

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-1-150-156

## СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В СОЗДАНИИ БЕСКЛЕТОЧНЫХ АЛЛО- И КСЕНОТКАНЕЙ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ СТРУКТУР СЕРДЦА

*С.И. Бабенко, Р.М. Муратов, М.Н. Соркомов*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Тканевая инженерия обладает значительным потенциалом для решения проблем долговечности биологических тканей при использовании в реконструктивной хирургии структур сердца и сосудов. В целях получения биоматериала, морфологически и функционально близкого к поврежденной ткани сердца человека, была предложена технология децеллюляризации. В обзоре рассматриваются различные аспекты и модели децеллюляризации биологических тканей, в том числе современная технология использования сверхкритического диоксида углерода как наиболее экологичного и перспективного метода.

*Ключевые слова:* клапан сердца, тканевая инженерия, децеллюляризация, сверхкритический диоксид углерода.

## CURRENT TRENDS IN THE CREATION OF CELL-FREE ALLO- AND XENOTISSUES FOR RECONSTRUCTION OF HEART STRUCTURES

*S.I. Babenko, R.M. Muratov, M.N. Sorcomov*

Bakulev National Medical Research Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russian Federation

Tissue engineering has significant potential for solving the problems of durability of biological tissues when used in cardiac and vascular reconstructive surgery. A decellularization technology has been proposed for obtaining a biomaterial, morphologically and functionally similar to the damaged human heart tissue. This review discusses various aspects and models of biological tissue decellularization, including the modern technology of using supercritical carbon dioxide as the most eco-friendly and promising method.

*Keywords:* heart valve, tissue engineering, decellularization, supercritical carbon dioxide.

Биологические протезы используются в сердечно-сосудистой хирургии с начала 1960-х годов прошлого века, когда трупный аортальный клапан D. Ross, B. Barratt-Boyes в 1962 году пересадили в ортотопическую позицию. В 1968 году А. Carpentier для химической обработки биологической ткани начал использовать глутаровый альдегид и выполнил протезирование аортального клапана каркасным биопротезом. Сегодня свиные аортальные и бычьи перикардальные протезы широко используются во всем мире, в том числе и без каркаса. Приблизительно 275 000 искусственных клапанов сердца имплантируется по всему миру ежегодно, из которых примерно

половина – механические, а половина – биологические, что свидетельствует о все более широком использовании биопротезов в последние десятилетия. Однако механические и биологические протезы имеют некоторые ограничения, такие как инфекция, риск тромбоза, необходимость в приеме антикоагулянтов в течение всей жизни (механические) или ограниченная долговечность (биологические). Аллотрансплантат (аллогraft) является альтернативой механическим или биологическим протезам и имеет некоторые преимущества. Гомовитальные (взятые из живого сердца) и криоконсервированные аллотрансплантаты состоят из жизнеспособной

**Для корреспонденции:** Соркомов Максим Ньюгустанович. Адрес: 121552, Москва, Рублевское шоссе, д. 135. Тел. (495) 414-78-49. E-mail: sorcommn@gmail.com

**Corresponding author:** Maxim Sorcomov. Address: 135, Rublevskoe shosse, Moscow, 121552, Russian Federation. Phone: (495) 414-78-49. E-mail: sorcommn@gmail.com

ткани, относительно устойчивой к заражению и с отличными гемодинамическими свойствами. С другой стороны, жизнеспособность чужеродных клеток вызывает иммунный ответ, что, возможно, приводит к более поздней, но все же дегенерации клапана. В то же время стерилизованные антибиотиками клапаны аллографта имеют ограниченную долговечность из-за недостатка живых клеток внутри матрикса [9].

