

## **Аннотация проекта**

### **Название проекта: «Тканевая инженерия сердца крысы»**

### **Содержание проекта**

Предлагаемый проект относится к медицине, а именно к регенеративной медицине. Результаты могут быть использованы в клеточной биологии, молекулярной биологии, торакальной хирургии для создания биоинженерного органа в качестве трансплантата.

Данный проект направлен на решение фундаментальной проблемы медицины, связанной с изучением механизмов создания функционирующих тканеинженерных конструкций, способных в будущем заменить сердце в случае развития терминальной сердечной недостаточности. В течение более полувека решением этой проблемы было осуществление трансплантаций сердца от доноров. Однако, нехватка донорских органов, сложность их доставки, трудностью поиска иммунологически совместимых органов и пожизненное назначение иммуносупрессивной терапии [Fuchs J.R et al., 2001] привели к развитию современной тканевой инженерии сердца, приоритетным направлением которой является разработка биоинженерных каркасов с последующим заселением их аутологичными клетками. Применение таких конструкций позволило бы решать как этические, так и иммунологические проблемы трансплантологии. Однако неспособность природных материалов полностью воспроизводить сложную структуру межклеточного матрикса привела к необходимости использовать децеллюляризированные естественные межклеточные матриксы, полученные от доноров, либо матриксы, изготовленные из полимерных материалов и полностью воспроизводящие структуру нативного органа. Для засеивания каркасов используются различные типы клеток, способных дифференцироваться в структуры сердца и выполнять их функции. В настоящее время ведется активный поиск биосовместимых материалов, способных обеспечивать механическую стабильность на уровне целого органа, и не препятствовать дальнейшему росту клеток на биоискусственном каркасе.

Предлагаемый проект соответствует платформе «Регенеративная медицина».

## Актуальность исследования

Сердечно-сосудистые заболевания - основная причина инвалидизации и преждевременной смерти жителей экономически развитых стран (ВОЗ. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru>)

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) - одно из самых частых осложнений заболеваний сердечно-сосудистой системы. Количество больных, которые достигают терминальной стадии ХСН, постоянно растет. Трансплантация сердца на настоящий момент остается единственно доступным хирургическим способом лечения терминальной стадии ХСН. Каждый год в мире проводятся более 5400 операций по пересадке сердца (ВОЗ. <http://www.who.int/transplantation/gkt/statistics/en/>). В настоящее время, основные проблемы трансплантологии связаны с острой нехваткой донорских органов, сложностью их доставки, трудностью поиска иммунологически совместимых органов и пожизненным назначением иммуносупрессивной терапии (Fuchs J.R. et al., 2001). Отторжение аллотрансплантата сердца – серьезная проблема в течение первого года после трансплантации, долгосрочный прогноз в основном ограничен иммуносупрессией и, как следствие, возникновением инфекционных осложнений, гипертензии, почечной недостаточности, злокачественных опухолей и васкулопатии трансплантата (Hoppe U.C. et al., 2005, Swedberg K. et al 2005, Hunt S.A. et al., 2005). Таким образом, пятилетняя выживаемость у пациентов, перенесших трансплантацию сердца и получающих тройную иммуносупрессивную терапию, составляет 70-80% (Hosenpud J.D et al., 1999). Данная процедура трансплантации сердца ограничена вследствие малого числа доноров и растущего количества реципиентов. Имплантация искусственного левого желудочка (ЛЖ) также характеризуется научно-медицинскими сложностями разработки и применения технологий пересадки имплантатов. Поэтому одной из наиболее перспективных задач можно считать развитие тканевой инженерии, как одного из направлений регенеративной медицины (Murphy S.V. et al., 2012, Taylor D.A., 2009).

Тканевая инженерия может стать альтернативным способом лечения и фокусируется на восстановлении, замене и регенерации клеток, тканей и органов с нарушенными функциями. Она включает в себя разработку и модификацию биологических (природных) или искусственных каркасов, а также оценку и поддержание жизнеспособности клеток или тканей, взаимодействующих с ними и требует ряда ключевых компонентов, включая, но не ограничиваясь перечисленными ниже: каркасы или матриксы (биологические или искусственные), клетки (ауто-, алло-, ксеногенные),

