

проведенного оперативного вмешательства, что, несомненно, свидетельствует в пользу его высокой эффективности.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. Раздельная закрытая геморроидэктомия по Селиванову сопровождается ранней редукцией отека стенки прямой кишки, увеличивается скорость артериального кровотока в терминальном отделе прямой кишки, после операции интенсивно восстанавливаются сосудистые взаимоотношения, что ускоряет процессы заживления без ущерба для радикальности операции.

2. УЗ-доплерография является информативным методом, позволяющим выявить изменения в ангиоархитектонике терминального отдела прямой кишки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Аминев А. М.* Руководство по проктологии. – Куйбышев: Книжное изд., 1971. – Т. 2. – С. 202.
2. *Благодарный Л. А.* Непосредственные и отдаленные результаты склерозирующего лечения геморроя / Л. А. Благодарный, Ю. А. Шельгин, И. В. Костарев // *Анналы хирургии.* – 2008. – № 3. – С. 76–80.
3. *Воробьев Г. И.* Геморрой / Г. И. Воробьев, Ю. А. Шельгин, Л. А. Благодарный. – Москва: «Литттера», 2010. – 192 с.
4. *Науен Д. Т.* Дифференцированный подход к хирургическому лечению хронического геморроя II–III степени в зависи-

мости от стадии патологического процесса / В. И. Мидленко, Д. Т. Нгуен, Е. Г. Евтушенко, А. А. Карташев // *Фундаментальные исследования.* – 2012. – № 12 (2). – С. 309–313.

5. *Орлова Л. П.* Ультразвуковой метод в оценке эффективности лечения больных геморроем / Л. П. Орлова, О. А. Зарезаев // *SonoAce-Ultrasound.* – 2006. – № 14. – С. 26–28.

6. *Пироговский В. Ю.* Трансанальная геморроидальная деартериализация как метод лечения хронического геморроя / В. Ю. Пироговский и др. // URL <http://www.likar.info/pro/article-53921-transanalnaya-gemorroidalnaya-dearterializatsiya-kak-metod-lecheniya-hronicheskogo-gemorroya>.

7. *Ривкин В. Л.* Геморрой. Запоры / В. Л. Ривкин, Л. Л. Капуллер. – М.: Медпрактика, 2000. – 160 с.

8. *Рустамова А. Б.* Геморрой – современный взгляд на проблему // *Укр. ж. клін. та лабор. медицини.* – 2013. – № 2. – С. 9–11.

9. Способ геморроидэктомии по Селиванову: пат. 82344. Украина: МПК А61 В 17/00 / А. В. Селиванов, П. Н. Колбасин, С. Н. Леоненко; заявители и патентообладатели А. В. Селиванов, П. Н. Колбасин, С. Н. Леоненко. – № u201302599; заявл. 01.03.13; опубл. 25.07.13, Бюл. № 14.

10. Hemorrhoid disease. physiopathology, etiopathology and surgical approach / M. Faccini (et al.) // *Minerva chir.* – 2000. – Vol. 55. № 4. – P. 253–259.

11. *Odze R. D.* Surgical Pathology of the GI tract, liver, biliary tract and pancreas: Expert consult / R. D. Odze, J. R. Goldblum. – Hardcover: Online and Print, 2009. – 2 ed.

Поступила 05.02.2015

*А. С. СОТНИЧЕНКО<sup>1,2</sup>, А. А. СЛАВИНСКИЙ<sup>1</sup>, И. В. ГИЛЕВИЧ<sup>2</sup>, Е. В. КУЕВДА<sup>2</sup>,  
И. С. ГУМЕНЮК<sup>2</sup>, Е. А. ГУБАРЕВА<sup>2</sup>, П. МАККИАРИНИ<sup>2</sup>*

## СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫМ МАТРИКСОМ СЕРДЦА КРЫСЫ

<sup>1</sup>*Кафедра патологической анатомии,*

<sup>2</sup>*международный научно-исследовательский клиничко-образовательный центр  
регенеративной медицины Кубанского государственного медицинского университета,  
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. E-mail: alex24.88@mail.ru*

