

© Коллектив авторов, 2019
УДК 612.315:611.018.2:591.413
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14011>
ISSN – 2073-8137

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ С ЦЕЛЬЮ СОХРАНЕНИЯ АНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКОГО КАРКАСА ПИЩЕВОДА

Е. А. Губарева, Е. В. Куевда, М. И. Быков, Р. З. Накохов,
И. И. Павлюченко, О. В. Цымбалов, Т. В. Гайворонская, О. А. Терещенко

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

OPTIMIZATION OF THE DECELLULARIZATION PROTOCOL WITH THE PURPOSE OF PRESERVING THE ANGIOGENIC PROPERTIES OF THE BIOLOGICAL SCAFFOLD

Gubareva E. A., Kuevda E. V., Bykov M. I., Nakokhov R. Z.,
Pavluchenko I. I., Cymbalov O. V., Gaivoronskaya T. V., Tereshchenko O. A.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

В рамках экспериментального исследования оптимизирован протокол децеллюляризации пищевода на модели мелких лабораторных животных, изучена морфологическая структура полученного ацеллюлярного матрикса, проведена количественная оценка остатков ДНК, выполнена рецеллюляризация биологического каркаса мезенхимными мультипотентными стволовыми клетками для оценки цитотоксичности, сохранения клеточной жизнеспособности и метаболической активности, а также сделаны гетеротопические и ортотопические трансплантации децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриксов крысам. Показано, что полученный децеллюляризованный матрикс пищевода сохраняет архитектуру нативной ткани при полном удалении клеточного материала, не обладает цитотоксическими свойствами, поддерживает адгезию и пролиферацию клеток и обладает проангиогенными свойствами, обусловленными, в том числе, сохраненными компонентами внеклеточного матрикса, которые могут принимать активное участие в процессах неоангиогенеза и стимулировать микрососудистую пролиферацию эндотелиоцитов при гетеро- и ортотопической трансплантации. Это позволяет рассматривать разработанный и оптимизированный протокол децеллюляризации как перспективный способ получения биологического каркаса с проангиогенными свойствами для создания тканеинженерных конструкций и возможностью клинического применения в обозримом будущем.

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, пищевод, децеллюляризованный матрикс, ангиогенез

In the framework of the experimental study, the esophagus decellularization protocol was optimized in small laboratory animals, the morphological structure of the resulting acellular matrix was studied, the quantitative evaluation of residual DNA was made, the acellular scaffold was recellularized with mesenchymal multipotent stem cells to assess cytotoxicity, maintain cell viability and metabolic activity, and heterotopic and orthotopic transplantations of decellularized and recellularized matrices in rats were performed. It is shown that the resulting decellularized esophagus matrix preserves the architectonics of native tissue with complete removal of cellular material, does not possess cytotoxic properties, supports adhesion and cell proliferation, and has proangiogenic properties, including preserved components of the extracellular matrix, which could take an active part in neoangiogenesis and stimulate microvascular proliferation of endothelial cells in hetero- and orthotopic transplantation. All the facts allow us to consider the developed and modified protocol of esophageal decellularization to be a promising way to obtain a biological scaffold with pro-angiogenic properties for creating tissue engineered constructions and to give the possibility of clinical application in the foreseeable future.

Keywords: tissue engineered constructions, esophagus, decellularized matrix, angiogenesis

Для цитирования: Губарева Е. А., Куевда Е. В., Быков М. И., Накохов Р. З., Павлюченко И. И., Цымбалов О. В., Гайворонская Т. В., Терещенко О. А. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ С ЦЕЛЬЮ СОХРАНЕНИЯ АНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКОГО КАРКАСА ПИЩЕВОДА. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019; 14(1.2):186-191. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14011>

For citation: Gubareva E. A., Kuevda E. V., Bykov M. I., Nakokhov R. Z., Pavluchenko I. I., Cymbalov O. V., Gaivoronskaya T. V., Tereshchenko O. A. OPTIMIZATION OF THE DECELLULARIZATION PROTOCOL WITH THE PURPOSE OF PRESERVING THE ANGIOGENIC PROPERTIES OF THE BIOLOGICAL SCAFFOLD. *Medical News of North Caucasus*. 2019; 14(1.2):186-191. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14011> (In Russ.)

