang // *Adv Drug Deliv Rev.* - 2013. - V.65. - P.457-470.
86. Lamande S.R. Collagen VI disorders: Insights on form and function in the extracellular matrix and beyond / S.R. Lamande, J.F. Bateman // *Matrix Biol.* - 2018. - V.71-72. - P.348-367.
87. Lee J.S. Liver extracellular matrix providing dual functional of two- dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering / J.S. Lee, J. Shin, H.M. Park, Y.G. Kim, B.G. Kim, J.W. Oh, S.W. Cho // *Biomacromolecules.* - 2014. - V.15(1). - P.206-218.
88. Le W. Ex-vivo Tendon Repair Augmented with Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulated with Myostatin for Tenogenesis / W. Le; A.E.-J. Cheah; J. Yao // *J. Hand Surg. Asian-Pac.* - 2018. - V.5. - 23 P. 47–57.

- 89.Li S. Hybrid Synthetic-Biological Hydrogel System for Adipose Tissue Regeneration / S. Li; J.N. Poche; Y. Liu; T. Scherr; J. McCann; A. Forghani; M. Smoak; M. Muir; L. Berntsen; C. Chen; D.J. Ravnicek; J. Gimble, D.J. Hayes // *Macromol. Biosci.* – 2018. - V. 18. - P. e1800122.
- 90.Liang Y. Chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells on human meniscus-derived decellularized matrix requires exogenous growth factors / Y. Liang; E. Idrees; A.R.A. Szojka; S.H.J. Andrews; M. Kunze; A. Mulet-Sierra; N.M. Jomha; A.B. Adesida // *Acta Biomater.* - 2018. - V. 80. - P. 131–143.
- 91.Londono R. Biological scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling / R. Londono, S.F. Badylak // *Annals of Biomedical Engineering.* - 2015. - V.43(3). - P.577-592.
- 92.Long C. Intratendinous Injection of Hydrogel for Reseeding Decellularized Human Flexor Tendons / C. Long; M.G. Galvez; A. Legrand; L.-M. Joubert; Z. Wang; A. Chattopadhyay; J. Chang; P.M. Fox // *Plast. Reconstr. Surg.* - 2017. - V. 139. - P. 1305e–1314e.
- 93.Lutolf M.P. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering / M.P. Lutolf, J.A. Hubbell // *Nature Biotechnology.* - 2005. - V.23. - P.47–55.
- 94.Ma B. Peaks: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry / B. Ma, K. Zhang, C. Hendrie, C. Liang, M. Li, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie // *Rapid communications in mass spectrometry.* - 2003. - V. 17(20). - P. 2337-2342.
- 95.Macchiarini P. Clinical transplantation of a tissue- engineered airway / P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go, M.A. Asnaghi, L.E. Rees, T.A. Cogan // *Lancet.* – 2008. - V.372. - P.2023-2029.
- 96.Marchesseau S. Fast porous visco-hyperelastic soft tissue model for surgery simulation: application to liver surgery / S. Marchesseau, T. Heimann, S. Chatelin, R. Willinger, H. Delingette // *Prog Biophys Mol Biol.* - 2010. - V.103. - P.185–96.

97. Martinello T. Successful recellularization of human tendon scaffolds using adipose-derived mesenchymal stem cells and collagen gel / T. Martinello; I. Bronzini; A. Volpin; V. Vindigni; L. Maccatrozzo; G. Caporale; F. Bassetto; M. Patruno // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2014. - V.8. - P. 612–619.
98. Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver / A. Martinez-Hernandez, P.S. Amenta // *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* - 1993. - V.423. - P.1-11.
99. Mattei G. Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices / G. Mattei, V. Di Patria, A. Tirella, A. Alaimo, G. Elia, A. Corti, A. Paolicchi, A. Ahluwalia // *Acta Biomaterialia.* - 2014. - V.10(2). - P.875-882.
100. Minehara H. A new technique for seeding chondrocytes onto solvent-preserved human meniscus using the chemokinetic effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 / H. Minehara; K. Urabe; K. Naruse; A.T. Mehlhorn; K. Uchida; N.P. Sudkamp; M. Itoman // *Cell Tissue Bank.* - 2011. - V. 12. - P. 199–207.
