

ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ СОСУДИСТЫЕ ТРАНСПЛАНТАТЫ

© В. Н. Александров¹, Г. Г. Хубулава², В. В. Леванович¹

¹ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;

²ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны России, Санкт-Петербург

Резюме. Не вызывает сомнений, что предпосылкой успехов реконструктивной ангиохирургии было внедрение в сосудистую хирургию синтетических материалов. Биологическая инертность, прочность, простота стерилизации и легкость моделирования синтетических протезов сосудов способствовали их широкому применению, как при протезировании аорты, так и магистральных сосудов. Однако анализ накопленного клинического опыта использования синтетических протезов показал, что увлечение ими постепенно сменилось сдержанным отношением, а порой и отказом, ибо синтетические сосудистые протезы, при наличии известных достоинств, склонны к тромбообразованию, развитию инфекции [15]. В этой связи ведется поиск схем антикоагулянтной, антибактериальной терапии и путей создания протезов, минимизирующих риск тромбообразования и развития инфекционных осложнений. К одному из таких путей не без основания относят тканевую инженерию, позволяющую на основе применения принципов и методов инженерии и биологии создавать биологические заместители тканей и органов. Тканеинженерные сосудистые трансплантаты (ТИСТ), созданные на основе естественного бесклеточного аллогенного или ксеногенного сосудистого каркаса, заселенного клетками пациента, то есть персонализированные, будут биосовместимы, атромбогенны, лишены иных недостатков синтетических протезов [1, 29]. Как биосовместимые продукты, они будут способны к росту и пригодны не только для взрослых, но и для детей с сердечно-сосудистыми дефектами. Однако ряд вопросов, связанных с поиском оптимальных условий получения ТИСТ, остается открытым.

Ключевые слова: тканевая инженерия; сосуд; децеллюляризация; внеклеточный матрикс; механические свойства.

TISSUE-ENGINEERED VASCULAR GRAFTS

© V. N. Aleksandrov¹, G. G. Khubulava², V. V. Levanovich¹

¹Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Russia;

²Russian Medicomilitary Academy, Russia

Abstract. There is no doubt that the introduction of synthetic materials was the prerequisite for success of vascular surgery. Biological inertness, durability, eases of sterilization and modeling of synthetic vascular grafts contributed to their widespread use as in aortic and great vessels. However, analysis of the accumulated clinical experience in using of synthetic grafts showed that fascination with them was gradually replaced by cautious attitude, and sometimes by refusing, because in the presence of well-known advantages, synthetic grafts are prone to thrombosis and the development of infection. Thereby, it takes place searching of anticoagulant and antibiotic therapy schemes, and the ways of creation of such grafts which will minimize the risk of thrombus formation and the development of infectious complications. Not without reason one of such ways includes tissue engineering, which allows to create substitute for biological tissues and organs using the principles and methods of engineering and biology. Tissue engineering vascular grafts (TIVG), created on the basis of natural acellular allogeneic or xenogeneic vascular matrices and populated with patient cells, so personalized, are thought to be biocompatible, athrombogenic, and deprived of any deficiencies of synthetic grafts. Being biocompatible products, they will be able to grow and will be suitable not only for adults but also for children with cardiovascular defects. However, a number of questions related to the search of optimal conditions for obtaining TIVG remain open.

Key words: tissue engineering; vessel; decellularization; extracellular matrix; mechanical properties.

Синтетические сосудистые протезы при наличии известных достоинств склонны к тромбообразованию, развитию инфекции [15]. В этой связи ведется поиск схем антикоагулянтной, антибактериальной терапии, и путей, исключающих использование подобных протезов. Заменить протезы можно разрабатываемыми тканеинженерными сосудистыми трансплантатами (ТИСТ). Созданные на основе

естественного бесклеточного аллогенного или ксеногенного сосудистого каркаса, заселенного клетками пациента, то есть персонализированные, они будут биосовместимы, атромбогенны, лишены иных недостатков синтетических протезов [1, 29]. Как биосовместимые продукты, они будут способны к росту и пригодны не только для взрослых, но и для детей с сердечно-сосудистыми дефектами.

Однако методологические проблемы тканевой инженерии сосудов, касающиеся условий получения ТИСТ и испытаний на предмет функциональной долговечности, требуют своего решения.

Применение клеточных технологий в инженерии сосудистых протезов предполагает получение в качестве конечного продукта персонифицированного биологически совместимого сосуда. Такой сосуд включает иммунологически толерантный биоматрикс (каркас сосуда) и клетки пациента, засеянные на него. Иммунологически толерантный каркас сосуда получают методом децеллюляризации [25], предусматривающим полное удаление клеток донорского сосуда при оптимальной сохранности его межклеточного матрикса (МКМ).

Существуют методы химической и физической децеллюляризации. Для химической децеллюляризации используют детергенты: додецилсульфат натрия (SDS) [1, 18, 19, 26], этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) [15, 25, 26], дезоксихолат натрия [14, 24, 26], тертоктилфенилполиоксиэтилен (тритон-X100) [1, 6, 14, 24], CHAPS (3-[3-холамидопропил]-диметиламмонио]-1-пропансульфон [10, 25], ферменты: трипсин [15, 20, 26], ДНКаза/РНКаза [1, 15, 20, 26] в различных их комбинациях, концентрациях и режимах перфузии. Среди методов физической децеллюляризации интерес представляет метод, основанный на разрушении клеток вследствие острой декомпрессии при быстром снижении исходно заданного высокого гидростатического давления (ВГД). Уникальность метода состоит в равномерном разрушении мембран клеток ткани, коротком времени обработки и стерилизующем эффекте ВГД. Для изготовления каркасов этим способом сосуд, погруженный в герметичный мешок с консервирующим раствором, подвергают 10-минутной экспозиции при давлении 980 МПа. Клеточные остатки, образующиеся после декомпрессии, удаляют промыванием, получая децеллюляризованный, с необходимыми механическими свойствами, тромборезистентный и без склонности к кальцификации каркас.