биореактор и биоактивные молекулы (Fuchs J.R. et al., 2001; McIntire L.V. et al., 2002; Langer R. Et al., 1993; Skalak R. et al., 1988; Amula S., 2005; Atala A., 2005). В развитии современной тканевой инженерии приоритетным направлением является разработка биоинженерных каркасов и биоматериалов, применение которых позволило бы решать как этические, так и иммунологические проблемы трансплантологии. Каркасы, биологические или искусственные, призваны воспроизводить структуру целой ткани и обладать соответствующими физическими, химическими и механическими свойствами для обеспечения клеточной адгезии и формирования трехмерной ткани при засеивании собственными клетками, которые могли бы прижиться при имплантации. Биологические каркасы необходимо децеллюляризовать, чтобы сделать их неиммунногенными, однако этот процесс должен быть нацелен на сохранение биохимического состава, тканевой структуры, а также механических свойств сохранившегося внеклеточного матрикса (ВКМ) на оптимальном уровне. Это требует разработки и оптимизации процессов децеллюляризации. Для создания подходящего каркаса биоинженерного органа требуется: во-первых, воссоздать структуру, сходную с нативной; во-вторых, развитая сосудистая сеть, способная обеспечить адекватную перфузию тканей; в-третьих, необходимо, чтобы клетки, используемые при рецеллюляризации, были способны к дифференцировке во все паренхиматозные и сосудистые структуры органа; в-четвертых, иметь возможность управления микроокружением клеток для воздействия на их физиологию и функции; в-пятых, должна существовать возможность управления дифференцировкой и созреванием клеток *in vitro* (Taylor D., 2009).

Многочисленные исследования, проводимые в мире, пока не привели к созданию оптимального каркаса, пригодного для проведения рецеллюляризации и получения функционирующей тканеинженерной конструкции. Одной из методик его получения является децеллюляризация трупных органов с удалением клеток и сохранением внеклеточного матрикса (ВКМ) и трехмерности структуры органа (Badylak S.F. et al., 2011). Межклеточное вещество рыхлой волокнистой соединительной ткани состоит из волокон и аморфного вещества. Оно является продуктом деятельности клеток этой ткани, в первую очередь фибробластов. Архитектоника и состав ВКМ в каждой ткани являются уникальными, определяют функциональность этой ткани. Тем не менее, структура и состав каждого конкретного белка ВКМ остаются неизменными у различных видов (Exposito J.Y et al., 1992, Bernard M.P. et al., 1983). Это способствует тому, что ВКМ одних видов не вызывает иммунного отторжения у других. При

правильном удалении клеточных антигенов, которые вызывают иммунное отторжение без повреждения ВКМ, полученный каркас может служить мощным источником сигналов и содействовать «конструктивному ремоделированию» тканей после повреждения. «Конструктивное ремоделирование» означает, что каркас ВКМ содействует формированию участка соответствующей ткани в месте имплантации, вместо образования рубцовой ткани (Badylak S.F. et al., 2007). Использование тканеспецифичных каркасов для создания тканеинженерных конструкций является наиболее предпочтительным (Ott H.C et al., 2008, Macchiarini P et al., 2008., Montoya C.V. et al., 2009, Omae H. et al., 2009, Ozeki M. et al., 2006, Sellaro T.L. et al., 2007). Не менее важным, чем получение нетоксичного, отвечающего всем изложенным требованиям каркаса является подбор клеток для рецеллюляризации и оценка влияние каркаса на их жизнеспособность, пролиферативную активность, дифференцировочный потенциал.

В ходе реализации данного проекта будет предложен новый детергент-энзиматический метод децеллюляризации сердца крысы, изучена морфологическая структура полученного бесклеточного матрикса, проведена оценка его качественного белкового состава, механических свойств, а также будут проведены эксперименты по рецеллюляризации каркаса мезенхимальными мультипотентными стволовыми клетками для оценки цитотоксичности, сохранения клеточной жизнеспособности и метаболической активности.

### **Обоснование достижимости решения поставленной задачи и возможности получения запланированных результатов**

Достижимость запланированных результатов определяется нижеперечисленными факторами:

1. Наличием большого опыта коллектива заявителей в разработке протоколов децеллюляризации органов и тканей, подбором оптимальных концентраций децеллюляризирующих компонентов и продолжительности их воздействия с оценкой проходимости сосудистого русла для растворов.
2. Наличием опыта коллектива заявителей в проведении рецеллюляризации каркаса сердца крысы аллогенными ММСК путем статического ресидинга и ресидинга целого органа с последующим комплексным анализом полученных результатов (оценка жизнеспособности засеянных на каркас клеток, проведение

иммуногистохимического анализа, оценка прооксидантных свойств рецеллюляризированного матрикса).

3. Опытом проведения оценки электрофизиологических параметров работы сердца.