101. Mirmalek-Sani S.H. Immunogenicity of decellularized porcine liver for bioengineered hepatic tissue / S.H. Mirmalek-Sani, D.C. Sullivan, C. Zimmerman, T.D. Shupe, B.E. Petersen // *The American Journal of Pathology.* - 2013. - V.183(2). - P.558-65.
102. Moffitt T.P. Mechanical properties of coagulated albumin and failure mechanisms of liver repaired with the use of an argon-beam coagulator with albumin / T.P. Moffitt, D.A. Baker, S.J. Kirkpatrick, S.A. Prah // *Journal of biomedical materials research.* - 2002. - V.63(6). - P.722-728.
103. Mossman T. Rapid colorometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mossman // *J Immunol Methods.* - 1983. - V.65. - P.55-63.
104. Nagao R.J. Decellularized Human Kidney Cortex Hydrogels Enhance Kidney Microvascular Endothelial Cell Maturation and Quiescence / R.J. Nagao;

- J. Xu; P. Luo; J. Xue; Y. Wang; S. Kotha; W. Zeng; X. Fu; J. Himmelfarb; Y. Zheng // *Tissue Eng. Part A.* - 2016. - V. 22. - P. 1140–1150.
105. Nakayama K.H. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering / K.H. Nakayama, C.A. Batchelder, G.E. Lee, A.F. Tarantal // *Tissue Eng Part A.* - 2010. - V.16. - P.2207-2216.
106. Nari G.A. Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers / G.A. Nari, M. Cid, R. Comín, L. Reyna, G. Juri, R. Taborda, N.A. Salvatierra // *Rev Esp Enferm Dig.* - 2013. - V.105(3). - P.138-143.
107. Nasiri B. Fabrication of porous scaffolds with decellularized cartilage matrix for tissue engineering application / B. Nasiri; S. Mashayekhan // *Biologicals.* - 2017. - V. 48. - P. 39–46.
108. Nelson C.M. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer / C.M. Nelson, M.J. Bissell // *Annu Rev Cell Dev Biol.* - 2006. - V.22. - P.287-309.
109. Nikkhah M. Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface / M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, A. Khademhosseini // *Biomaterials.* - 2012. - V.33. - P. 5230–5246.
110. Noor N. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts / N. Noor, A. Shapira, R. Edri, I. Gal, L. Wertheim, T. Dvir // *Adv Sci.* - 2019. - V.6(11). - P.1900344.
111. Nordberg R.C. Enhanced cellular infiltration of human adipose-derived stem cells in allograft menisci using a needle-punch method / R.C. Nordberg; A. Charoenpanich; C.E. Vaughn; E.H. Griffith; M.B. Fisher; J.H. Cole; J.T. Spang; E.G. Loba // *J. Orthop. Surg. Res.* - 2016. - V. 11. - P. 132.
112. Oberwallner B. Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium / B. Oberwallner; A. Brodarac; Y.H. Choi; T. Saric; P. Anić; L. Morawietz; C. Stamm // *J. Biomed. Mater. Res. A.* –

2014. – V.102. – P.3263–3272.
113. Omid E. Characterization and assessment of hyperelastic and elastic properties of decellularized human adipose tissues / E. Omid; L. Fuetterer; S. RezaMousavi; R.C. Armstrong; L.E. Flynn; A. Samani // *J. Biomech.* - 2014. - V. 47. - P. 3657–3663.
114. O’Neill J.D. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering / J.D. O’Neill; R. Anfang; A. Anandappa; J. Costa; J. Javidfar; H.M. Wobma; G. Singh; D.O. Freytes; M.D. Bacchetta; J.R. Sonett; G. Vunjak-Novakovic // *Ann. Thorac. Surg.* - 2013. - V. 96. - P. 1046–1056.