Для снижения иммунного ответа и отторжения ксенотрансплантата чаще всего используется глутаровый альдегид [4–6, 15, 25]. Хотя обработка ткани приводит к снижению ее иммуногенности, главным нежелательным компонентом остается цитотоксичность и склонность к кальцификации. Кальцификация играет главную роль в дегенеративной дисфункции биопротезов сердечных клапанов, а она, в свою очередь, инициируется главным образом остаточными мертвыми клетками вследствие обработки глутаровым альдегидом. Механизм включает реакцию кальцийсодержащей внеклеточной жидкости с мембрано-связанным фосфором, что приводит к образованию минеральных отложений фосфата кальция. Кроме того, кальцификацию ускоряют такие известные факторы, как молодой возраст реципиента и повышенное механическое напряжение створок биопротеза. Створки клапана подвергаются повторяющимся циклам раскрытия и закрытия около миллиарда раз в течение жизни. Таким образом, объяснимы структурные изменения и нативного клапана, которые возникают с возрастом в виде провисания створок, приводящего к недостаточности или кальцинозу створок, который приводит к стенозу.

Биологические ткани, состоящие из внеклеточного матрикса, используются в реконструктивной хирургии и все чаще находят применение в регенеративной медицине для замены органов и тканей. Биоинженерные клапаны, полученные из бесклеточных ксенотканей или децеллюляризованной ткани нативных клапанов, могут стать лучшей альтернативой механическим и классическим биологическим протезам, так как в эксперименте обеспечивают репопуляцию собственными клетками реципиента с возможностью роста и восстановлением ткани. Кроме того, репопуляционные клапаны считаются менее подверженными кальцификации и обеспечивают идеальные гемодинамические параметры. В кардиохирургии источниками таких материалов служат аллогенные или ксеногенные ткани для замены клапанов сердца, создания «заплат» и кондуитов. Однако до настоящего времени полная аутологическая рецеллюляризация имплантированных бесклеточных клапанов сердца не реализована [25]. Рецеллюляризация клапанов ограничена только образованием эндотелиальной рецеллюляризации на поверхности створок. Этот сценарий намного лучше по сравнению с криоконсервированными клапанами, которые иногда подвер-

гаются дегенерации и инфильтрации лейкоцитами всего клапана. Факт, что репопуляция бесклеточных клапанов ограничена только поверхностью створок, выявляет проблему, поскольку именно ткань створки является основным местом процесса дегенерации криоконсервированного протеза [25]. Ожидается, что без жизнеспособной популяции клеток, способной к воспроизведению внутри створки клапана, бесклеточные клапаны постигнет та же участь, что и криоконсервированные клапаны.

Многолетние исследования алло- и ксенотканей в кардиохирургии показали, что клеточные компоненты трансплантатов могут способствовать кальцификации или иммунным реакциям [15, 19, 20, 24, 25]. В целях получения биоматериала, структурно и функционально близкого к поврежденной структуре сердца человека и в то же время обеспечивающего безопасность с иммунологической точки зрения, была предложена технология децеллюляризации тканей и органов от человека или животных. Целью всех существующих в настоящее время протоколов является удаление всех жизнеспособных клеток при сохранении целостности внеклеточного матрикса. Методы децеллюляризации, таким образом, включают осмотические, химические, ферментативные и механические. Основными проблемами децеллюляризации остаются в большей или меньшей степени выраженные нарушения структуры внеклеточного матрикса, повышенная иммуногенность и тромбогенность децеллюляризованной биоткани.

Процесс децеллюляризации прежде всего направлен на обеспечение иммунологической инертности и сохранение основных структурных и функциональных компонентов биологической ткани, таких как белки, коллаген и гликозаминогликаны [5, 6, 10, 25].

Разработка децеллюляризации ксеногенных тканей началась в 80-х годах прошлого столетия. Для устранения интерстициальных клеток были исследованы несколько ферментов и детергентов, однако большинство из этих методов обработки оказались неэффективны. Первый тканевой инженерный клапан сердца свиньи Synergraft® (Cryolife Inc., США) был разработан в качестве альтернативы обычным биологическим клапанам. Аортальный клапан свиньи, композитные трансплантаты аорты (модель 500) или целые корни клапана легочной артерии (модель 700) делали свободными от клеток благодаря запатентованной технологии Synergraft®. Однако «технология SynerGraft» с использованием комбинации ферментов ДНКазы и РНКазы, децеллюляризации, криоконсервации и радиации оказалась неэффективной. Уже первые результаты показали невозможность их клинического использования. P. Simon et al. [9] в 2001 году сообщили о результатах имплантации протезов модели Synergraft® четырем детям мужского пола (возраст 2,5–11 лет) в выводной тракт правого