ВКМ – внеклеточный матрикс
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
МСК – мезенхимальные стромальные клетки

ТИК – тканеинженерная конструкция
ЭДТА – этилендиаминотетрауксусная кислота
VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста

Перспективы применения биологических каркасов в виде децеллюляризованных органов опосредованы способами их получения и оценки, как правило, специфичными для каждой ткани. Каркасы, биологические или искусственные, призваны воспроизводить структуру нативной ткани и должны обладать соответствующими физическими, химическими и биомеханическими свойствами, необходимыми для обеспечения адгезии и пролиферации аутологичных клеток реципиента с целью формирования трехмерной тканеинженерной конструкции (ТИК). Однако после децеллюляризации биохимический состав, архитектура и механические свойства внеклеточного матрикса (ВКМ) должны сохраняться [1].

Анализ современной научной литературы показал, что особенности кровоснабжения являются серьезной проблемой для тканевой инженерии пищевода. В тканеинженерной конструкции пищевода требуется наличие сети кровеносных сосудов после имплантации, которая необходима для обеспечения клеток питательными веществами, что в дальнейшем будет способствовать более быстрой регенерации тканей. Толщина ткани является ключевым фактором, определяющим продолжительность ее полной васкуляризации [2]. Различные сигналы (топографические, химические, биологические и механические) влияют на формирование функционирующего тканеинженерного пищевода. Контролируемое высвобождение факторов роста в тканеинженерной конструкции также важно для его регенерации. Факторы роста, такие как сосудистый эндотелиальный фактор роста, основной фактор роста фибробластов и эпидермальный фактор роста, способствуют эпителиальной клеточной адгезии, миграции, пролиферации, а также стимулируют ангиогенез в тканеинженерном пищеводе [3].

Цель исследования – разработка оптимального протокола децеллюляризации пищевода на модели крыс и оценка проангиогенных свойств тканеинженерной конструкции.

Материал и методы. Все эксперименты проведены на крысах-самцах линии Wistar массой тела 230 ± 50 г. Животные были разделены на 3 группы. В 1 группе ($n=20$) отработывался протокол децеллюляризации пищевода, животным из 2 группы ($n=30$) проводились подкожные имплантации, животным из 3 группы ($n=30$) – имплантации в область брюшной части пищевода (без вскрытия просвета). Животным из 2 и 3 групп проводились имплантации децеллюляризованного ($n=10$), рецеллюляризованного ($n=10$) и нативного ($n=10$) пищевода.

Этаназию животных проводили интраперитонеальным введением летальной дозы барбитуратов (150 мг/кг). Оригинальный протокол [4] децеллюляризации тонкого кишечника свиньи детергент-энзиматическим методом был модифицирован с изменением времени воздействия, состава и порядка перфузии децеллюляризирующими растворами для получения ацеллюлярного матрикса пищевода. После промывания раствором фосфатного буфера с добавлением 1 % раствора пенициллина-стрептомицина следовал цикл перфузии деионизированной водой (1 ч), затем 4 % дезоксихолатом натрия с добавлением 800 мкл ЭДТА (3 ч), фосфатным буфером (10 мин), фосфатным буфером с добавлением 2000 ЕД/мг

свиной панкреатической ДНКазы-I (1 ч), после чего пищевод промывали раствором фосфатного буфера с добавлением 1 % раствора пенициллина-стрептомицина (24 ч). Все растворы были стерильными, комнатной температуры. Скорость подачи растворов составляла 6 мл/мин.

Морфологический анализ.