115. Orlando G. Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies / G. Orlando; C. Booth; Z. Wang; G. Totonelli; C.L. Ross; E. Moran; M. Salvatori; P. Maghsoudlou; M. Turmaine; G. Delario; Y. Al-Shraideh, U. Farooq, A.C. Farney, J. Rogers, S.S. Iskandar, A. Burns, F. C. Marini, P. De Coppi, R.J. Stratta, S. Soker // *Biomaterials.* - 2013. - V. 34. - P. 5915–5925.
116. Ott H.C. Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart / H.C. Ott, T.S. Matthiesen, S.K. Goh, L.D. Black, S.M. Kren, T.I. Netoff, D.A. Taylor // *Nat Med.* - 2008. - V.14. - P.213-221.
117. Patil P.B. Recellularization of acellular human small intestine using bone marrow stem cells / P.B. Patil; P.B. Chougule; V.K. Kumar; S. Almström; H. Bäckdahl; D. Banerjee; G. Herlenius; M. Olausson; S. Sumitran-Holgersson // *Stem Cells Transl. Med.* - 2013. - V. 2. - P. 307–315.
118. Pan M.X. An efficient method for decellularization of the rat liver / M.X. Pan, P.Y. Hu, Y. Chenq, L.Q. Cai, X.H. Rao, Y. Wang, Y. Gao // *Journal of the Formosan Medical Association.* - 2014. - V.113(10). - P.680-687.
119. Pei M. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering / M. Pei, J.T. Li, M. Shoukry, Y. Zhang // *European Cell Mater.* - 2011. - V.22. - P.333-343.
120. Peloso A. Renal extracellular matrix scaffolds from discarded kidneys maintain glomerular morphometry and vascular resilience and retains critical

- growth factors / A. Peloso; A. Petrosyan; S. Da Sacco; C. Booth; J.P. Zambon; T. O'Brien; C. Aardema; J. Robertson; R.E. De Filippo; S. Soker; R.J. Stratta, L. Perin, G. Orlando // *Transplantation*. - 2015. - V. 99. - P. 1807–1816.
121. Petersen T.H. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation / T.H. Petersen, E.A. Calle, L. Zhao, E.J. Lee, L. Gui, S. Raredon, K. Gavrilova, T. Yi, Z.W. Zhuang, C. Breuer, E. Herzog, L.E. Niklason // *Science*. - 2010. - V.329(5991). - P.538-541.
122. Pfister O. Regenerative therapy for cardiovascular disease / O. Pfister, G. Della Verde, R. Liao, G.M. Kuster // *Transl Res*. - 2014. - V.163. - P.307-320.
123. Porzionato A. Decellularized omentum as novel biologic scaffold for reconstructive surgery and regenerative medicine / A. Porzionato; M.M. Sfriso; V. Macchi; A. Rambaldo; G. Lago; L. Lancerotto; V. Vindigni; R. De Caro // *Eur. J. Histochem*. - 2013. - V. 24. - P. e4.
124. Porzionato A. Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery / A. Porzionato; M.M. Sfriso; A. Pontini; V. Macchi; L. Petrelli; P.G. Pavan; A.N. Natali; F. Bassetto; V. Vindigni; R. De Caro // *Int. J. Mol. Sci*. - 2015. - V. 16. - P. 14808–14831.
125. Pridgen B. Flexor tendon tissue engineering: Acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility / B. Pridgen; C. Woon; M. Kim; J. Thorfinn; D. Lindsey; H. Pham; J. Chang // *Tissue Eng. Part C*. - 2011. - V. 17. - P. 819–828.
126. Raghavan S.S. Human flexor tendon tissue engineering: Decellularization of human flexor tendons reduces immunogenicity in vivo / S.S.Raghavan; C.Y. Woon; A. Kraus; K. Megerle; M.S. Choi; B.C. Pridgen; H. Pham; J. Chang // *Tissue Eng. Part A*. - 2012. - V. 18. - P. 796–805.
127. Rahma S. Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction / S. Rahma; M. Griffin; A. Naik; M. Szarko; P.E.M. Butler // *Sci. Rep*. - 2018. - V.8. - P. 3097.