В статье представлены данные исследования структурного взаимодействия децеллюляризованного матрикса сердца крысы со стволовыми клетками, использованными для его рецеллюляризации, оценено влияние децеллюляризованного каркаса на потенциальную способность клеток к дифференцировке без использования факторов роста. Проведен морфологический анализ рецеллюляризованного матрикса. Влияние каркаса на пролиферативную способность клеток в процессе рецеллюляризации оценивали посредством иммуногистохимического анализа. Жизнеспособность клеток на каркасе определяли при проведении колориметрического теста с МТТ-реагентом.

*Ключевые слова:* децеллюляризация, рецеллюляризация, сердце, стволовые клетки, тканевая инженерия.

*А. С. СОТНИЧЕНКО<sup>1,2</sup>, А. А. СЛАВИНСКИЙ<sup>1</sup>, И. В. ГИЛЕВИЧ<sup>2</sup>, Е. В. КУЕВДА<sup>2</sup>,  
И. С. ГУМЕНЮК<sup>2</sup>, Е. А. ГУБАРЕВА<sup>2</sup>, П. МАККИАРИНИ<sup>2</sup>*

# STRUCTURAL BASIS OF INTERACTION BETWEEN MESENCHYMAL STEM CELLS AND DECELLULARIZED RAT HEART MATRIX

<sup>1</sup>Department of pathological anatomy

<sup>2</sup>International research, clinical and education center of regenerative medicine of Kuban state medical university,

Russia, 350063, Krasnodar, street Sedina, 4. E-mail: alex24.88@mail.ru

The study presents data about structural interaction between decellularized rat heart matrix and stem cells used for recellularization. The effect of decellularized scaffold influence on the potential cells ability for differentiation without growth factors was evaluated. Morphological analysis of recellularized rat heart matrix was conducted. Rat heart scaffold influence on the proliferative cells capacity during recellularization process was assessed by immunohistochemical analysis. Cell viability on the scaffold was determined by the colorimetric test with MTT-reagent.

*Key words:* decellularization, recellularization, heart, stem cells, tissue engineering.

Сердечно-сосудистые заболевания – основная причина инвалидизации и преждевременной смерти жителей экономически развитых стран. Рост заболеваемости, поражение людей всё более молодого возраста делают эти болезни важнейшей медико-социальной проблемой здравоохранения [5, 9]. Хроническая сердечная недостаточность – одно из самых частых осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы [4]. Количество больных, которые достигают терминальной стадии сердечной недостаточности, постоянно растет. Ортопическая трансплантация сердца – единственный радикальный хирургический метод лечения больных в терминальной стадии сердечной недостаточности [1]. Каждый год в мире, по данным ВОЗ, проводится более 5400 операций по пересадке сердца. Тем не менее органная трансплантация, достоинством которой, несомненно, являются технически отработанная методика и ее широкое внедрение в клиническую практику, имеет ряд недостатков, таких как острая нехватка донорских органов, трудности их транспортировки, сложность и экстренный характер подобных операций, развитие реакций отторжения, болезни «трансплантат против хозяина», возможность развития инфекционных осложнений, а также необходимость пожизненной иммуносупрессивной терапии [2, 8]. Выход из сложившейся ситуации представляется в создании искусственного органа методами тканевой инженерии.

Тканевая инженерия – молодая отрасль медицинских наук, разрабатывающая проблему создания биоинженерных органов. На сегодняшний день стратегии тканевой инженерии таковы: 1) отбор и культивирование собственных или донорских стволовых клеток; 2) разработка специального носителя для клеток (матрицы) на основе биосовместимых материалов; 3) нанесение культуры клеток на матрицу и размножение клеток в биореакторе со специальными

условиями культивирования; 4) непосредственное внедрение тканеинженерной конструкции в область пораженного органа или предварительное размещение в области, хорошо снабжаемой кровью, для созревания и формирования микроциркуляции внутри конструкции (префабрикация) [10, 11].