Образцы нативных, децеллюляризованных, рецеллюляризованных и эксплантированных пищеводов для морфологического анализа фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине, дегидратировали с последующим заключением в парафин при помощи гистопроцессора Leica TP1020 (Германия) по стандартной методике. Заливку в парафин выполняли на модульной установке EG1150H (Leica, Германия). Для общегистологической оценки препаратов при помощи ротационного микротомата RM2235 (Leica, Германия) получали парафиновые срезы толщиной 5 мкм с последующей депарафинизацией, гидратацией, окрашиванием гематоксилином и эозином (Histolab, Швеция) и флуорофором (4',6-диамидино-2-фени-линдола) DAPI (SigmaAldrich, США). Качественную оценку компонентов внеклеточного матрикса проводили после окрашивания срезов пикрофуксином по Ван Гизону (Первая лабораторная компания, Санкт-Петербург). Для оценки сохранности белков внеклеточного матрикса пищевода, а также неоангиогенеза в области имплантации был выполнен иммуногистохимический анализ. Для этого срезы депарафинизировали и гидратировали, блокировали эндогенную пероксидазную активность 3 % раствором пероксида водорода в течение 10 мин, демаскировали антигены в цитратном буферном растворе (ab 64236, Abcam, США) на водяной бане в течение 40 мин. Реакции проводили со следующими первичными антителами в рекомендованном производителем разведении: anti-Collagen IV (ab6586 Abcam, США), anti-Laminin (ab11575 Abcam, США), anti-Fibronectin (ab6328 Abcam, США), anti-VEGF (ab46154 Abcam, США). Препараты дополнительно докрасивались гематоксилином Майера в течение 10 секунд. Нами были выбраны системы детекции с использованием наборов Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ab 64261, Abcam, США), Mouse specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ab 64259, Abcam, США). Для антитела anti-Von Willebrand factor (FITC) (ab46154 Abcam, США) вторичная детекция не применялась. Изучение микропрепаратов проводилось на микроскопе Olympus CX 41 (Япония).

Количественное определение содержания ДНК.

Определение количества остаточной ДНК для оценки качества получаемых матриксов в нативных и децеллюляризованных органах проводилось на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) с использованием стандартных наборов реактивов (Dneasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Sweden) по стандартной методике фирмы-изготовителя.

Выделение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и статичная рецеллюляризация децеллюляризованного пищевода.

Материалом для выделения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) служил красный костный мозг крыс. МСК для последующей

рецеллюляризации выделяли по стандартной методике в авторской модификации. При культивировании клеток использовали стандартную среду DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки и 1 % раствора антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Посев культуры осуществляли на флаконы Corning (США) и инкубировали при 37 °С с 5 % содержанием CO₂. После первых 24 ч инкубации неприкрепившиеся клетки удаляли вместе с культуральной средой, далее смену среды проводили каждые 2 дня. Культивирование осуществляли до 3–4 пассажей с последующим типированием перед использованием в исследованиях цитотоксических свойств и жизнеспособности клеток на каркасах, а также рецеллюляризации матрикса. Принадлежность к МСК полученных культур верифицировали при иммунофенотипировании с анализом экспрессии CD34, CD45, CD90 и CD105, а также при проведении индуцированной дифференцировки в три клеточные линии по стандартной методике [5]. Пролиферативную активность в культуре МСК оценивали при цитохимическом окрашивании на содержание Ki-67 с последующей детекцией флуоресценции. В качестве первичного использовали моноклональное кроличье антитело к Ki-67 (1:50, ab 15580, Abcam, США), в качестве вторичного антитела – Alexa Fluor 488 (1:400, ab 150081, Abcam, США).

Статичную рецеллюляризацию матрикса пищевода выполняли в 6-луночных планшетах с нанесением клеточной суспензии в объеме 200 мкл как на поверхность каркаса, так и в его просвет. Общее количество клеток, использованных для рецеллюляризации одного децеллюляризованного пищевода, составило 200000.

Протокол оперативного вмешательства.

Анестезия животных осуществлялась подкожным введением Xilazin 2 % (10 ED) и внутримышечным введением Zoletil (8 ED). В послеоперационном периоде проводилась терапия антибиотиком Baytril 0,2 mL/kg без последующей иммунотерапии.