128. Ren H. Evaluation of two decellularization methods in the development of a organ decellularized rat liver scaffold / H. Ren, X. Shi, L. Tao, J. Xiao, B. Han, Y. Zhang, X. Yuan, Y. Ding // *Liver Int.* - 2013. - V.33(3). - P.448-58.
129. Ribeiro V.P. Modulating cell adhesion to polybutylene succinate biotextile constructs for tissue engineering applications / V.P. Ribeiro, L.R. Almeida, A.R. Martins, I. Pashkuleva, A.P. Marques, A.S. Ribeiro, C.J. Silva, G. Bonifácio, R.A. Sousa, A.L. Oliveira, R.L. Reis // *J Tissue Eng Regen Med.* - 2017. - V.11(10). - P. 2853-2863.
130. Sackett S.D. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas / S.D. Sackett, D.M. Tremmel, F. Ma, A.K. Feeney, R.M. Maguire, M.E. Brown, Y. Zhou, X. Li, C. O'Brien, L. Li, W.J. Burlingham, J.S. Odorico // *Sci Rep.* - 2018. - V.8(1). - P.10452.
131. Sánchez P.L. Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts / P.L. Sánchez; M.E. Fernández-Santos; S. Costanza; A.M. Climent; I. Moscoso; M.A. Gonzalez-Nicolas; R. Sanz-Ruiz; H. Rodríguez; S.M. Kren; G. Garrido; J.L. Escalante, J. Bermejo, J. Elizaga, J. Menarguez, R. Yotti, C. Pérez del Villar, M.A. Espinosa, M.S. Guillem, J.T. Willerson, A. Bernad, R. Matesanz, D.A. Taylor, F. Fernández-Avilés // *Biomaterials.* - 2015. - V. 61. - P. 279–289.
132. Sandmann G.H. Generation and characterization of a human acellular meniscus scaffold for tissue engineering / G.H. Sandmann; S. Eichhorn; S. Vogt; C. Adamczyk; S. Aryee; M. Hoberg; S. Milz; A.B. Imhoff; T. Tischer // *J. Biomed. Mater. Res. A.* - 2009. - V. 91. - P. 567–574.
133. Schmitt T. Human flexor tendon tissue engineering: In vivo effects of stem cell reseeded / T. Schmitt; P.M. Fox; C.Y. Woon; S.J. Farnebo; J.A. Bronstein; A. Behn; H. Pham; J. Chang // *Plast. Reconstr. Surg.* - 2013. - V. 132. - P. 567e–576e.
134. Schneider C. Systematic Comparison of Protocols for the Preparation of Human Articular Cartilage for Use as Scaffold Material in Cartilage Tissue Engineering / C. Schneider; J. Lehmann; G.J. van Osch; F. Hildner; A. Teuschl;

- X. Monforte; D. Miosga; P. Heimes; E. Priglinger; H. Redl; S. Wolbank, S. Nurnberger // *Tissue Eng. Part C Methods*. - 2016. - V. 22. - P. 1095–1107.
135. Schwartz M.A. Networks and crosstalk: integrin signaling spreads / M.A. Schwartz, M.H. Ginsberg // *Nature Cell Biology*. - 2002. - V.4(4). - P.E65-8.
136. Schwarz S. Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering applications / S. Schwarz; L. Koerber; A.F. Elsaesser; E. Goldberg-Bockhorn; A.M. Seitz; L. Dürselen; A. Ignatius; P. Walther; R. Breiter; N. Rotter // *Tissue Eng. Part A*. - 2012. - V. 18. - P. 2195–2209.
137. Shan Y.H. Silk fibroin/ gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized with astagaloside IV induces healing and anti-scar effects on burn wound / Y.H. Shan, L.H. Penq, X. Liu, X. Chen, J. Xiong, J.Q. Gao // *International Journal of Pharmaceutics*. - 2015. - V.479(2). - P.291-301.
138. Shirakigawa N. Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering / N. Shirakigawa, H. Ijima, T. Takei // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. - 2012. - V.114(5). - P.546-551.