Сравнительная оценка каркасов, полученных разными методами децеллюляризации, на предмет отсутствия клеток и сохранности МКМ (как непременных условий иммунологической толерантности и успешности рецеллюляризации) обнаруживает значительные различия. Использование трипсина или неионного детергента тритона-X100 с последующим перевариванием нуклеазой не элиминирует все клетки, сохраняя риск иммунного ответа и кальцификации ТИСТ при его трансплантации реципиенту. Более длительная инкубация с трипсином эффективнее удаляет клетки, но нарушает структуру МКМ. Обработка SDS дестабилизирует тройной

спиральный домен коллагена и эластиновую сеть, что вместе с остатками детергента (при не надлежащей отмывке) лимитирует эффективность рецеллюляризации. Обработка тритоном-X100 и дезоксихолатом натрия с последующей промывкой средой M199 с добавлением нуклеаз (для удаления остатков нуклеиновых кислот) удаляет все клеточные компоненты аорты, не влияя на структурную целостность эластина, ламина, коллагена, то есть сигнальных молекул МКМ, необходимых для сайт-специфического приживления и/или дифференцировки сосудоспецифических клеток. Таким образом, протокол оказывается достаточным для получения каркаса и его последующей рецеллюляризации [26], а трехмерная структура каркаса — для ремоделирования ТИСТ после имплантации [6]. Аналогичный результат получен и при использовании описанного выше физического метода.

Бесклеточный интактный каркас, полученный путем успешной децеллюляризации, может быть тут же пересажен реципиенту без риска тромбообразования и иных осложнений. Децеллюляризованный детергентами U-образный каркас аорты взрослой крысы (200–250 г), вшитый конец в бок в инфразональную аорту молодой крысы (70–80 г), через 8 недель по данным МРТ и доплерографии был полностью проходим. При гистологическом исследовании реэксплантированных отмечено полное эндотелиальное покрытие, целостность коллагеновых и эластических волокон средней оболочки [2]. Каркас аорты свиньи, полученный декомпрессионной децеллюляризацией, был трансплантирован на место резецированной части брюшной аорты свиньи-реципиента. Как показали авторы [9], каркас выдерживал артериальное давление без дилатации, был тромборезистентен, иммунологически толерантен. Через 4 недели после имплантации в нем сформировался монослой в результате хоминга эндотелиальных клеток (ЭК). Каркас сонной артерии крысы, полученный декомпрессионной децеллюляризацией, отмытый от остатков клеток средой ЕВМ-2 с ДНКазой и гепарином, через две недели после аллогенной трансплантации был проходим и покрыт эндотелием. Однако это имело место, когда температура среды отмывания протеза от клеточных остатков была 4 °С. После обработки подвергнутых декомпрессионной децеллюляризации сонных артерий крыс средой с температурой 37 °С спектральный анализ показал уменьшение количества коллагена в каркасе артерии и появление структурных изменений его тройной спирали. Последнее обстоятельство, по мнению исследователей [24], и предопределило развитие тромбоза каркаса через две недели после его трансплантации, хотя ЭК прикреплялись и пролиферировали на люминаль-

ной поверхности каркасов обоих типов. Протезы децеллюларизованной пуповинной артерии, вшитые «конец-в-конец» в брюшную аорту крыс NUDE, поддерживали активную эндотелизацию только в 55% случаев. Все трансплантаты у выживших крыс в течение 8-недельного наблюдения остались проходимы, имели постоянный диаметр, не имели разрывов и аневризм [10].

Таким образом, очевидно, МКМ тромборезистентен, в отличие от бытующего представления, но теряет это свойство при альтерации, порой даже едва уловимой [24]. Это создает риск тромбоза трансплантированного протеза. В трансплантированном крысе бесклеточном каркасе аорты через 8 недель наблюдали признаки ремоделирования (накопление коллагена, ЭК, гладких мышечных клеток), однако репопуляция эндотелия не достигала достаточного для профилактики тромбоза уровня [14]. Иначе развиваются события при трансплантации каркаса сосуда, заселенного клетками. Такие ТИСТ, заселенные аутологичными гладкими мышечными клетками (ГМК) и ЭК через 18 недель после имплантации, были проходимы, без признаков тромбоза, дилатации или стеноза. В гистологических срезах извлеченных трансплантатов отмечена высокая клеточность интимы, признаки регенерации средней, наружной оболочек. В равной мере сказанное касается и биоинженерии клапанного аппарата сердца. Децеллюларизованные клапаны легочной артерии свиньи, засеянные клетками (ЭК и миофибробласти), предифференцированными из костного мозга собаки, меченные флуоресцирующим белком, и имплантированные в легочную артерию собак, через 1 и 3 недели после имплантации имели нормальную морфологию и были интегрированы с тканями хозяина. При гистологическом исследовании идентифицирована регенерация клапанных структур, состоящих из ЭК-подобных клеток, экспрессирующих маркеры ЭК (vWF, CD31), и миофибробластоподобных клеток, экспрессирующих α -SMA. Флуоресцентно меченные клетки выявлены на поверхности и в интерстиции створок клапана, свидетельствуя об их вкладе в регенерацию тканей клапана [28]. Поэтому, судя о значимости клеточного компонента в биоинженерии ТИСТ, следующим этапом (после децеллюляризации) на пути получения биоинженерного сосуда является рецеллюляризация каркаса *in vitro*.