При гетеротопической трансплантации (подкожные тесты) выполнялся разрез на холке крысы длиной 1 см и создавался подкожный карман. Образцы пищевода помещались в карман и фиксировались двумя швами к подлежащим тканям с целью предотвращения перемещения в область кожного шва. Кожная рана ушивалась непрерывным швом. В качестве оперативного доступа при ортотопической трансплантации в область брюшной части пищевода использовали подреберную (косую) лапаротомию слева. Послойно рассекали кожу, подкожную клетчатку, мышцы переднебоковой стенки живота, брюшину. С помощью ранорасширителей разводили края лапаротомной раны, срединную и левую доли печени отводили краниально, желудок – каудально. Трансплантат (длиной не менее 8–10 мм) продольно фиксировали двумя узловыми швами к брюшной части пищевода (без вскрытия просвета). Проводили контроль гемостаза. После завершения описанных выше манипуляций рана послойно ушивалась, с наложением отдельных швов на мышцы переднебоковой брюшной стенки и кожу. Эксплантацию графтов выполняли на 7, 14 и 21 сутки после операции.

Статистический анализ.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики на персональном компьютере Graph Pad Prism version 6.04 (источник www.graphpad.com). Полученные результаты представленные как среднее арифметическое

и стандартное отклонение ($m \pm \delta$). Результаты исследований обработаны с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверными признавались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В результате децеллюляризации ткани пищевода теряли характерный для нативного органа темно-красный цвет и приобретали молочно-белую окраску (рис. 1). Децеллюляризация пищевода происходила относительно равномерно на протяжении всего органа, но в некоторых случаях для децеллюляризации центрального сегмента органа требовалось больше времени, что может быть связано с физиологическим сужением в данной части. К нижнему катетеру фиксировался груз, который препятствовал всплытию нижней части пищевода, при этом подбиралась адекватная длина для исключения натяжения органа.



Рис. 1. Децеллюляризация пищевода: а – нативный пищевод; б – децеллюляризованный пищевод

Увеличение скорости подачи растворов более 6 мл/мин способствовало ускорению процесса децеллюляризации, но приводило к отслолке слизистой оболочки и нарушению целостности стенки пищевода. Снижение скорости подачи растворов менее 6 мл/мин приводило к неравномерной децеллюляризации органа и увеличению времени протокола.

Морфологическая характеристика децеллюляризованного пищевода крысы

Окрашивание гематоксилином и эозином препаратов нативного пищевода показало, что слизистая оболочка органа представлена многослойным плоским неороговевающим эпителием, подслизистая основа – рыхлой волокнистой соединительной тканью, мышечная оболочка представлена двумя слоями мышечной ткани (внутренний циркулярный и наружный продольный). Окрашивание гематоксилином и эозином децеллюляризованного пищевода не выявило наличия сохранных ядер и клеток. При флуорохромировании DAPI в парафиновых срезах нативных органов отмечалось интенсивное свечение ядерных структур, в децеллюляризованных – свечение ядер отсутствовало. Окраска пикрофуксином по Ван Гизону, тропная к соединительнотканным волокнам, в нативной ткани позволила подробнее визуализировать волокна внеклеточного матрикса, их архитектуру и локализацию. Окрашенные соединительнотканые волокна преимущественно локализовались в области базальной мембраны эпителия, в подслизистом, а также в мышечном слоях. В децеллюляризованной ткани внеклеточный матрикс, состоящий преимущественно

существенно из коллагена, оставался неизменным. Упорядоченная структура и преимущественно параллельное расположение коллагеновых волокон в матриксе были сохранены.

Иммуногистохимическое исследование показало, что в децеллюляризированной ткани пищевода крысы сохранялась исходная локализация белков внеклеточного матрикса: коллагена IV типа, ламинина, фибронектина. Данные белки выявлялись в основном в области базальной мембраны (рис. 2). Поскольку при децеллюляризации невозможно уда-

лить 100 % клеток, существуют иные методы оценки оставшихся компонентов клеток, в частности ДНК. Количественный анализ показал, что в процессе децеллюляризации пищевода было удалено около 92 % ДНК ($1576,37 \pm 279,6$ нг/мг в нативном пищеводе по сравнению с $123,85 \pm 22,61$ нг/мг – в децеллюляризованном). Это свидетельствует об элиминации значительной части клеточных элементов, что позволяет использовать ацеллюлярный матрикс для дальнейших исследований после рецеллюляризации.