139. Shupe T. Method of the decellularization of intact rat liver / T. Shupe, M. Williams, A. Brown, B. Willenberg, B.E. Petersen // *Organogenesis*. - 2010. - V.6(2). - P.134-136.
140. Sievert K.D. CollagenI:IIIratioin canine heterologous bladder acellular matrix grafts / K.D. Sievert; T. Fandel; J. Wefer; C.A. Gleason; L. Nunes; R. Dahiya; E.A. Tanagho // *World J. Urol.* - 2006. - V. 24. - P. 101–109.
141. Sites A.H. Health resources and services administration / A.H. Sites, H. Delver, A. Care // *Target*. - 2006. - V.256. - P.832-1000.
142. Skover G.R. Cellular and biochemical dynamics of wound repair. Wound environment in collagen regeneration / G.R. Skover // *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*. - 1991. - V.8. - P.723 – 756.
143. Smith C.A. The use of a novel bone allograft wash process to generate a biocompatible, mechanically stable and osteoinductive biological scaffold for use in bone tissue engineering / C.A. Smith; S.M. Richardson; M.J. Eagle; P. Rooney; T. Board; J.A. Hoyland // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2015. - V. 9. - P.

- 595–604.
144. Smith C.A. Human decellularized bone scaffolds from aged donors show improved osteoinductive capacity compared to young donor bone / C.A. Smith; T.N. Board; P. Rooney; M.J. Eagle; S.M. Richardson; J.A. Hoyland // *PLoS ONE*. - 2017. - V. 12. - P. e0177416.
 145. Soffer-Tsur N. Optimizing the biofabrication process of omentum-based scaffolds for engineering autologous tissues / N. Soffer-Tsur; M. Shevach; A. Shapira; D. Peer; T. Dvir // *Biofabrication*. - 2014. - V. 6. - P. 035023.
 146. Song J.J. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney / J.J. Song; J.P. Guyette; S.E. Gilpin; G. Gonzalez; J.P. Vacanti; H.C. Ott // *Nat. Med.* - 2013. - V. 19. - P. 646–651.
 147. Song M. Preparation and characterization of acellular adipose tissue matrix using a combination of physical and chemical treatments / M. Song; Y. Liu; L. Hui // *Mol. Med. Rep.* - 2018. - V. 17. - P. 138–146.
 148. Soto-Gutierrez A. A whole-Organ regenerative medicine approach for liver replacement / A. Soto-Gutierrez, L. Zhang, C. Medberry, K. Fukumitsu, D. Faulk, H. Jiang, J. Reing, R. Gramignoli, J. Komori, M. Ross, M. Nagaya, E. Lagasse, D. Stolz, S.C. Strom, I.J. Fox, S.F. Badylak // *Tissue Engineering*. - 2011. - V.17. - P.677-686.
 149. Stocco E. Tailored PVA/ECM scaffolds for cartilage regeneration / E. Stocco; S. Barbon; D. Dalzoppo; S. Lora; L. Sartore; M. Folin; P.P. Parnigotto; C. Grandi // *Biomed. Res. Int.* - 2014. - V. 2014. - P. 762189.
 150. Strom S. C. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure / S. C. Strom; R. A. Fisher; M. T. Thompson; A. J. Sanyal; P. E. Cole; J. M. Ham; M. P. Posner // *Transplantation*. - 1997. - V.63(4). - P.559–569.
 151. Sutherland A.J. The bioactivity of cartilage extracellular matrix in articular cartilage regeneration / A.J. Sutherland; G.L. Converse; R.A. Hopkins; M.S. Detamore // *Adv. Healthc. Mater.* - 2015. - V. 4. - P. 29–39.

152. Tamura A. Mechanical characterization of porcine abdominal organs / A. Tamura, K. Omori, K. Miki, J.B. Lee, K.H. Yang, A.I. King, // *Stapp Car Crash Journal*. - 2002. - V.46. - P.55–69.
153. Tint D. Spectroscopic Analysis of Human Tracheal Tissue during Decellularization / D. Tint; C.T. Stabler; A. Hanifi; F. Yousefi; G. Linkov; K. Hy; A.M.S. Soliman; N. Pleshko // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* - 2018. - P.194599818806271.