желудочка. Двум пациентам выполнена операция Росса и двум – замена гомографтом. В скором времени трое детей умерли: один ребенок на 7-й день после операции из-за внезапного разрыва клапана, второй и третий – через 6 недель и 1 год после имплантации. Четвертый протез был эксплантирован через 2 дня после имплантации профилактически. Использованный метод децеллюляризации ксеноклапана, по-видимому, не обеспечил ликвидации антигенов. Имплантация децеллюляризованных аллогraftов дает неоднозначные результаты. Традиционные (клеточные) криоконсервированные клапанные аллогraftы вызывают повышение уровней реактивных человеческих лейкоцитарных антигенов I и II класса [15]. Sayk et al. [16] сообщили об инфильтрации макрофагами децеллюляризованного аллогraftа легочного клапана SynerGraft уже через 5 недель после имплантации. Повышение уровня донор-специфических антител против лейкоцитарных антигенов I и II классов обнаружили и у взрослых пациентов, которым имплантировали аллогraft, децеллюляризованный с использованием ионного детергента додецилсульфата натрия [17].

Замораживание является одним из физических методов, используемых в децеллюляризации тканей, который включает прямое давление, обработку ультразвуком и перемешивание. При быстром замораживании ткани образуются внутриклеточные кристаллы льда, которые разрушают клеточные мембраны и вызывают лизис клеток. Скорость изменения температуры должна тщательно контролироваться, чтобы образование льда не нарушало сам клеточный каркас. Хотя замораживание может быть эффективным методом лизиса клеток, он может применяться только в сочетании с другими методами удаления клеточного материала из ткани [5].

D.W. Courtman et al. [4] в 1994 году описали ступенчатый процесс использования детергента и ферментативной экстракции для создания бесклеточного матрикса, который представлял собой многообещающий подход к производству биоматериалов для реконструкции сердечно-сосудистых структур. Обработка включала использование гипотонических и гипертонических растворов, детергентов (октил-фенокси-полиэтоксиэтанол и додецилсульфат натрия), а также ДНК-азу и РНК-азу, которые, ингибируя аутолиз, удаляли все клетки из тканей вместе с липидами [14]. Процесс привел к получению материала, состоящего в основном из эластина, нерастворимого коллагена и тесно связанных гликозаминогликанов. Световая и электронная микроскопия подтвердили, что почти все клеточные компоненты удалялись без ультраструктурных признаков повреждения волокнистых компонентов. Биохимический анализ обнаружил сохранение коллагена и эластина и некоторую дифференциальную экстракцию гликозаминоглика-

нов. Испытания на упруго-прочностные свойства доказали, что механические свойства тканей практически не изменялись.

Гипо- и гипертонические растворы эффективно удаляют интактные клеточные элементы, однако многочисленные исследования с антителами к главному комплексу гистосовместимости (ГКГС) определили положительную реакцию, которая коррелирует с интенсивностью инфильтрации матрикса Т-клетками *in vivo*. Очевидно, что водные гипо- и гипертонические растворы не способны элиминировать связанные с мембранами антигены ГКГС после осмотического лизиса клеток. Однако такая относительно мягкая техника децеллюляризации характеризуется более полным сохранением структур бесклеточного матрикса [2].

Акатов и соавт. [1], для того чтобы снизить риск повреждения тканевого матрикса, разработали способ, который был основан на использовании ЭДТА и дигитонина. Этот способ индуцировал быструю гибель клеток донора в трансплантатах, но не удалял погибшие клетки из матрикса. Дигитонин является неполярным детергентом и, связываясь с холестерином плазматической мембраны, нарушает ее целостность. ЭДТА является хелатором кальция, магния и ряда других ионов металлов и использовался авторами для подавления накопления кальция и фосфатов в митохондриях в процессе клеточной гибели. Однако такой метод обработки ксенографтов аорты не устранял иммунный ответ, который приводил к реорганизации матрикса и его повреждению [1].