Для создания подходящего каркаса биоинженерного сердца необходимо воссоздание структуры, сходной с нативной, с развитой сосудистой сетью; способность клеток, используемых при рецеллюляризации каркаса дифференцироваться во все паренхиматозные и сосудистые структуры органа; наличие возможности управления микроокружением клеток для воздействия на их физиологию и функции; а также возможность управления дифференцировкой и созреванием клеток *in vitro* [12].

В современной научной литературе морфологические свойства децеллюляризованных матриц сердца и механизмы их взаимодействия со стволовыми клетками представлены не в полной мере. Всесторонняя морфологическая оценка получаемых биоинженерных конструкций позволит расширить наши представления о составе и строении децеллюляризованных матриц, аспектах дифференцировки стволовых клеток и их взаимодействия с тканеинженерными каркасами.

## **Материалы и методы исследования**

Эксперименты в лаборатории Международного научно-исследовательского клиничко-образовательного центра регенеративной медицины на базе Кубанского государственного медицинского университета проводили после одобрения протоколов исследования локальным этическим комитетом. Децеллюляризация сердец 20 взрослых беспородных крыс-самцов весом  $220 \pm 35$  г проводилась по описанной нами ранее методике [3, 7]. Для рецеллюляризации сердечного матрикса были использованы

мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (ММСК), полученные по стандартному протоколу [6].

### МТТ-тест (колориметрический анализ)

Колориметрический анализ с 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетраразолом (МТТ-тест, Cell Proliferation Kit I, «Roche», Австралия) был использован для определения жизнеспособности клеток, засеянных на децеллюляризованный каркас сердца крысы. После 50 ч инкубации ММСК в 96-луночной планшете на каркасе сердца в каждую лунку добавляли по 50 мкл субстрата МТТ и инкубировали в течение 4 ч при 37° С, затем по 500 мкл 10%-ного раствора додецилсульфата натрия (SDS) в 0,01 М HCl и инкубировали в течение ночи при 37° С. Образцы переносили в другой 96-луночный планшет и производили колориметрический анализ с помощью спектрофотометра («SpectraMax 250», «Molecular Devices», США).

### Рецеллюляризация целого органа

Децеллюляризованные сердца помещали в биореактор («Harvard Apparatus», США) и стерилизовали путем ретроградной перфузии через аорту 10%-ным этанолом в фосфатном буфере в течение 15 минут, затем трижды в течение 60 минут перфузировали раствором фосфатного буфера («Gibco», Англия), содержащим 1%-ный раствор антибиотика-антимикотика. И, наконец, перфузировали культуральной средой для ММСК в течение трех часов. Затем вводили клеточную суспензию: 20 млн. клеток растворяли в 200 мл культуральной среды и вводили со скоростью 0,5 мл/мин в аорту. Смену среды производили каждые 2 дня. Общая продолжительность рецеллюляризации составляла от 7 до 18 дней.

### Морфологический анализ

Образцы рецеллюляризованных сердец фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине, дегидратировали и заключали в парафин автоматическим методом, далее получали парафиновые срезы толщиной 5 мкм. С целью гистологической оценки препаратов проводили окрашивание срезов гематоксилином и эозином («Histolab», Швеция). Также нами был проведен иммуногистохимический анализ. В качестве первичных были выбраны поликлональные антитела к МНС I типа (ab22367 Abcam, Англия), Ki-67 (ab16667 Abcam, Англия), VEGF (ab46154 Abcam, Англия), фактору фон Виллебранда (ab46154 Abcam, Англия), α-гладкомышечному актину (ab3280 Abcam, Англия), коннексину 43 (ab11370 Abcam, Англия).