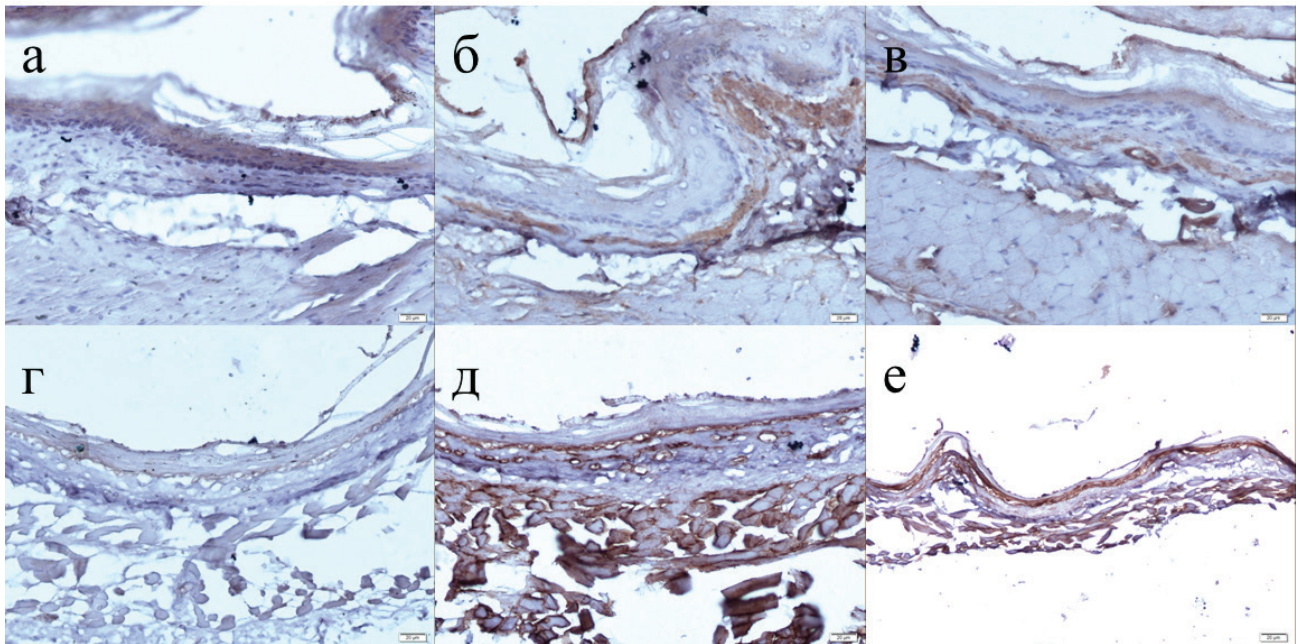


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция с антителами к фибронектину (а, г), ламинину (б, д), коллагену IV типа (в, е); нативный пищевод (верхний ряд), децеллюляризованный пищевод (нижний ряд). Увеличение: об. x40, ок. x10

На 3 сутки после рецеллюляризации ацеллюлярного матрикса снятыми с флакона клетками было отмечено, что МСК заселили каркас планарно, распластавшись на поверхности серозной оболочки децеллюляризованного пищевода, а также изнутри, со стороны слизистой, частично проникая в подслизистый слой, в полном соответствии с выбранным комбинированным способом введения клеточной суспензии. К 7 суткам культивирования клеток на каркасе их количество существенно не изменилось, при этом МСК приобрели выраженную фибробластоподобную морфологию, отмеченную ранее при культивировании клеток на пластике. Доля активно пролиферирующих клеток, которую определяли при проведении иммуногистохимического исследования как число клеток, экспрессирующих Ki-67, к общему количеству клеток, составила 2,66 %.