Децеллюларизованный сосуд засевают аутологичными клетками, взаимодействие которых с белками МКМ по типу лиганд-рецепторного взаимодействия инициирует их пролиферацию, дифференцировку и восстановление интимы в процессе культивирования *in vitro*. Посев клеток в биореакторе, имитирующем пульсирующий поток крови с из-

вестным газовым составом и гемодинамикой, предопределяет превосходную сохранность каркаса и, как следствие, высокую его восприимчивость к рецеллюляризации. Формирование эндотелия на каркасе отличается устойчивостью связей клетка-матрикс и клетка-клетка, способных выдержать сдвиг напряжения потока крови, сопряженный с риском открытия клеток и окклюзией трансплантата [18, 26]. Такие ТИСТ сохраняли проходимость в течение 130 дней наблюдения за овцами-реципиентами [16].

Идеально, когда клетки для рецеллюляризации соответствуют клеточному составу заданного сосуда и, очевидно, их соотношению, неодинаковому в сосудах разного типа. Для аорты среди специализированных клеток это преимущественно эндотелиоциты [16, 17, 26] и ГМК, как секреторные, так и контракtilльные [6, 12, 25], а среди соединительнотканых — малодифференцированные звездчатые клетки или миофибробласти внутренней и средней оболочки [15, 26] и перициты [17] — клетки наружной оболочки. То есть для рецеллюляризации идеально использовать не только эндотелиальные, гладкие мышечные клетки, но и сопутствующие, вспомогательные: малодифференцированные клетки — миофибробласти и перициты, регулирующие пролиферативную активность эндотелиоцитов, гладких миоцитов, способные дифференцироваться (перициты) в гладкие миоциты, участвовать в создании МКМ наряду с гладкими миоцитами и самоподдержании ткани стенки сосуда в целом.

Известные протоколы выделения и культивирования позволяют накопить все указанные клетки. Так, ЭК могут быть выделены из сосуда, периферической крови, костного мозга и размножены. Хотя выделенные из разных источников ЭК не являются полностью идентичными [4, 17], они в целом в одинаковой мере способны создавать эндотелиальный слой на ТИСТ [16, 17], но более быстро стареющий при использовании зрелых эндотелиоцитов сосудов [15].

ГМК также могут быть изолированы из сосуда, предифференцированы из мононуклеарных клеток костного мозга (МНК КМ) и размножены [6]. ГМК, засеянные в бесклеточный каркас, трансплантированный затем иммунодефицитным животным, инициировали через 6 недель формирование тонкой неоинтимы со сплошным слоем эндотелия и субэндотелиальным слоем ГМК. Биоинженерный сосуд, подготовленный таким образом, не имел признаков дилатации или стеноза. Трансмиссионная электронная микроскопия продемонстрировала образование эластина в неоинтиме [25].

Следовательно, есть основания считать, что биоинженерный сосуд, например аорта, может быть достаточной для пересадки после посева на бес-

клеточный матрикс только специализированных клеток — гладких миоцитов и эндотелиоцитов. Сопутствующие клетки могут быть эндогенного происхождения, то есть заселять трансплантат *in vivo* благодаря миграции из крови или окружающих тканей. Некоторые авторы [23] считают, что «двойной» посев предпочтительней не только потому, что он более отвечает клеточному составу сосуда, но и вследствие минимизации риска тромбоза и восстановления сократимости сосуда.

В этой связи среди надлежащих заселению в сосудистый каркас клеток заслуживают внимание МНК КМ — гетерогенная популяция клеток, включающая не только гемопоэтические, стромальные стволовые клетки, но и эндотелиальные клетки-предшественники и, очевидно, иные предшественники специализированных и вспомогательных сосудистых клеток. МНК КМ не без успеха используют, как непосредственно после выделения из КМ [17] — недифференцированные МНК, так и после преддифференцировки в клетки, фенотипически подобные сосудистым ГМК и ЭК [6]. Так, ранний стеноз, сопровождающийся аневризматической дилатацией, разрывом или тромбозом в первые две недели после трансплантации ТИСТ, заселенных сингенными недифференцированными МНК КМ, наблюдали у мышей-реципиентов в 20% случаев против 80% в незасеянных сосудистых каркасах [12]. Не последнюю роль в эффекте МНК КМ играют, возможно, моноциты КМ. Сравнивая результаты трансплантации мышам биодеградируемых полимерных сосудов, засеянных МНК без моноцитов, или МНК с моноцитами, или только моноцитами, T. L. Mirensky и соавт. показали, что только в группах мышей-реципиентов трансплантатов, содержащих моноциты, имели место признаки регенерации сосудистой ткани, сопутствующие проходимости трансплантатов [21]. В объяснении этого феномена авторы ключевую роль отводят потомкам трансплантированных моноцитов — тканевым макрофагам, образующимся из моноцитов в ближайшие три дня. Макрофаги, посредством секреции хемокина MCP-1 (macrophage chemoattractant protein-1) и антигенных цитокинов, привлекая в ТИСТ клетки реципиента — моноциты, ЭК-предшественники, ГМК, — опосредуют ремоделирование трансплантата. Причем, пик макрофагальной инфильтрации приходится на вторую неделю после трансплантации протеза и совпадает с почти полным формированием концентрических слоев ГМК и эндотелия, подтверждая предположение о макрофагальной инфильтрации ТИСТ, как ключевом этапе ремоделирования сосуда [12]. Трансдифференцировка стволовых клеток КМ в сосудистые клетки, по мне-

нию J. D. Roh и соавт., происходит редко и основной механизм участия МНК в трансформации биодеградируемого каркаса в функциональный кровеносный сосуд — паракринный [27].