Предложена дополнительная обработка ткани трипсином или нуклеазами. Кратковременное ферментативное воздействие на расщепление базальной мембраны трипсином оказалось эффективным методом устранения клеточного барьера для инвазии клеток [12]. S. Cebotari et al. аллотрансплантаты аорты и легочной артерии дважды промывали фосфатно-буферным раствором и инкубировали при постоянном встряхивании в трипсине / EDTA (0,5% трипсина и 0,2% EDTA) при температуре 37 °C в течение 48 часов [9]. Затем децеллюляризованные клапаны промывали для удаления остаточных веществ и хранили в свежем фосфатно-буферном растворе при 4 °C. Дальнейшие исследования I. Tudorache et al. по сравнению обработки ствола легочной артерии 1% дезоксихолатом натрия, 1% додецилсульфатом натрия или 0,05% трипсином / 0,02% ЭДТА показали, что все методики привели к полной децеллюляризации ткани клапана, но только додецилсульфат натрия и дезоксихолат позволили полностью удалить все клетки из стенки и клапана легочной артерии [8]. Морфологическая целостность и сохранность белков каркаса была значительно выше в группах, обработанных детергентом. Ферментная же обработка привела к разрушению базальной мембраны и ухудшению

параметров продольного растяжения стенки (жесткость, упругость, предельная сила, напряжение и деформация) в группе трипсин / ЭДТА ( $p < 0,05$ ). Все эти методы приводят к снижению воспалительной и иммунологической реакции после имплантации и одновременно обеспечивают матрицу, сходную по структуре с нативным клапаном. Однако дальнейшие исследования показали, что додецилсульфат натрия также может приводить к структурным изменениям матрицы, изменять механические свойства, такие как упругость и растяжимость [11].

Qi Xing et al. [13] сравнили три метода децеллюляризации биологических тканей: высокая концентрация (0,5 мас.%) додецилсульфата натрия, низкая концентрация (0,05 мас.%) и метод замораживания–оттаивания. Оценивали сохранение внеклеточного матрикса, механические свойства, способность к иммунному ответу *in vitro* и способность к репопуляции клеток. Результаты показали, что обработка высокой концентрацией додецилсульфата натрия удаляла до 90% ДНК, но значительно снижала механическую прочность бесклеточного матрикса. Модуль упругости и вязкости снизились примерно на 80% и 62% соответственно. Метод замораживания–оттаивания поддерживал структуру и механическую прочность бесклеточного матрикса, но сохранял большое количество клеточных компонентов в каркасе (около 88% ДНК). При всех трех методах тесты в пробирке не вызывали значительного иммунного ответа и были способны поддерживать репопуляцию клеток *in vitro*.

Применение методов децеллюляризации для снижения иммунологического потенциала ксеногенных тканей и органов основывается на предположениях о том, что клеточный компонент ксенотрансплантата является единственным фактором, способствующим его антигенности. Подходы для оценки ацеллюлярности каркаса после децеллюляризации в основном включали гистологическую оценку остаточных ядер [18, 19], хотя эта информация не обеспечивает знанием об удалении известных ксеногенных антигенов, таких как галактоза-альфа-1, 3-галактоза (альфа-гал) и главный комплекс гистосовместимости (ГКГС I) – в виде трансмембранных гликопротеинов содержащихся на поверхности всех ядросодержащих клеток. A. Gonçalves et al. провели исследование степени децеллюляризации биологических матриц из бычьего перикарда [18]. Перикард подвергался стандартной децеллюляризации, состоящей из гипотонического лизиса и обработки ДНКазой / РНКазой. Дополнительно ткань обрабатывали в течение 24 часов растворами: 0,5% Triton X-100, 0,5% дезоксихолатом натрия, 0,1% додецилсульфатом натрия, альфа-галактозидазой (5 ед/мл) или фосфолипазой A2 (150 Ед/мл). Далее ткани подвергали 96-часовому вымыванию при осторожном перемешивании при 27 °C, а затем оценивали с помощью световой микро-