При подкожной имплантации на 7 сутки вокруг образцов децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода отмечали отек тканей, слабую воспалительную реакцию и формирование зрелой грануляционной ткани с пролиферирующими фибробластами и большим количеством сосудов. В имплантах обнаруживали фибробластоподобные клетки, отмечали лимфомакрофагальную инфильтрацию. На 14 и 21 сутки отмечали уменьшение импланта в размере, вероятно, за счет снижения степени выраженности отека тканей, уплотнения и уменьшения расстояния между коллагеновыми волокнами ацеллюлярного матрикса, снижение выраженности вос-

палительной клеточной инфильтрации. Отмечали прорастание ткани импланта новообразованными тонкостенными сосудами (данные не представлены).

Результаты морфологического исследования в области ортотопической имплантации пищевода в брюшной полости показали, что восстановление кровоснабжения как децеллюляризованного, так и рецеллюляризованного пищевода происходит за счет прорастания новых сосудов преимущественно со стороны нативного пищевода. Отмечали невыраженный спаечный процесс между левой долей печени и имплантами. В инфильтрате обнаруживали фибробласты и мононуклеарные клетки (рис. 3). На границе децеллюляризованного и нативного пищевода выявляли прорастающие в имплантат сосуды, в некоторых случаях определение границ графта было затруднено, что связано с интеграцией тканеинженерной конструкции с окружающими тканями.

При исследовании графта пищевода в окружающих тканях в большом количестве обнаруживали мелкие новообразованные капилляры в стенке имплантированного децеллюляризованного пищевода, большая часть из которых обнаруживалась на границе с нативным пищеводом, что подтверждало положительной иммуногистохимической реакцией с антителами к VEGF и фактору Виллебранда.

Многочисленные попытки создания биоинженерного трансплантата для замены ткани пищевода не привели к решению всех проблем тканевой ин-

женерии данного полового органа. Снижение иммуногенных свойств аллотрансплантата сопровождалось возникновением новых проблем, связанных непосредственно с процессом децеллюляризации. Успех ортотопической трансплантации тканеинженерного пищевода напрямую зависит от имму-

ногенных свойств каркаса, но одной из первостепенных задач тканевой инженерии также является минимизация нежелательных эффектов процесса децеллюляризации органа, в том числе и сохранность проангиогенных свойств получаемого биологического матрикса.