Не менее интересны мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Эти клетки, экспрессирующие гепарин, не несущие HLA-II антигены [17], могут быть, равно как и МНК КМ, выделены из костного мозга, периферической крови, размножены и использованы по типу двойного посева [13] на матриксе совместно с ЭК или преддифференцированы в ГМК или ЭК. Сосудистые каркасы, засеянные ЭК и ГМК, дифференцированными из МСК аутологичного КМ, и имплантированные овцам, оказались тромборезистентными, проходимыми и механически стабильными в течение 5 месяцев наблюдения. Незасеянные контрольные каркасы подверглись окклюзии через 2 недели [32].

Среди вспомогательных клеток, уместных для тканевой инженерии сосудов, принято называть миофибробласты не только вследствие их вероятной способности к трансдифференцировке в эндотелиоциты, уникального спектра функциональных возможностей и секреции продуктов, сколько из-за представления о них, как хранителях генетической программы паттерна развития органа или его части. Показано, что миофибробlastы, выделенные из подкожной вены [26] или из адвентиции аорты [15] и засеянные *in vitro* на матрикс сосуда, *in vivo* начинали, например, активно синтезировать коллаген [6]. Наконец, перициты — периваскулярные клетки, экспрессирующие α-SMA, участвующие в синтезе белков МКМ и регенерации тканей. ТИСТ с перицитами, как клеточным компонентом биоинженерного сосуда, сохраняли 100%-ю проходимость через 8 недель после имплантации. Заселенные клетки участвовали в активном ремоделировании трансплантата, инициируя продукцию коллагена, эластина, формирование нескольких слоев ГМК и позитивный по фактору Виленбрандта монослоем ЭК [17].

Стратегия эндотелиализации имплантированных бесклеточных сосудистых каркасов с использованием гемопоэтических и антигенных цитокинов представляется заманчивой [2], ибо исключает этапы культивирования и посева клеток. Так, например, Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), фактор роста нервов, мобилизующие предшественников ЭК из КМ в периферическую кровь, при системном введении увеличивают эндотелиализацию, проходимость ТИСТ и редуцируют гиперплазию неонитмы [7, 31, 33]. Однако использование этой стратегии не снимает риска тромбоза незащищенного эндотелием сосуда [16, 17, 22] и скорее может считаться опцией в биоинженерии сосуда,

не отменяя необходимости в посеве клеток, как подтверждают результаты большинства экспериментальных исследований.

Так, децеллюларизованная аорта свиного плода (ДАСП) оказалась удачным объектом для рецеллюляризации. Эндотелиоциты, посаженные в такой бесклеточный каркас, показали высокую жизнеспособность, адгезивность и пролиферацию на поверхности, а спустя 7 дней после рецеллюляризации *in vitro* ДАСП имела полностью восстановленную жизнеспособными эндотелиоцитами интиму. Важно отметить в контексте дальнейшей разработки ДАСП, что по своим механическим свойствам (предел прочности на растяжение, давление разрыва и др.) она не уступает наивной аорте данного животного, но, как ткань эмбриона, иммунологически толерантна. МКМ ДАСП, как показали результаты исследования реакции на имплантацию каркаса под кожу крысам, не вызывает хронического иммунного ответа и подвергается кальцификации и дегенерации в минимальной степени, в отличие от децеллюларизованных артерий взрослой свиньи [20].

Каркасы легочного ствола (короткая миокардальная манжетка, клапан и часть сосуда) с покрытой на 7-й день после посева аутологичных эндотелиоцитов интимой, были исследованы через 1 и 3 месяца после трансплантации ягнятам-донорам клеток. В отличие от децеллюларизованных каркасов, покрытые клетками каркасы были проходимы, имели сплошной монослой ЭК и редко тромботические отложения на клапанах.

Некоторые авторы, как отмечали, рекомендуют «двойной» посев клеток. Cho S. W. с соавт. [6] первыми на децеллюларизованный каркас брюшной аорты свиньи засевают $4,0 \times 10^7$ ГМК-подобных клеток в объеме 1,0 мл культуральной среды, вторыми, спустя два часа после первых, $1,0 \times 10^7$ ЭК-подобных клеток, суспендированных также в 1,0 мл среды. Каркас, засеянный клетками, перед имплантацией в течение недели культивируют в среде M199, дополненной 20%-й телячьей сывороткой, человеческими VEGF и bFGF. Пористая, многослойная и трехмерная структура каркаса обеспечивают условия, необходимые для адгезии посаженных и циркулирующих клеток с последующим их участием в ремоделировании МКМ после имплантации. Ремоделирование включает разрушение МКМ протеолитическими ферментами и постепенный синтез аутологичного МКМ имплантированными аутологичными клетками и мигрировавшими в ТИСТ клетками реципиента. На это указывает экспрессия молекул, связанных с деградацией МКМ (матриксной металлопротеиназы и ее ингибитора) и молекул-предшественников компонентов МКМ (проколлагена I и III, тропозластина).

U-образные каркасы аорты крысы, последовательно засеянные в биореакторе аутологичными миофибробластами и эндотелиоцитами и имплантированные на 7-й день крысам-реципиентам, через 28 дней были проходимы. Доплерэхография показала открывашее/закрывающее движение створок клапана, коррелирующее с пульсирующим током крови. Однако анализ эксплантированных ТИСТ обнаружил утолщение стенки аорты, переходящее на створки клапана, с развитием их недостаточности и признаками очаговой кальцификации, возможно, из-за присутствия в культуральной среде фактора роста фибробластов, или вследствие неконтролируемой миграции в ТИСТ миофибробластов реципиента [15].