### **Научный коллектив**

Руководитель проекта – **Паоло Маккиарини**, MD, PhD, ведущий ученый Мегагранта Правительства Российской Федерации, руководитель Международного научно-исследовательского клиничко-образовательного центра регенеративной медицины (Краснодар, Россия), руководитель Центра регенеративной медицины Каролинского института (Стокгольм, Швеция), профессор.

Исполнители проекта:

**Губарева Елена Александровна** – заведующая лабораторией фундаментальных исследований в области регенеративной медицины, доцент кафедры общей и клинической патофизиологии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, кандидат медицинских наук.

**Куевда Елена Вячеславовна** – научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины, ассистент кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, кандидат медицинских наук.

**Сотниченко Александр Сергеевич** - научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины, аспирант кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России.

**Гуменюк Иван Сергеевич** - научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины, аспирант кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России.

**Григорьев Тимофей Евгеньевич** – заместитель заведующего лаборатории структуры полимеров, Курчатовский НБИКС-центр «Курчатовский институт», Москва, кандидат физико-математических наук.

### **Финансовая модель**

1. Приобретение реагентов и расходных материалов – 15,5 млн. рублей
2. Приобретение лабораторного оборудования – 10 млн. рублей
3. Заработная плата сотрудников и соисполнителей – 18 млн. рублей
4. Командировочные расходы – 1,5 млн. рублей

Таким образом, предполагаемый объем финансирования проекта составит 45 млн. рублей.

### **Конкурентные преимущества проекта**

Проблема регенерации сердечной мышцы привлекает внимание исследователей на протяжении многих десятков лет (Kikuchi et al., 2012). Это объясняется как высокой социальной значимостью заболеваний сердечно-сосудистой системы, так и чрезвычайной сложностью процессов восстановления клеток миокарда. В настоящее время не теряется интерес к биологическим каркасам, полученным детергент-энзиматическим методом децеллюляризации. Вышеупомянутые каркасы способны обеспечивать механическую стабильность на уровне целого органа, не препятствуют дальнейшему росту клеток. При выбранном способе создания тканеинженерных органов воспроизводится структура, сходная с нативным органом, адекватная перфузия тканей поддерживается развитой сосудистой сетью. Аллогенные клетки костного мозга крысы, используемые при рецеллюляризации, способны к дифференцировке во все паренхиматозные и сосудистые структуры органа и пролиферации на каркасе. Процесс дифференцировки и созревания клеток *in vitro* управляем. Кроме того, существует возможность управления микроокружением клеток для воздействия на их физиологию и функции.

### **Инновационность проекта**

Предложенный модифицированный детергент-энзиматический метод децеллюляризации сердца крысы для получения бесклеточного биологического каркаса, позволяет сократить длительность процедуры до 24 ч, в том числе активную фазу - до 8 ч. Протокол децеллюляризации включает применение дезоксихолата натрия и бычьей панкреатической ДНКазы. В сравнении с протоколами децеллюляризации, представленными в литературе (Ott H.C et al., 2008, Macchiarini P et al., 2008., Montoya C.V. et al., 2009., Omae

Н. Et al., 2009., Ozeki M. et al., 2006., Sellaro T.L. et al., 2007), в предлагаемом варианте значительно сокращено время воздействия детергентов и энзимов: продолжительность действия 4% раствора дезоксихолата натрия на сердце составила 3 ч, а ДНКазы – 1 ч., что положительным образом сказывается на морфологической сохранности ВКМ при полном удалении клеточного материала. Также при выполнении проекта будут сформулированы критерии оценки качества децеллюляризованного матрикса сердца крысы, проведен всесторонний морфологический анализ сохранности внеклеточного матрикса, определена иммуногенность, токсичность, биомеханические свойства. Полученные результаты позволят выполнить засеивание децеллюляризованного матрикса аллогенными клетками крысы с целью создания тканеинженерных конструкций сердца.

### **Информация о профильных публикациях, грантах и соисполнителях**

По предлагаемому научному проекту было опубликовано 41 научных публикаций, из них 38 статей – в международных изданиях Biomaterials и Regenerative Medicine (библиографические базы: РИНЦ, Scopus, Web of Science, PubMed). Получен 1 патент РФ на изобретения, подана 1 заявка на патент РФ.

Соисполнители проекта – лаборатория структуры полимеров, Курчатовский НБИКС-центр «Курчатовский институт», Москва

Профильные гранты: Мегагрант Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования от 19 октября 2011 года № 11.G34.31.0065 (бюджетное финансирование до 2014 года включительно).