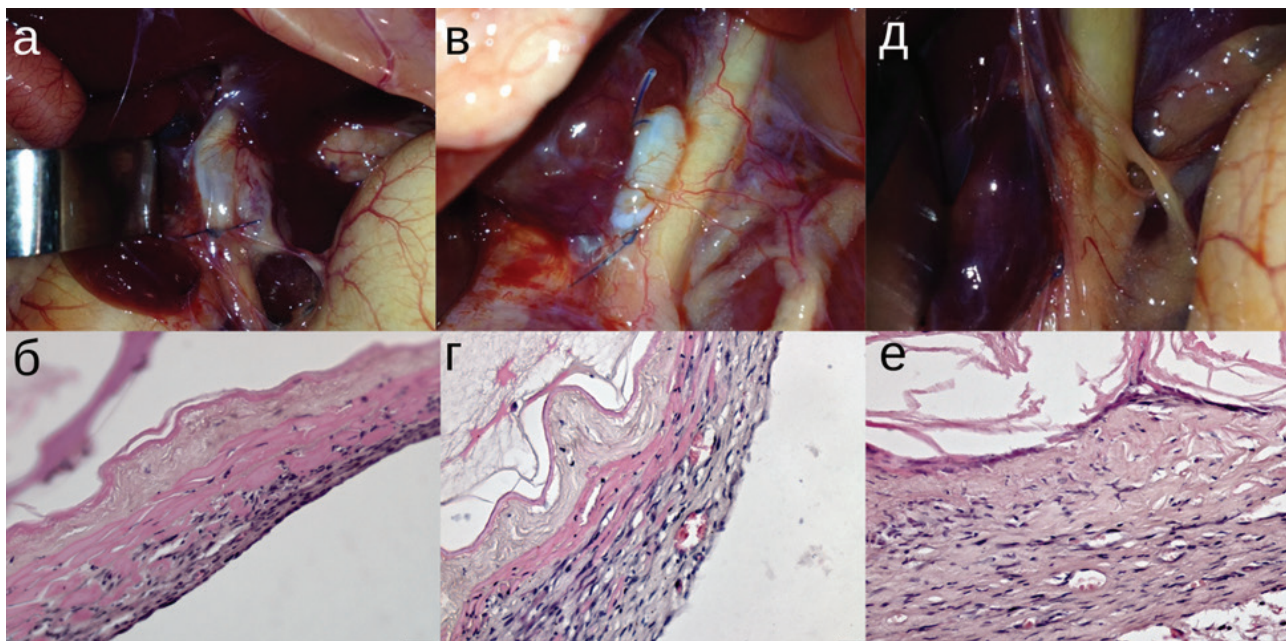


Рис. 3. Ортотопическая трансплантация децеллюляризованного пищевода крысы: а, б – 7 сутки; в, г – 14 сутки; д, е – 21 сутки; окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение: об. x20, ок. x10

Из полученных в ходе исследования результатов видно, что биологический децеллюляризованный матрикс обладает проангиогенными свойствами, обусловленными в том числе сохранными компонентами внеклеточного матрикса, которые могут принимать активное участие в процессах неоангиогенеза и стимулировать микрососудистую пролиферацию эндотелиоцитов. Этот факт решает ключевую проблему регенеративной медицины и позволяет в будущем создать функционирующую ТИК пищевода. В частности, известно, что ламинин, сохранившийся в децеллюляризованном матриксе пищевода, способен участвовать в неоангиогенезе, восстанавливая целостность базальной мембраны сосудов [6].

Особое внимание следует обратить на то, что сосудистая сеть в ТИК должна обладать определенными характеристиками. Одной из ключевых задач сосудистой сети такого типа является снабжение клеток ткани достаточным количеством питательных веществ, для чего все они должны находиться на расстоянии не более 200 мкм от сосуда. Эта величина обычно рассматривается как предел возможной диффузии кислорода и питательных веществ в пределах ткани [7]. При минимальном давлении для достижения этого показателя русло должно быть сформировано в виде «сосудистого дерева», где более крупные сосуды делятся на более мелкие сосуды вплоть до капилляров, проходящих по всему объему ткани. При этом сосудистая сеть должна функционировать как барьер, через который в окружающие ткани избирательно и дозированно проходят вещества и жидкость. Поэтому после имплантации должна быть обеспечена возможность подключения сосудистой сети сформированной

ткани к кровеносной системе пациента. Для такого подключения необходимы сосуды диаметром в несколько сотен микрометров [2].

Одним из этапов изучения качества децеллюляризации органов является подкожная имплантация каркасов. Данная процедура помогает определить *in vivo*, насколько эффективно удалены клеточно-ассоциированные белки, а также их вклад в ответ тканей на имплантацию. Полученные результаты позволяют рассматривать методику подкожной имплантации децеллюляризованных матриксов как важный этап *in vivo* оценки реакции тканевого ответа организма-реципиента в ответ на имплантацию тканеинженерных конструкций. При морфологическом анализе гетеротопических имплантатов децеллюляризованного и рецеллюляризованного пищевода в стенке имплантов выявлялось больше сосудов, чем при имплантации ТИК в область брюшной части пищевода. Связано это с тем, что подкожная жировая клетчатка обильно кровоснабжается и не моделирует те условия, в которых оказывается ТИК после имплантации в область брюшной части пищевода.