Клинические испытания ТИСТ, предполагающие долгосрочное наблюдение на предмет оценки степени интеграции сосуда в организме хозяина, его проходимости и функции [29], по-прежнему находятся на ранних стадиях.

P. M. Dohmen и коллеги заменили 43-летнему больному клапан легочного ствола аллогенным криоконсервированным децеллюларизованным протезом, засеянным в биореакторе аутологичными ЭК. Через год пациент чувствовал себя отлично. Гемодинамических нарушений по данным трансторакальной эхокардиографии, компьютерной и магнитнорезонансной томографии не отмечено [8].

22 пациента в возрасте 31–80 лет перенесли операцию замены корня аорты криоконсервированным децеллюларизованным аллотрансплантатом аортального клапана в связи с врожденными или приобретенными его пороками. Ни один пациент не получал антикоагулянты после операции. Госпитальная смертность отсутствовала. Две смерти пациентов через 1 год после операции не были связаны с функцией трансплантата. Через 1 месяц после операции результаты анализа панели реактивных антител были отрицательны у 20 пациентов из 22 (91%); через 3 месяца — у 19 из 22 (86%), в том числе у одного пациента с положительными результатами предыдущего анализа; через 1 год — у 19 из 20 (95%), в том числе у двух из трех пациентов с положительными результатами предыдущего анализа. Признаков регургитации аортального клапана, эндокардита, тромбоэмболии не обнаружено ни у одного из оперированных. Некоторые авторы [30] полагают, что отсутствие необходимости в антикоагулянтах, признаков аллогенной сенсибилизации, восстановление гемодинамики до физиологических показателей делает эту тканевую реконструкцию особо пригодной для пациентов с противопоказаниями к антикоагулянтной терапии.

В рандомизированном клиническом исследовании 22 пациентам криоконсервированный бесклеточный каркас клапана легочного ствола был им-

плантирован как клапан аортальный. Ни градиенты давления через аллотрансплантаты, ни эффективная площадь отверстия не отличались от таковых у пациентов, перенесших стандартную операцию Росса. Частота кальцификации была достаточно высока — 26% против 15% в контроле, но все очаги обильствования у реципиентов бесклеточных протезов представляли собой небольшие изолированные пятна без видимой функциональной значимости. Тромбы отсутствовали. В течение 10 месяцев наблюдения у рассматриваемой группы пациентов каких-либо различий с больными контрольной группы по гемодинамическим показателям не было. В этой связи авторы указывают, что аллотрансплантация бесклеточного криоконсервированного клапана легочного ствола является безопасной [3].

Опубликованы результаты 3,5-летнего наблюдения двух пациентов 11 и 13 лет — реципиентов биоинженерного клапана легочного ствола — децеллюларизованного матрикса клапана, засеянного аутологичными ЭК. В процессе 21-дневного культивирования в динамическом биореакторе внесенные клетки образовали на люминальной поверхности каркаса монослой ЭК. Регулярное обследование в течение 3,5 лет показало увеличение диаметра входного отверстия клапана, уменьшение клапанной регургитации до обычной и нормализацию трансвалвуллярного градиента без признаков дегенерации клапана у обоих пациентов. Площадь поверхности тела пациентов увеличилась с 1,1 до 1,4 м² и с 1,1 до 1,5 м². Таким образом, замена сердечных клапанов ТИСТ с аутологичными ЭК выполнима и безопасна, причем ТИСТ имеют потенциал ремоделирования и роста, соответствующего соматическому росту ребенка [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идеальные заменители сосудов должны обладать прочностью, позволяющей выдержать артериальное давление, эластичностью интактной артерии, тромборезистентностью, иммунологической толерантностью и способностью к ремоделированию. Неповрежденный децеллюларизованный матрикс сосуда, хотя и отвечает требованиям по прочности на разрыв, эластичности, силе удержания шва, иммунологической толерантности, тромборезистентности, вряд ли может рассматриваться, как «идеальный» протез прежде всего из-за отсроченного во времени ремоделирования, таящего в себе риск тромбоза, инфицирования. Таковым может быть только персонифицированный биоинженерный сосуд — матрикс, децеллюларизованный сосудоспецифическими клетками пациента — инициаторами и участниками ремоделирования и интеграции трансплантата. Однако, несмотря на отдельные успехи тканевой ин-