скопии. Оказалось, что стандартная обработка приводила только к частичному удалению гистологической клеточности и персистенции альфа-гал, ГКГС I и альфа-актина. Добавление обработки дезоксихолатом приводило к явной ацеллюлярности, но сохраняло ксеногенные антигены. Додецилсульфат натрия обеспечивал полную ацеллюлярность и удаление ксеногенных антигенов, а обработка альфа-галактозидазой селективно удаляла альфа-гал из бычьего перикарда.

Додецилсульфат натрия и дезоксихолат натрия относятся к ионным детергентам и эффективны для растворения как цитоплазматических, так и ядерных клеточных мембран, но имеют тенденцию денатурировать белки, нарушая межбелковые взаимодействия. Тритон X-100 является наиболее широко изученным неионным моющим средством для протоколов децеллюляризации и может быть эффективным методом децеллюляризации, хотя его эффективность в значительной мере зависит от других методов, с которыми он комбинируется в определенном протоколе [5].

Дальнейшие исследования более тонкой оценки ацеллюлярности матрикса включали количественное определение ДНК [20], анализ длины остаточного фрагмента ДНК [21, 22] и оценку остаточных клеточных структурных белков (без доказанной антигенности) [15, 23]. При этом в настоящее время не существует стандарта для критериев успеха децеллюляризации. Таким образом, достоверность бесклеточности каркаса в качестве меры оценки остаточной антигенности требует тоже тщательного изучения [15].

Наиболее эффективные агенты для децеллюляризации каждой ткани и органа зависят от многих факторов, включая клеточный состав ткани (например, печень в сравнении с сухожилием), плотность (кожа или жировая ткань), содержание жиров (мозг или мочевой пузырь) и толщина (кожа или перикард). Важно, что каждый агент и метод, использующийся для удаления клеток, будут все же изменять состав межклеточного матрикса и вызывать некоторую степень разрушения его ультраструктуры. Минимизация этих нежелательных эффектов, а не полное предотвращение, является целью любого метода децеллюляризации [5].

Одним из относительно малоисследованных методов, заслуживающих внимания в настоящее время, является использование сверхкритического диоксида углерода ( $scCO_2$ ) и этанола в качестве среды для экстракции клеток. По сообщениям ряда исследователей, высокая проницаемость и высокая скорость переноса сверхкритической жидкости делает этот метод весьма эффективным.

J. Won Lee et al. [27] провели работу по анализу экстракции липидов сверхкритическим  $CO_2$  и пришли к выводу, что сверхкритический диоксид углерода ( $scCO_2$ ) является экологически чистой

сверхкритической жидкостью, которая химически инертна, нетоксична, не воспламеняется и не загрязняет окружающую среду. Как экологичный материал  $\text{scCO}_2$  обладает такими необходимыми свойствами, как высокая плотность, низкая вязкость и высокая диффузионная способность, что делает его пригодным для использования в качестве растворителя при децеллюляризации. Растущая озабоченность в мире в связи с загрязнением окружающей среды привела к разработке экологичного метода, основанного на использовании  $\text{scCO}_2$  в различных лабораториях и отраслях.  $\text{scCO}_2$  становится эффективной альтернативой обычным органическим растворителям.

Кроме того, цикл обработки биотканей  $\text{scCO}_2$  может быть коротким и составить несколько часов вместо дней, необходимых при использовании других детергентов. Исключение использования таких детергентов, как додецилсульфат натрия, также будет способствовать уменьшению повреждения внеклеточного матрикса и снизит цитотоксичность, обусловленную остатками детергента [3].

В 2008 году Sawada et al. [3] представили исследование по сверхкритической децеллюляризации оксидом углерода. Авторы сообщили об адекватном удалении ДНК и клеток, но в то же время обнаружили интенсивное обезвоживание ткани, что вызывало ее затвердевание и одновременно делало более хрупкой, а это потенциально угрожало возможности использования материала и создавало серьезное препятствие для прогресса в области клеточных технологий.