В биологических каркасах, получаемых методом децеллюляризации, в значительной степени сохраняется сложная геометрия органа, в том числе относительно нетронутая сосудистая сеть. Сохранность сосудистой сети органа при создании ТИК пищевода методом децеллюляризации не является критическим фактором. Объясняется это тем, что кровоснабжение пищевода носит сегментарный характер, что подразумевает наличие разных источников кровоснабжения для шейного, грудного и брюшного отделов пищевода. Такой тип кровоснабжения исключает возможность микрохирургического соединения

сосудистой сети тканеинженерного пищевода с сосудистой системой реципиента, так как отсутствует единый магистральный сосуд, кровоснабжающий орган. Восстановление кровоснабжения трансплантата, вероятно, осуществляется за счет образования новой сосудистой сети, в частности путем врастания сосудов со стороны нативного пищевода.

Заключение. Механизмы регуляции ангиогенеза при создании тканеинженерных конструкций пищевода остаются проблемой. Несмотря на большой прогресс в понимании механизмов ангиогенеза, индуцированного ишемией, и наличие массы положительных результатов по его стимуляции, основанных на использовании механизмов естественного ответа на снижение перфузии тканей, практическое использование полученных знаний для улучшения метаболического обеспечения органов и тканей при создании тканеинженерных конструкций все еще остается нерешенной проблемой.

Литература/References

1. Черных А. В., Малеев Ю. В., Шевцов А. Н., Пульвер А. Ю., Лейбович Б. Е. К вопросу о перспективах развития тканевой инженерии (обзор литературы). *Оренбургский медицинский вестник*. 2016;4(4):68-77. [Chernykh A. V., Maleev Yu. V., Shevcov A. N., Pulver A. Yu., Leybovich B. E. To the question about the prospects of tissue engineering (literature review). *Orenburgskiy medicinskiy vestnik. – Medical News of Orenburg*. 2016;4(4):68-77. (in Russ.)].
2. Rouwkema J. A., Khademhosseini A. Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks. *Trends in biotechnology*. 2016;37(9):733-745. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.002>
3. Poghosyan T., Gaujoux S., Sfeir R., Larghero J., Cattani P. Bioartificial oesophagus in the era of tissue engineering. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2011;52:S16-17. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182105964>

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка экспериментальных образцов тканеинженерных конструкций на основе децеллюляризованных матриц для применения в регенеративной медицине».

Информированное согласие: Исследование было проведено в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1972) и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), после одобрения протоколов исследования локальным этическим комитетом.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

4. Syed O., Walters N. J., Day R. M., Kim H. W., Knowles J. C. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(12):5043-5054. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.024>
5. Lim M. L., Jungebluth P., Ajallouei F., Friedrich L. H., Gilevich I. [et al.]. Whole Organ and Tissue Reconstruction in Thoracic Regenerative Surgery. *Mayo Clinic Proceedings*. 2013;88(10):1151-1166. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.03.011>
6. Hodde J. P., Johnson C. E. Extracellular matrix as a strategy for treating chronic wounds. *American journal of clinical dermatology*, 2016;8(2):61-66.
7. Jain R. K., Au P., Tam J., Duda D. G., Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nature biotechnology*. 2005;23(7):821-823. <https://doi.org/10.1038/nbt0705-821>

Сведения об авторах:

Губарева Елена Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией фундаментальных исследований в области регенеративной медицины; тел.: 89181327857; e-mail: g_lena82@list.ru; <http://orcid.org/0000-0003-4307-4774>

Куведва Елена Вячеславовна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник; тел.: 89189351760; e-mail: elenakuevda@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0002-7585-9923>

Быков Михаил Ильич, доктор медицинских наук, заведующий эндоскопическим отделением; тел.: 89182125530; e-mail: ilya.bh@mail.ru

Накохов Рамазан Заурбиевич, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины; тел.: 89649169763; e-mail: rnz00009@gmail.com

Павлюченко Иван Иванович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой биологии с курсом медицинской генетики; тел.: 89604755228; e-mail: pavluchenkoii@ksma.ru

Цымбалов Олег Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии; тел.: 89181767173; e-mail: tsimbal_ov@mail.ru

Гайворонская Татьяна Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой; тел.: 89002364145; e-mail: t.gayvoronskaya@rambler.ru; <http://orcid.org/0000-0002-8509-2156>

Терещенко Олег Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии; тел.: 89180777711; e-mail: mr.toa1966@mail.ru