## Результаты исследования и их обсуждение

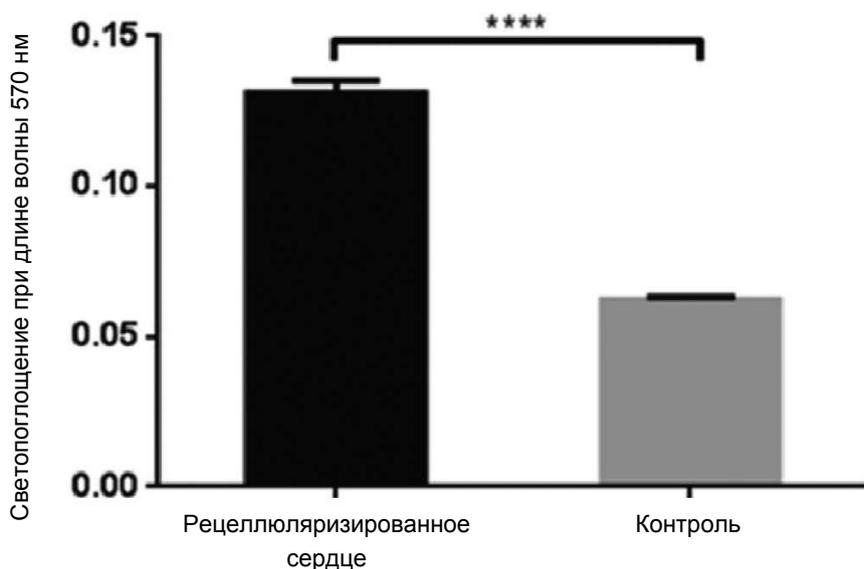
Для проведения рецеллюляризации были выбраны ММСК в связи с высокой доступностью и безопасностью клеточных ресурсов, а также возможностью оценить способность децеллюляризованного каркаса сердца специфически влиять на индукцию дифференцировки клеток. Нами учитывалось и то, что выбранные клетки должны быть выделены в большом количестве во взрослом организме, так как в будущем подобная методика создания тканеинженерного сердца может быть транслирована для исследований на крупных лабораторных животных.

Рецеллюляризацию матрикса производили двумя способами. На начальном этапе децеллюляризованные образцы размером до 8 мм в диаметре статично засеивали в культуральных планшетах в течение 3 дней для последующего проведения гистологического анализа, МТТ-теста. Это не требовало использования большого числа клеток, но позволило получить необходимые данные о клеточной адгезии к матриксу и его цитотоксичности. Далее децеллюляризованный каркас рецеллюляризовали полностью с применением методики интравазального введения клеточной суспензии для получения структуры, подобной нативному органу, с последующей ее морфологической оценкой, анализом распределения ММСК внутри каркаса сердца и его влияния на индукцию клеточной дифференцировки.

При окрашивании гематоксилином и эозином статично рецеллюляризованных в течение 3 дней образцов было установлено, что клетки прикрепилась к каркасу, образовав на нем 1–2 слоя, без миграции в толщу образца (данные не представлены).

МТТ-тест – колориметрический метод определения жизнеспособности клеточных структур, основанный на способности дегидрогеназ живых клеток изменять качественный состав и окраску реагентов, проведенный после рецеллюляризации матрикса сердца, показал наличие живых клеток на рецеллюляризованном сердечном матриксе и метаболической активности в них (рис. 1). В негативных контролях образования МТТ-формаза не происходило.

После экспериментов по статичной рецеллюляризации начинали рецеллюляризацию каркаса целого органа в биореакторе, время которой составляло от 1 до 3 недель. В первые дни рецеллюляризации сердце приобретало нежно-розовый цвет за счет окрашивания каркаса культуральной средой, содержащей клетки, но оставалось прозрачным. Однако по мере культивирования рецеллюляризованного каркаса сердца в биореакторе он становился все менее прозрачным, приобретая «мясистый» оттенок к концу первой недели (рис. 2).



**Рис. 1.** Оценка жизнеспособности ММСК, засеянных на децеллюляризованный каркас сердца крысы. МТТ-тест. \*\*\*\* –  $P < 0,0001$

Окраска микропрепаратов рецеллюляризованного сердца крысы гематоксилином и эозином, проведенная после интравазальной рецеллюляризации целого органа перфузионным методом, показала, что клетки способны заселять все камеры сердца. Они образовывали 1–2 слоя на внутренней поверхности всех камер и перегородки сердца, на базальной мембране коронарных сосудов, а также мигрировали внутрь стенки каркаса, располагаясь в ней диффузно (рис. 3).