Обезвоживание ткани является важным параметром, определяющим пригодность ткани в качестве имплантата, и предполагается, что низкое содержание воды ухудшает механические свойства биоткани, хотя минимальная степень гидратации для сохранения ее функциональных свойств остается неизвестной [9].

Сверхкритический диоксид углерода, содержащий небольшое количество энтрейна, был адекватной средой для извлечения ядер клеток и клеточных мембран из биологической ткани [5]. В мягких условиях экстракции (15 МПа, 37 °C) ядра клеток были полностью элиминированы в течение одного часа. Однако эффективность удаления фосфолипидов в значительной степени зависела от скорости переноса углекислого газа внутрь ткани. Механическая прочность при этом не снижалась даже при длительной обработке. Таким образом, авторы считают, что децеллюляризованная ткань может быть приготовлена достаточно быстро и получена в абсолютно сухом состоянии, что выгодно с точки зрения длительного хранения без гниения и загрязнения.

Учитывая опыт предыдущих исследователей, D.M. Casalia et al. [26] представили новый способ децеллюляризации, который сохраняет состояние гидратации матрицы и ее механические свойства.

Для исследования была взята стенка аорты свиньи, с которой тщательно удалены все жировые ткани. Затем ее разрезали на тонкие прямоугольники (приблизительно  $3 \times 2$  см) и хранили в фосфатно-солевом буфере при 4 °C не менее 48 часов перед использованием. Каждый образец ткани высушивали в течение 15 минут в легком вакууме с использованием фильтровальной бумаги и воронки Бюхнера. В качестве контроля использовали интенсивную сушку в вакуумной печи (37 °C, вакуум 38,1 см рт. ст.). Изменения массы ткани регистрировали через 1, 2, 3, 6 и 24 часа. Чтобы предотвратить извлечение воды из ткани аорты и избежать критической дегидратации, сначала достигалось полное термодинамическое равновесие (т. е. полное насыщение) между  $\text{scCO}_2$  и водой. Это равновесие между  $\text{scCO}_2$  и водой достигалось при скорости потока жидкого  $\text{CO}_2$  5 мл/мин и ниже. При увеличении скорости потока удерживать равновесие не удавалось. Затем гидратированный  $\text{scCO}_2$  был использован для обработки матрицы. Коэффициент обработки (т. е. общая масса  $\text{CO}_2$  на единицу массы гидратированного материала) и другие используемые условия (включая температуру, давление и скорость сброса давления) были выполнены так, чтобы быть аналогичными условиям, используемым Sawada et al. для сравнения.

До момента исследования ткани на децеллюляризацию ее хранили при температуре –20 °C, предварительно промыв в фосфатно-буферном растворе и нарезав на кольцевые срезы шириной около 1 см.

Несмотря на высокое содержание воды в стенке аорты (более 97%), при использовании только  $\text{scCO}_2$  полная децеллюляризация не была достигнута. Исследователи включили четыре различных дополнительных компонента в камеру предварительного насыщения, чтобы определить, улучшают ли они децеллюляризацию: вода, вода + поверхностно-активное вещество Dehypon Ls-54 (BASF America, Florham Park, NJ), чистый этанол и смесь воды и этанола. После обработки ткани фиксировали в 10% формалине в течение не менее 24 часов и погружали в парафин. После нарезания и депарафинизации окрашивали гематоксилином и эозином или использовали трихромную окраску по Массону. Количественное определение ДНК проводили с использованием реагента ДНКзол (Invitrogen, Carlsbad, CA). Концентрацию ДНК рассчитывали на основании измерения абсорбции и начальной массы ткани.

Авторы пришли к выводу, что представленный новый гибридный метод использования  $\text{scCO}_2$  сочетает в себе короткий период обработки и полную децеллюляризацию, что было подтверждено гистологией и количественным определением ДНК ( $<0,04$  мкг ДНК / мг ткани), сохраняя при этом структуру ткани и ее механические свойства.