154. Turner A.E. The performance of decellularized adipose tissue microcarriers as an inductive substrate for human adipose-derived stem cells / A.E. Turner; C. Yu; J. Bianco; J.F. Watkins; L.E. Flynn // *Biomaterials*. - 2012. - V.33. - P. 4490–4499.
155. Utomo L. Preparation and characterization of a decellularized cartilage scaffold for ear cartilage reconstruction / L. Utomo; M.M. Pleumeekers; L. Nimeskern; S. Nürnberger; K.S. Stok; F. Hildne; G.J. van Osch // *Biomed. Mater.* - 2015. - V. 10. - P. 015010.
156. Uygun B.E. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix / B.E. Uygun, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, M-L. Izamis, M.A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hert, Y. Nahmias, M.L. Yarmush, K. Uygun // *Nature Medicine*. - 2010. - V.16(7). - P.814–820.
157. Varetas K. Bioburden assessment of banked bone used for allografts / K. Varetas; P. Taylor // *Cell Tissue Bank*. - 2011. - V. 12. - P. 37–43.
158. Vorotnikova E. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo / E. Vorotnikova, D. Mcintosh, A. Dewilde, J. Zhang, J.E. Reing, L. Zhang, K. Cordero, K. Bedelbaeva, D. Gourevitch, E. Heber-Katz, S.F. Badylak, S.J. Braunhut // *Matrix Biol.* - 2010. - V.29(8). - P.690–700.
159. Vracko R. Basal lamina Scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure / R. Vracko // *The American Journal of Pathology*. - 1974. - V.77. - P.314-319.

160. Wagner D.E. Three-dimensional scaffolds of acellular human and porcine lungs for high throughput studies of lung disease and regeneration / D.E. Wagner, N.R. Bonenfant; D. Sokocevic; M.J. DeSarno; Z.D. Borg; C.S. Parsons; E.M. Brooks, J.J. Platz, Z.I. Khalpey; D.M. Hoganson; B. Deng, Y.W. Lam, R.A. Oldinski, T. Ashikaga, D.J. Weiaa, // *Biomaterials*. - 2014. - V. 35. - P. 2664–2679.
161. Wang H.M. Novel biodegradable porous scaffold applied to skin regeneration / H.M. Wang, Y.T. Chou, Z.H. Wen, C.Z. Wang, C.H. Chen, M.L. Ho // *Plos One*. - 2013. - V.8(6). - P.e56330.
162. Wang J.Q. Comparison of in vivo adipogenic capabilities of two different extracellular matrix microparticle scaffolds / J.Q. Wang; J. Fan; J.H. Gao; C. Zhang; S.L. Bai // *Plast. Reconstr. Surg.* - 2013. - V.131. - P. 174e–187e.
163. Wang L. Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering / L. Wang, J.A. Johnson; Q. Zhang; E.K. Beahm // *Acta Biomater.* – 2013. - V. 9. - P. 8921–8931.
164. Wang T. Nanoporous fibers of type-I collagen coated poly(L-lactic acid) for enhancing primary hepatocyte growth and function / T. Wang; Z.-Q. Feng; M. K. Leach; J. Wu; Q. Jiang // *Jouranal of Materials Chemistry B*. - 2013. - V.1.(3). - P.339–346.
165. Wang Y. Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts / Y. Wang, J. Bao, Q. Wu, Y. Zhou, Y. Li, X. Wu, Y. Shi, L. Li, H. Bu // *Xenotransplantation*. - 2015. - V.22(1). - P.48-61.
166. Whitlock P.W. A novel process for optimizing musculoskeletal allograft tissue to improve safety, ultrastructural properties, and cell infiltration / P.W. Whitlock; T.M. Seyler; G.D. Parks; D.A. Ornelles; T.L. Smith; M.E. Van Dyke; G.G. Poehling // *J. Bone Joint Surg. Am.* - 2012. - V.94. - P. 1458–1467.

167. Wildman D.E. Review: Toward an integrated evolutionary understanding of the mammalian placenta / D.E. Wildman // *Placenta*. - 2011. - V. 32. - P. S142–S145.