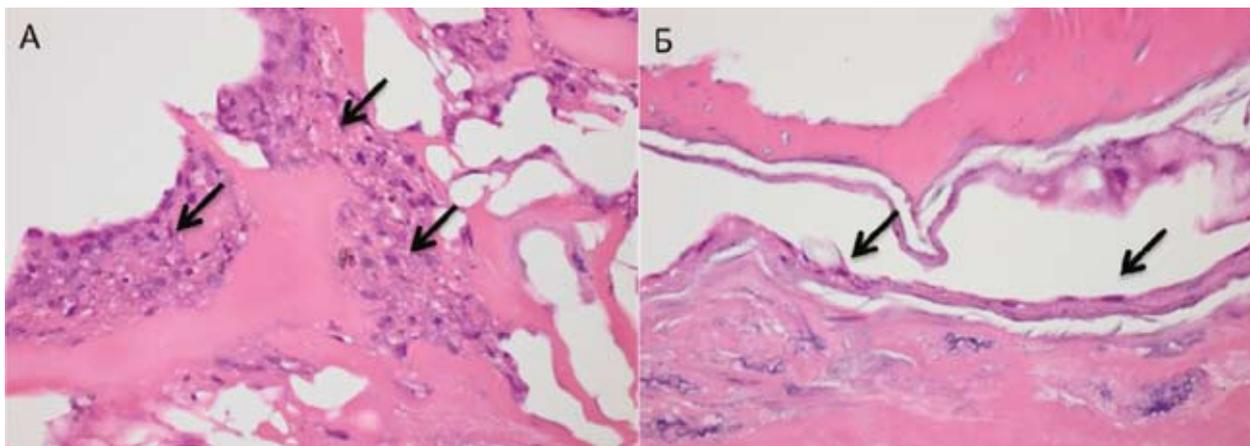
По результатам проведенных исследований было предположено, что, во-первых, клетки ока-

зались способными прикрепиться к полученному матриксу, во-вторых, каркас не обладает цитотоксическим действием на мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, и, в-третьих, клетки остаются жизнеспособными и сохраняют свою метаболическую активность при культивировании на каркасе.