R.S. Hennessy et al. [28] проанализировали использование диоксида углерода в сверхкритическом состоянии на стерилизацию децеллюляризованных клапанов и обнаружили, что этот метод превосходит другие (гамма-облучение, перекись водорода, этанол) и может быть перспективным, несмотря на остаточное содержание в тканях после обработки перуксусной кислоты, которая является одним из ингредиентов в методе стерилизации и помогает сохранить стерильность ткани в течение длительного времени. В исследовании авторов имплантация *in vivo* на животных не обнаружила побочных эффектов из-за присутствия кислоты в ткани клапанов сердца. Но исследование продолжается для получения полностью стерильных децеллюляризованных сердечных клапанов без присутствия перуксусной кислоты.

В заключение необходимо сказать, что оптимизируя процессы децеллюляризации, можно получить клапаны и другие ткани, изъятые у людей и животных, которые сведут к минимуму специфичность донора и пациента, необходимую для обеспечения совместимых трансплантатов. Однако для того чтобы по-настоящему сократить различия между донорами и пациентами, нуждающимися в трансплантации, необходима разработка новых методов тканевой инженерии, поскольку современные не обеспечивают абсолютную долговечность и функциональность децеллюляризованных тканей. Кроме того, необходимо улучшать методы рецеллюляризации, чтобы равномерно распределить нужные типы клеток по ткани и обеспечить достаточную доставку питательных веществ и кислорода для оптимальной жизнеспособности клеток.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Акатов ВС, Муратов РМ, Фадеева ИС, Сачков АС, Бритиков ДВ, Фесенко НИ и др. Изучение биосовместимости трансплантатов клапанов сердца, девитализированных антикальцинозным способом. *Гены & Клетки*. 2010; V (2): 36–41. Akatov VS, Muratov RM, Fadeeva IS, Sachkov AS, Britikov DV, Fesenko NI et al. Izuchenie biosovmestimosti transplantantov klapanov serdtsa, devitalizirovannykh antikal'tsinoznym sposobom. *Geny & Kletki*. 2010; V (2): 36–41.
2. Курапеев ДИ, Лаврешин АВ, Анисимов СВ. Тканевая инженерия клапанов сердца: децеллюляризация алло- и ксенографтов. *Гены & Клетки*. 2012; VII (1): 34–39. Kurapeev DI, Lavreshin AV, Anisimov SV. Tkanevaya inzheneriya klapanov serdtsa: detsellyurizatsiya allo- i ksenograftov. *Geny & Kletki*. 2012; VII (1): 34–39.
3. Sawada K, Terada D, Yamaoka T, Kitamura S, Fujisato T. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. *J Chem Technol Biotechnol*. 2008; 83: 943–949.
4. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: Biochemical and mechanical effects of cell extraction. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994 Jun; 28 (Issue 6): 655–666. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280602>.
5. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675–3683. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
6. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. Volume 32, Issue 12, April 2011, Pages 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
7. Gil-Ramírez A, Rosmark O, Spégel P, Swärd K, Westergren-Thorsson G, Larsson-Callerfelt A-K, Rodríguez-Meizoso corresponding I. Pressurized carbon dioxide as a potential tool for decellularization of pulmonary arteries for transplant purposes. *Sci Rep*. 2020; 10: 4031. Published online 2020 Mar 4. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60827-4>.
8. Bechtel JF, Muller-Steinhardt M, Schmidtke C, Brusiwick A, Stierle U, Sievers HH. Evaluation of the decellularized pulmonary valve homograft (SynerGraft). *J Heart Valve Dis*. 2003; 12: 734–739.
9. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Reppin O, Batrinac A et al. Construction of Autologous Human Heart Valves Based on an Acellular Allograft Matrix. *Circulation*. 2002; 106: I-63–I-68.
10. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Hurschler C, Hilfiker A et al. Tissue Engineering of Heart Valves: Biomechanical and Morphological Properties of Decellularized Heart Valves. *J Heart Valve Dis*. 2007 Sep; 16 (5): 567–573; discussion 574.
11. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int*. 2017 Apr; 2017: 9831534. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>.
12. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR. Tissue Engineering of Pulmonary Heart Valves on Allogenic Acellular Matrix Conduits: *In Vivo* Restoration of Valve Tissue. *Circulation*. 2000 Nov 7; 102 (19 Suppl 3): III50-5. doi: 10.1161/01.cir.102.suppl\_3.iii-50.
13. Xing Q, Yates K, Tahtinen M, Shearier E, Qian Z, Zhao F. Decellularization of Fibroblast Cell Sheets for Natural Extracellular Matrix Scaffold Preparation. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2014; 21 (1). doi: 10.1089/ten.tec.2013.0666.
14. Wilson GJ, Courtman DW, Klement P, Lee JM, Yeager H. Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. *Ann Thorac Surg*. 1995; 60 (2 Suppl): S353–S358. doi: 10.1016/0003-4975(95)98967-y.
15. Wong ML, Griffiths LG. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization. *Acta Biomaterialia*. 31 Jan 2014; 10 (5): 1806–1816. doi: 10.1016/j.actbio.2014.01.028.