женерии сосудов, существуют вопросы, решение которых снимет препятствия для широкого внедрения биоинженерных сосудов в клиническую практику. Это вопросы, сопряженные с поиском оптимального варианта децеллюляризации, оптимального «ансамбля» клеток для рецеллюляризации и, наконец, оптимальных условий культивирования рецеллюларизованного матрикса сосуда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмедов Ш.Д., Афанасьев С.А., Егорова М.В., Андреев С.Л., Иванов А.В., Роговская Ю.В., Усов В.Ю., Шведов А.Н., Steinhoff G. Использование бесклеточного коллагенового матрикса в качестве платформы для изготовления кровеносных сосудов в сердечно-сосудистой хирургии. Ангиология и сосудистая хирургия. 2012; 18 (2): 7–12.
2. Assmann A., Akhyari P., Delfs C., Flögel U., Jacoby C., Kamiya H., Lichtenberg A. Development of a growing rat model for the *in vivo* assessment of engineered aortic conduit. J. Surg. Res. 2012; 176 (2): 367–75.
3. Bechtel J.F., Gellissen J., Erasmi A.W., Petersen M., Hiob A., Stierle U., Sievers H.H. Mid-term findings on echocardiography and computed tomography after RVOT-reconstruction: comparison of decellularized (SynerGraft) and conventional allografts. Eur.J. Cardiothorac. Surg. 2005; 27: 410–15.
4. Brown M.A., Zhang L.S., Levering V.W., Wu J.H., Satterwhite L.L., Brian L., Freedman N.J., Truskey G.A. Human umbilical cord blood-derived endothelial cells reendothelialize vein grafts and prevent thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010; 30 (11): 2150–5.
5. Cebotari S., Lichtenberg A., Tudorache I., Hilfiker A., Mertsching H., Leyh R., Breymann T., Kallenbach K., Maniuc L., Batrinac A., Repin O., Maliga O., Ciubotaru A., Haverich A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. Circulation. 2006; 114 (1 Suppl): I132–I137.
6. Cho S.W., Kim I.K., Kang J.M., Song K.W., Kim H.S., Park C.H., Yoo K.J., Kim B.S. Evidence for *in vivo* growth potential and vascular remodeling of tissue-engineered artery. Tissue Eng.: Part A. 2009; 15 (4): 901–12.
7. Cho S.W., Lim J.E., Chu H.S., Hyun H.J., Choi C.J., Hwang K.C., Yoo K.J., Kim D.I., Kim B.S. Enhancement of *in vivo* endothelialization of tissue engineered vascular grafts by granulocyte colonystimulating factor. J Biomed Mater Res. 2006; 76A: 252–63.
8. Dohmen P.M., Lembcke A., Hotz H., Kivelitz D., Konertz W.F. Ross operation with a tissue-engineered heart valve. Ann Thorac Surg. 2002; 74: 1438–42.
9. Funamoto S., Nam K., Kimura T., Murakoshi A., Hashimoto Y., Niwaya K., Kitamura S., Fujisato T.,

- Kishida A. The use of highhydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010; 31: 3590–5.
10. Gui L., Muto A., Chan S.A., Breuer C.K., Niklason L.E. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tissue Engineering: Part A*. 2009; 15 (9): 2665–76.
 11. Hashi C.K., Zhu Y.Q., Yang G.Y., Young W.L., Hsiao B.S., Wang K., Chu B., Li S. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (29): 11915–20.
 12. Hibino N., Yi T., Duncan D.R., Rathore A., Dean E., Naito Y., Dardik A., Kyriakides T., Madri J., Pober J.S., Shinoka T., Breuer C.K. A critical role for macrophages in neovessel formation and the development of stenosis in tissue-engineered vascular grafts. *FASEB J.* 2011; 12: 4253–63.
 13. Hjortnaes J., Gottlieb D., Figueiredo J.L., Molero-Martin J., Kohler R.H., Bischoff J., Weissleder R., Mayer J.E., Aikawa E. Intravital molecular imaging of small-diameter tissue-engineered vascular grafts in mice: a feasibility study. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010; 16 (4): 597–607.
 14. Hwang S.J., Kim S.W., Choo S.J., Lee B.W., Im I.R., Yun H.J., Lee S.K., Song H., Cho W.C., Lee J.W. The decellularized vascular allograft as an experimental platform for developing a biocompatible small-diameter graft conduit in a rat surgical model. *Yonsei Med J*. 2011; 52 (2): 227–33.
 15. Kallenbach K., Sorrentino S., Mertsching H., Kostin S., Pethig K., Haverich A., Cebotari S. A novel small-animal model for accelerated investigation of tissue-engineered aortic valve conduit. *Tissue Engineering. Part C*. 2010; 16 (1): 41–50.
 16. Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J., Shapira O.M., Perry T., Sutherland F.W., Rabkin E., Moran A.M., Schoen F.J., Atala A., Soker S., Bischoff J., Mayer J.E.Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*. 2001; 7: 1035–1040.
 17. Krawiec J.T., Vorp D.A. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. *Biomaterials*. 2012; 33 (12): 3388–3400.
 18. Lichtenberg A., Tudorache I., Cebotari S., Ringes-Lichtenberg S., Sturz J., Hoeffer K., Hurscheler C., Brandes J., Hilfiker A., Haverich A. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials*. 2006a; 27: 4221–9.
 19. Lichtenberg A., Tudorache I., Cebotari S., Suprunov M., Tudorache J., Goerler H., Park J.K., Hilfiker-Kleiner D., Ringes-Lichtenberg S., Karck M., Brandes G., Hilfiker A., Haverich A. Preclinical testing of tissue-engi-neered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation*. 2006b; 114 (1 Suppl): 1559–1565.
 20. Liu G.F., He Z.J., Yang D.P., Han X.F., Guo T.F., Hao C.G., Ma H., Nie C.L. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft. *Chin Med J*. 2008; 121 (15): 1398–1406.
 21. Mirenky T.L., Hibino N., Sawh-Martinez R.F., Yi T., Villalona G., Shinoka T., Breuer C.K. Tissue-engineered vascular grafts: does cell seeding matter? *J Pediatr Surg*. 2010; 45 (6): 1299–1305.
 22. Muller F., Gailani D., Renne T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr. Opin. Hematol*. 2011; 18 (5): 349–55.
 23. Neff L.P., Tillman B.W., Yazdani S.K., Machingal M.A., Yoo J.J., Soker S., Bernish B.W., Geary R.L., Christ G.J. Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. *J Vasc Surg*. 2011; 53 (2): 426–34.
 24. Negishi J., Funamoto S., Kimura T., Nam K., Higami T., Kishida A. Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using highhydrostatic pressure. *J. Artif. Organs*. 2011; 14 (3): 223–31.
 25. Quint C., Arief M., Muto A., Dardik A., Niklason L.E. Allogeneic human tissue-engineered blood vessel. *J Vasc Surg*. 2012; 55 (3): 790–8.
 26. Rieder E., Kasimir M.-T., Silberhumer G., Seebacher G., Wolner E., Simon P., Weigel G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2004; 127 (2): 399–405.
 27. Roh J.D., Sawh-Martinez R., Brennan M.P., Jay S.M., Devine L., Rao D.A., Yi T., Mirenky T.L., Nalbandian A., Udelsman B., Hibino N., Shinoka T., Saltzman W.M., Snyder E., Kyriakides T.R., Pober J.S., Breuer C.K. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (10): 4669–74.
 28. Kim S.S., Lim S.H., Hong Y.S., Cho S.W., Ryu J.H., Chang B.C., Choi C.Y., Kim B.S. Tissue engineering of heart valves in vivo using bone marrow-derived cells. *Artificial Organs*. 2006; 30 (7): 554–7.
 29. Swartz D.D., Andreadis S.T. Animal models for vascular_tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2013; 24 (5): 916–25.
 30. Zehr K.J., Yagubyan M., Connolly H.M., Nelson S.M., Schaff H.V. Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2005; 130: 1010–15.