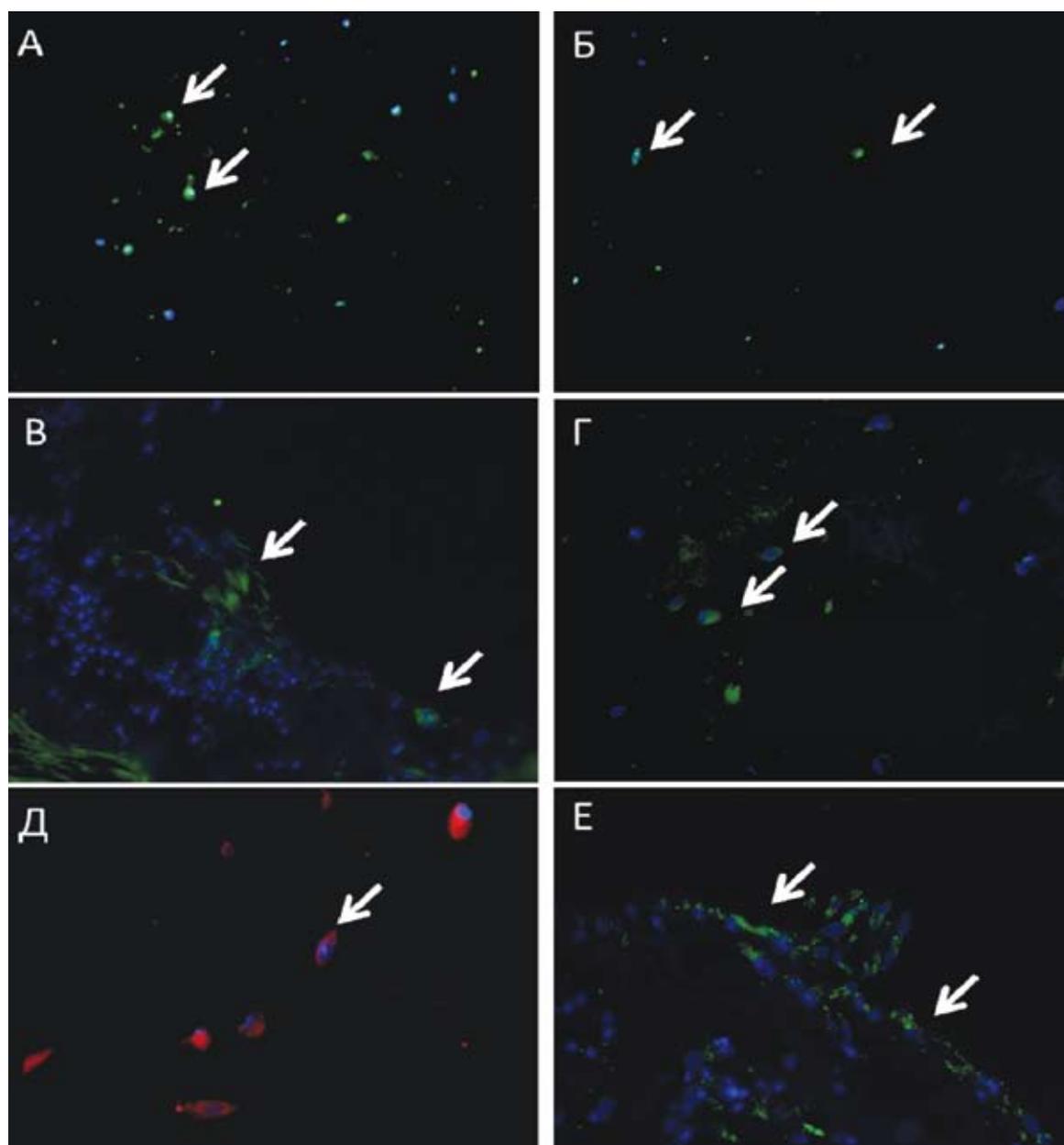
Иммуногистохимический анализ рецеллюляризованного каркаса проводили с целью определения влияния матрикса на пролиферативную способность клеток. Ввиду того что в процессе рецеллюляризации не использовали факторы роста и дифференцировочные среды, было



**Рис. 2.** Сердце крысы после рецеллюляризации. Биореактор



**Рис. 3.** Рецеллюляризированное сердце крысы. А – ММСК в толще стромы сердца (стрелки).  
 Б – ММСК в 1–2 слоя выстилают внутреннюю поверхность коронарной артерии (стрелки).  
 Гематоксилин и эозин. Увеличение: об. x40, ок x10



**Рис. 4.** Рецеллюляризированное сердце крысы. Иммуногистохимическая реакция (обозначена стрелками) с антителами МНС I (А), Ki-67 (Б), VEGF (В), фактору фон Виллебранда (Г), α-гладкомышечному актину (Д), коннексину 43 (Е). Увеличение: А–В об. x10, ок. x10; Г–Е об. x40, ок. x10

оценено влияние децеллюляризованного матрикса на возможность спонтанной дифференцировки ММСК в более зрелые клеточные линии.

Так, при помощи иммуногистохимического исследования была выявлена положительная реакция клеток с антителами к поверхностному антигену всех соматических клеток МНС I типа (рис. 4 А). Обнаруженные клетки в рецеллюляризованном матриксе обладали пролиферативной активностью, что доказывало наличие флуоресценции клеточных ядер с антителами к маркеру пролиферации – Ki-67 (индекс пролиферации составил 10%; рис. 4 Б). Кроме того, в рецеллюляризованном внеклеточном матриксе, а также в некоторых клетках была обнаружена положительная экспрессия эндотелиального фактора роста сосудов – VEGF (рис. 4 В.). Ряд клеток имел позитивную реакцию с фактором фон Виллебранда, что говорит о потенциальной возможности образования в рецеллюляризованном матриксе новых сосудов и дифференцировке ММСК в эндотелиальные клетки (рис. 4 Г).