16. Sayk F, Bos I, Schubert U, Wedel T, Sievers H-H. Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: An autopsy study. *Ann Thorac Surg.* 2005; 79: 1755–1758. doi: 10.1016/j.athoracsur.2003.11.049.
17. Kneib C, von Glehn C, Costa F, Costa M, Susin M. Evaluation of humoral immune response to donor HLA after implantation of cellularized versus decellularized human heart valve allografts. *Tissue Antigens.* 2012; 80: 165–174. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01885.x. Epub 2012 May 25.
18. Gonçalves AC, Griffiths LG, Anthony RV, Orton EC. Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens. *The Journal of Heart Valve Disease.* 01 Mar 2005; 14 (2): 212–217.
19. Griffiths LG, Choe LH, Reardon KF, Dow SW, Christopher Orton E. Immunoproteomic identification of bovine pericardium xenoantigens. *Biomaterials.* 2008; 29: 3514–3520. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.006.
20. Syedain ZH, Bradee AR, Kren S, Taylor DA, Tranquillo RT. Decellularized tissue-engineered heart valve leaflets with recellularization potential. *Tissue Engineering Part A.* 2012; 19: 759–769. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0365.
21. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials.* 2012; 33: 1771–1781. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.054.
22. Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *The Journal of Surgical Research.* 2009; 152: 135–139. doi: 10.1016/j.jss.2008.02.013.
23. Böer U, Lohrenz A, Klingenberg M, Pich A, Haverich A, Wilhelmi M. The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts. *Biomaterials.* 2011; 32: 9730–9737. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.015.
24. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, De-kan B, Wolner E et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2006; 15 (2): 278–286.
25. VeDepo MC, Detamore MS, Hopkins RA, Converse GL. Recellularization of decellularized heart valves: Progress toward the tissue-engineered heart valve. *J Tissue Eng.* 2017 Jan-Dec; 8: 2041731417726327. doi: 10.1177/2041731417726327.
26. Casali DM, Handleton RM, Shazly T, Matthews MA. A novel supercritical CO<sub>2</sub>-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties. *The Journal of Supercritical Fluids.* 2018 Jan; 131: 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.07.021>.
27. Lee JW, Fukusaki E, Bamba T. Application of supercritical fluid carbon dioxide to the extraction and analysis of lipids. *Bioanalysis.* 2012; 4: 2413–2422. <https://doi.org/10.4155/bio.12.198>.
28. Hennessy RS, Jana S, Tefft BJ, Helder MR, Young MD, Hennessy RR et al. Supercritical Carbon Dioxide-Based Sterilization of Decellularized Heart Valves. *JACC Basic Transl Sci.* 2017 Feb; 2 (1): 71–84. doi: 10.1016/j.jacbts.2016.08.009.

Статья поступила в редакцию 30.06.2020 г.

The article was submitted to the journal on 30.06.2020