168. Wilson K. The characterization of decellularized human skeletal muscle as a blueprint for mimetic scaffolds / K. Wilson; A. Terlouw; K. Roberts; J.C. Wolchok // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2016. - V. 27. - P. 125.
169. Wood M.W. Tracheal reconstruction in a canine model / M.W. Wood; S.V. Murphy; X. Feng; S.C. Wright // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* - 2014. - V. 150. - P. 428–433.
170. Woon C.Y.L. Optimization of human tendon tissue engineering: Peracetic acid oxidation for enhanced reseeding of acellularized intrasynovial tendon / C.Y.L. Woon; B. Pridgen; A. Kraus; S. Bari H; Pham.; J. Chang // *Plast. Reconstr. Surg.* - 2011. - V. 127. - P. 1107–1117.
171. Wu I. Aninjectable adipose matrix for soft-tissue reconstruction / I. Wu, Z. Nahas; K.A. Kimmerling; G.D. Rosson; J.H. Elisseeff // *Plast. Reconstr. Surg.* - 2012. - V.129. - P. 1247–1257.
172. Yang Q. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells / Q. Yang; J. Peng; Q. Guo; J. Huang; L. Zhang; J. Yao; F. Yang; S. Wang; W. Xu; A. Wang; S. Lu // *Biomaterials*. - 2008. - V. 29. - P. 2378–2387.
173. Young D.A. Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate / D.A. Young; D.O. Ibrahim; D. Hu; K.L. Christman // *Acta Biomater.* - 2011. - V.7. - P. 1040–1049.
174. Yasui H. Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix / H. Yasui, J.K. Lee, A. Yoshida, T. Yokoyama, H. Nakanishi, K. Miwa, A.T. Naito, T. Oka, H. Akazawa, J. Nakai, S. Miyagawa, Y. Sawa, Y. Sakata, I. Komuro // *Biomaterials*. - 2014. - V.35(27). - P.7839-7850.

175. Yu C. Decellularized adipose tissue microcarriers as a dynamic culture platform for human adipose-derived stem/stromal cell expansion / C. Yu; A. Kornmuller; C. Brown; T. Hoare; L.E. Flynn // *Biomaterials*. - 2017. - V. 120. - P. 66–80.
176. Yu Y.L. Decellularized kidney scaffold-mediated renal regeneration / Y.L. Yu, Y.K. Shao, Y.Q. Ding, K.Z. Lin, B. Chen, H.Z. Zhang, L.N. Zhao, Z.B. Wang, J.S. Zhang, M.L. Tang, J. Mei // *Biomaterials*. - 2014. - V.35(25). - P.6822-6828.
177. Zhang W. Cell-delivery therapeutics for liver regeneration / W. Zhang; L. Tucker-Kellogg; B. C. Narmada; L. Venkatraman; S. Chang; Y. Lu; N. Tan; J. K. White; R. Jia; S. S. Bhowmick; S. Shen; C. F. Dewey; H. Yu // *Advanced Drug Delivery Reviews*. - 2010. - V.62. - P.814–826.
178. Zhou P. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in Mice / P. Zhou, N. Lessa, D. Estrada, E.B. Severson, S. Lingala, M. Zern, J.A. Nolte, J. Wu // *Liver Transplantation*. - 2011. - V.17. - P.418-427.
179. Zuo H. Regeneration of mature dermis by transplanted particulate acellular dermal matrix in a rat model of skin defect wound / H. Zuo, D. Peng, B. Zheng, X. Liu, Y. Wang, L. Wang, X. Zhou, J. Liu // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. - 2012. - V.23(12). - P.2933-2944.
180. Yu Y.L. Decellularized kidney scaffold-mediated renal regeneration / Y.L. Yu, Y.K. Shao, Y.Q. Ding, K.Z. Lin, B. Chen, H.Z. Zhang, L.N. Zhao, Z.B. Wang, J.S. Zhang, M.L. Tang, J. Mei // *Biomaterials*. - 2014. - V.35(25). - P.6822-6828.