31. Zeng W., Yuan W., Li L., Mi J., Xu S., Wen C., Zhou Z., Xiong J., Sun J., Ying D., Yang M., Li X., Zhu C. The promotion of endothelial progenitor cells recruitment by nerve growth factors in tissueengineered blood vessels. *Biomaterials*. 2010; 31 (7): 1636–45.
32. Zhao Y.L., Zhang S., Zhou J.Y., Wang J.L., Zhen M.C., Liu Y., Chen J., Qi Z. The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010; 31 (2): 296–307.
33. Zhou M., Liu Z., Li K., Qiao W., Jiang X., Ran F., Qiao T., Liu C. Beneficial effects of granulocyte-colony stimulating factor on small-diameter heparin immobilized decellularized vascular graft. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 95A (2): 600–10.

REFERENCES

1. Akhmedov Sh.D., Afanas'yev S.A., Egorova M.V., Andreev S.L., Ivanov A.V., Rogovskaya Yu.V., Usov V.Yu., Shvedov A.N., Steinhoff G. Ispol'zovanie beskletochnogo kollagenovogo matriksa v kachestve platformy dlya izgotovleniya krovenosnykh sosudov v serdechno-sosudistoy khirurgii [The use of acellular collagen matrix as a platform for the manufacture of blood vessels in cardiovascular surgery]. *Angiologiya i so-sudistaya khirurgiya*. 2012; 18 (2): 7–12.
2. Assmann A., Akhyari P., Delfs C., Flögel U., Jacoby C., Kamiya H., Lichtenberg A. Development of a growing rat model for the n vivo assessment of engineered aortic conduit. *J. Surg. Res.* 2012; 176 (2): 367–75.
3. Bechtel J.F., Gellissen J., Erasmi A.W., Petersen M., Hiob A., Stierle U., Sievers H.H. Mid-term findings on echocardiography and computed tomography after RVOT-reconstruction: comparison of decellularized (SynerGraft) and conventional allografts. *Eur.J. Cardiothorac. Surg.* 2005; 27: 410–15.
4. Brown M.A., Zhang L.S., Levering V.W., Wu J.H., Satterwhite L.L., Brian L., Freedman N.J., Truskey G.A. Human umbilical cord blood-derived endothelial cells reendothelialize vein grafts and prevent thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30 (11): 2150–5.
5. Cebotari S., Lichtenberg A., Tudorache I., Hilfiker A., Mertsching H., Leyh R., Breymann T., Kallenbach K., Maniuc L., Batrinac A., Repin O., Maliga O., Ciubotaru A., Haverich A. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*. 2006; 114 (1 Suppl): I132–I137.
6. Cho S.W., Kim I.K., Kang J.M., Song K.W., Kim H.S., Park C.H., Yoo K.J., Kim B.S. Evidence for in vivo growth potential and vascular remodeling of tissue-engineered artery. *Tissue Eng.: Part A*. 2009; 15 (4): 901–12.
7. Cho S.W., Lim J.E., Chu H.S., Hyun H.J., Choi C.J., Hwang K.C., Yoo K.J., Kim D.I., Kim B.S. Enhancement of in vivo endothelialization of tissue engineered vas-
8. Dohmen P.M., Lembcke A., Hotz H., Kivelitz D., Konertz W.F. Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg.* 2002; 74: 1438–42.
9. Funamoto S., Nam K., Kimura T., Murakoshi A., Hashimoto Y., Niwaya K., Kitamura S., Fujisato T., Kishida A. The use of highhydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010; 31: 3590–5.
10. Gui L., Muto A., Chan S.A., Breuer C.K., Niklason L.E. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tissue Engineering: Part A*. 2009; 15 (9): 2665–76.
11. Hashi C.K., Zhu Y.Q., Yang G.Y., Young W.L., Hsiao B.S., Wang K., Chu B., Li S. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (29): 11915–20.
12. Hibino N., Yi T., Duncan D.R., Rathore A., Dean E., Naito Y., Dardik A., Kyriakides T., Madri J., Pober J.S., Shinoka T., Breuer C.K. A critical role for macrophages in neovessel formation and the development of stenosis in tissue-engineered vascular grafts. *FASEB J.* 2011; 12: 4253–63.
13. Hjortnaes J., Gottlieb D., Figueiredo J.L., Molero-Martin J., Kohler R.H., Bischoff J., Weissleder R., Mayer J.E., Aikawa E. Intravital molecular imaging of small-diameter tissue-engineered vascular grafts in mice: a feasibility study. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010; 16 (4): 597–607.
14. Hwang S.J., Kim S.W., Choo S.J., Lee B.W., Im I.R., Yun H.J., Lee S.K., Song H., Cho W.C., Lee J.W. The decellularized vascular allograft as an experimental platform for developing a biocompatible small-diameter graft conduit in a rat surgical model. *Yonsei Med J.* 2011; 52 (2): 227–33.
15. Kallenbach K., Sorrentino S., Mertsching H., Kostin S., Pethig K., Haverich A., Cebotari S. A novel small-animal model for accelerated investigation of tissue-engineered aortic valve conduit. *Tissue Engineering. Part C*. 2010; 16 (1): 41–50.
16. Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J., Shapira O.M., Perry T., Sutherland F.W., Rabkin E., Moran A.M., Schoen F.J., Atala A., Soker S., Bischoff J., Mayer J.E.Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med.* 2001; 7: 1035–1040.
17. Krawiec J.T., Vorp D.A. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. *Biomaterials*. 2012; 33 (12): 3388–3400.
18. Lichtenberg A., Tudorache I., Cebotari S., Ringes-Lichtenberg S., Sturz J., Hoeffer K., Hurscheler C., Brandes J., Hilfiker A., Haverich A. In vitro re-endothe-

- lialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials.* 2006a; 27: 4221–9.
19. Lichtenberg A., Tudorache I., Cebotari S., Suprunov M., Tudorache J., Goerler H., Park J.K., Hilfiker-Kleiner D., Ringes-Lichtenberg S., Karck M., Brandes G., Hilfiker A., Haverich A. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation.* 2006b; 114 (1 Suppl): 1559–1565.
 20. Liu G.F., He Z.J., Yang D.P., Han X.F., Guo T.F., Hao C.G., Ma H., Nie C.L. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft. *Chin Med J.* 2008; 121 (15): 1398–1406.
 21. Mirensky T.L., Hibino N., Sawh-Martinez R.F., Yi T., Villalona G., Shinoka T., Breuer C.K. Tissue-engineered vascular grafts: does cell seeding matter? *J Pediatr Surg.* 2010; 45 (6): 1299–1305.
 22. Muller F., Gailani D., Renne T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Curr. Opin. Hematol.* 2011; 18 (5): 349–55.
 23. Neff L.P., Tillman B.W., Yazdani S.K., Machinagal M.A., Yoo J.J., Soker S., Bernish B.W., Geary R.L., Christ G.J. Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. *J Vasc Surg.* 2011; 53 (2): 426–34.
 24. Negishi J., Funamoto S., Kimura T., Nam K., Higami T., Kishida A. Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using highhydrostatic pressure. *J. Artif. Organs.* 2011; 14 (3): 223–31.
 25. Quint C., Arief M., Muto A., Dardik A., Niklason L.E. Allogeneic human tissue-engineered blood vessel. *J Vasc Surg.* 2012; 55 (3): 790–8.
 26. Rieder E., Kasimir M.-T., Silberhumer G., Seebacher G., Wolner E., Simon P., Weigel G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004; 127 (2): 399–405.
 27. Roh J.D., Sawh-Martinez R., Brennan M.P., Jay S.M., Devine L., Rao D.A., Yi T., Mirensky T.L., Nalbandian A., Udelson B., Hibino N., Shinoka T., Saltzman W.M., Snyder E., Kyriakides T.R., Pober J.S., Breuer C.K. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107 (10): 4669–74.
 28. Kim S.S., Lim S.H., Hong Y.S., Cho S.W., Ryu J.H., Chang B.C., Choi C.Y., Kim B.S. Tissue engineering of heart valves in vivo using bone marrow-derived cells. *Artificial Organs.* 2006; 30 (7): 554–7.
 29. Swartz D.D, Andreadis S.T. Animal models for vascular_tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013; 24 (5): 916–25.
 30. Zehr K.J., Yagubyan M., Connolly H.M., Nelson S.M., Schaff H.V. Aortic root replacement with a novel decellularized cryopreserved aortic homograft: postoperative immunoreactivity and early results. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005; 130: 1010–15.
 31. Zeng W., Yuan W., Li L., Mi J., Xu S., Wen C., Zhou Z., Xiong J., Sun J., Ying D., Yang M., Li X., Zhu C. The promotion of endothelial progenitor cells recruitment by nerve growth factors in tissueengineered blood vessels. *Biomaterials.* 2010; 31 (7): 1636–45.
 32. Zhao Y.L., Zhang S., Zhou J.Y., Wang J.L., Zhen M.C., Liu Y., Chen J., Qi Z. The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2010; 31 (2): 296–307.
 33. Zhou M., Liu Z., Li K., Qiao W., Jiang X., Ran F., Qiao T., Liu C. Beneficial effects of granulocyte-colony stimulating factor on small-diameter heparin immobilized decellularized vascular graft. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 95A (2): 600–10.

◆ Информация об авторах

Александров Виктор Николаевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий НИЛ экспериментальной медицины НИЦ ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: vnaleks9@yandex.ru.

Хубулава Геннадий Григорьевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий. 1-я кафедра хирургии усовершенствования врачей. ФГКВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны России. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6. E-mail: khubulava@clubcvs.ru.

Леванович Владимир Викторович – д-р мед. наук, профессор, ректор. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: spb@gpma.ru.

Aleksandrov Viktor Nikolayevich – MD, PhD, Dr Med Sci Professor, Head of the Research center. Saint Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: vnaleks9@yandex.ru.

Khubulava Genady Grigorievich – MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, Head of the 1st Department of Surgery Postgraduate Medical Russian Medicomilitary Academy. 6, Academika Lebedeva St., St. Petersburg, 194044, Russia. E-mail: khubulava@clubcvs.ru.

Levanovich Vladimir Victorovich – MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, rector. St Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: spb@gpma.ru.