Потенциальная способность к мышечной дифференцировке ММСК после культивирования на децеллюляризованном матриксе подтверждалась положительной реакцией клеток с антителами к сократительному белку  $\alpha$ -гладкомышечному актину и коннексину-43 – основному коннексину щелевых контактов в сердце, играющему критическую роль в эмбриональном развитии сердечной мышечной ткани (рис. 4 Д, Е).

Таким образом, результаты рецеллюляризации предварительно децеллюляризованного сердца крысы показывают, что получаемый каркас не является токсичным для клеток. Используемые нами мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки являются стволовыми клетками, имеющимися во взрослом организме в постнатальный период. Эти клетки имеют меньший, чем у эмбриональных стволовых клеток, дифференцировочный потенциал. Тем не менее иммуногистохимический анализ показал возможность эндотелиальной и мышечной дифференцировки мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток, засеянных на децеллюляризованный при помощи модифицированного детергент-энзиматического протокола каркас сердца крысы.

### Благодарности

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

сионального образования, от 19 октября 2011 г. № 11.G34.31.0065.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Барбухатти А. О., Космачева Е. Д., Кижватова Н. В., Гордеева Е. В., Александрова Е. Д., Круберга Л. К., Позднякова О. А., Рафф С. А., Якуба И. И., Порханов В. А. Первый опыт трансплантации сердца в Краснодарском крае // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 14. № 3. – С. 42–47.
2. Бокерия Л. А., Колоскова Н. Н. Критерии отбора больных для формирования листа ожидания на трансплантацию сердца (обзор литературы). Новости науки и техники. Серия: Медицина // Сердечно-сосудистая хирургия. – 2012. – № 1. – С. 31–41.
3. Губарева Е. А., Сотниченко А. С., Гилевич И. В., Маккиарини П. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. № 4. – С. 20–27.
4. Крылова Н. С., Авдеева Е. В., Потешкина Н. Г. Хроническая сердечная недостаточность у больных гипертрофической кардиомиопатией // Российский кардиологический журнал. – 2011. – № 2. – С. 26–32.
5. Ситникова М. Ю., Лясникова Е. А., Трушкина М. А. Хроническая сердечная недостаточность: эпидемиология и перспективы планирования // Сердечная недостаточность. – 2012. – Т. 13. № 6. – С. 372–376.
6. Сотниченко А. С., Губарева Е. А., Гилевич И. В., Кувееда Е. В., Крашенинников С. В., Григорьев Т. Е., Чвалун С. Н., Маккиарини П. Децеллюляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8. № 3. – С. 86–94.
7. Сотниченко А. С., Славинский А. А., Гилевич И. В., Кувееда Е. В., Гуменюк И. С., Губарева Е. А., Маккиарини П. Патоморфологическая характеристика матрикса тканеинженерного сердца крысы // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2; URL: [www.science-education.ru/122-17629](http://www.science-education.ru/122-17629)
8. Салютин Р. В., Паляница С. С., Давидова Т. И., Соколов Н. Ф. Определение иммунологических показателей качества трансплантата сердца человека донора-трупа // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2013. – № 4. – С. 83–86.
9. Фролова Э. Б., Яушев М. Ф. Современное представление о хронической сердечной недостаточности // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – Т. 6. № 2.
10. Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends. – 2005.
11. Saxena A. K., Amulya K. Tissue engineering: Present concepts and strategies // Journal of Indian association of pediatric surgeons. – 2005. – Vol. 10. № 1. – P. 14.
12. Taylor D. A. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs // Current opinion in biotechnology. – 2009. – Vol. 20. № 5. – P. 598–605.

Поступила 02.03.2015